

IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

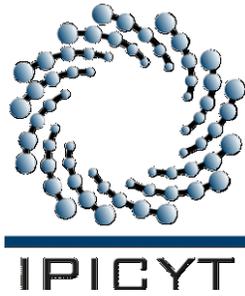
**“EFECTO DE NEUROPEPTIDOS QRFP SOBRE LA
ADIPOGÉNESIS *IN VITRO* Y SU EXPRESIÓN EN DEPÓSITOS
GRASOS DE RATA ”**

Tesis que presenta
Marbella Chávez Solano

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Luis A. Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2010



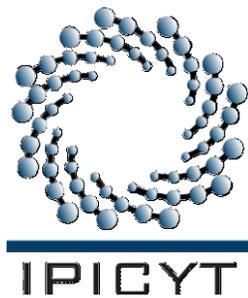
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Efecto de los neuropéptidos QRFP sobre la adipogénesis *in vitro* y su expresión en depósitos grasos de rata**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Marbella Chávez Solano** y aprobada el **23 de Septiembre de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Director de la tesis

Dr. Carlos Barajas López
(Asesor de la tesis)

Dr. María Teresa Morales Guzmán
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (223333).



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 076 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 29 días del mes de octubre del año 2010, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Carlos Barajas López	Presidente	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Secretario	IPICYT
Dra. María Teresa Morales Guzmán	Sinodal externo	UNAM-Juriquilla

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Marbella Chávez Solano

sobre la Tesis intitulada:

Efecto de neuropéptidos QRFP sobre la adipogénesis in vitro y su expresión en depósitos grasos de rata

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

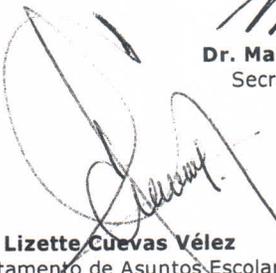
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe 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 29 días del mes de octubre de 2010.


Dr. Marcial Benítez Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares


INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA

DEDICATORIAS

A MI ABUELITA QUE ME HA FORMADO, APOYADO Y POR SIEMPRE HABER CREIDO EN MÍ.

A MIS PRIMAS TERE Y YEZID QUE SON COMO MIS HERMANAS.

A MIS PADRES Y HERMANAS CON LOS QUE HE PASADO MOMENTOS INOLVIDABLES.

Y A TODAS LAS PERSONAS QUE CREYERON EN MI SIEMPRE Y ME APOYARON PARA CONSEGUIR MIS METAS.

GRACIAS...

ÍNDICE

Constancia de aprobación de la tesis	2
Créditos institucionales	3
Dedicatorias	4
Índice	5
Resumen	7
Abstract	8
I. Introducción	
1.1 Epidemiología del sobrepeso y la obesidad	9
1.2 Regulación de la ingesta alimenticia	10
1.3 El tejido adiposo secreta señales que afectan la ingesta alimenticia	10
1.4 El tejido adiposo secreta factores neurales	12
1.5 Los neuropéptidos RFamida afectan la ingesta y la acumulación lipídica.	13
1.6 Mecanismos de acción de péptidos RFamida y características de sus receptores	17
II. Materiales y Métodos	
2.1 Neuropéptidos empleados	19
2.2 Cultivo celular	19
2.3 Cuantificación de triglicéridos	20

2.4 RT-PCR	21
2.5 Western blot	22
2.6 Análisis estadístico	23
III. Resultados y discusión	24
IV. Conclusiones	30
V. Referencias	31
VI. Pies de figura	36
VII. Figuras	42

RESUMEN

Los péptidos RFamida son producidos en el hipotálamo y ejercen efectos anorexigénicos y orexigénicos cuando se inyectan intracerebroventricularmente. Resultados de nuestro laboratorio mostraron que los péptidos RFamida anorexigénicos NPAF, NPFF y NPSF bloquean la adipogénesis *in vitro*. Los péptidos RFamida QRFP (*pyroglutamylated arginine-phenylalanineamide peptide*) son orexigénicos inyectados en el hipotálamo pero se desconoce si ejercen efectos periféricos. Nosotros evaluamos el efecto de los péptidos QRFP h26RFa, r26RFa, r26RFa₁₋₁₆, r26RFa₂₀₋₂₆ y r43RFa sobre la adipogénesis *in vitro* de la línea celular 3T3-F442A y encontramos que éstos incrementaron la acumulación lipídica en función de la concentración. Asimismo, determinamos mediante RT-PCR que los mRNAs de QRFP y de su receptor, GPR103, se expresan en preadipocitos 3T3-F442A pero no en los adipocitos de esta línea celular. Los mRNAs y las proteínas de QRFP se expresaron también en depósitos grasos de epiplón, epidídimo, subcutáneo y perirenal provenientes de ratas macho Wistar. Nuestros resultados sugieren que los péptidos QRFP juegan un papel importante en la regulación del metabolismo y la diferenciación del tejido adiposo actuando directamente sobre este tejido, ya sea de forma endocrina o autocrina. Nuestro trabajo futuro estudiará los mecanismos moleculares por los cuales los péptidos QRFP favorecen la acumulación lipídica en células adiposas y caracterizará la expresión de estos péptidos en depósitos grasos de ratas sometidas a diferentes regímenes alimenticios.

ABSTRACT

Hypothalamic RFamide peptides exert both anorexigenic and orexigenic effects injected intracerebroventricularly. Results from our laboratory showed that anorexigenic RFamide peptides, NPAF, NPFF and NPSF block the *in vitro* adipogenesis. RFamide QRFP (Pyroglutamylated arginine-phenylalanineamide peptide) peptides are centrally orexigenic but it is unknown whether they exert peripheral effects. We evaluated the effect of the QRFP peptides h26RFa, r26RFa, r26RFa₍₁₋₁₆₎, r26RFa₍₂₀₋₂₆₎ and r43RFa on 3T3-F442A adipogenesis and found that they increased lipid accumulation in a concentration-dependent manner. We also determined by RT-PCR that mRNAs for QRFP and its receptor, GPR103, were expressed in 3T3-F442A preadipocytes but not in mature adipocytes of this cell line. QRFP mRNAs and proteins are also expressed in omental, epididymal, perirenal and subcutaneous fat depots of Wistar rats. Our results suggest that QRFP peptides play an important role in regulating metabolism and differentiation of adipose tissue by acting directly on this tissue, either endocrinally or autocrinally. Our future work will study the molecular mechanisms by which peptides QRFP favor lipid accumulation in fat cells and will characterize the expression of these peptides in fat depots of rats subjected to different diets.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del sobrepeso y la obesidad

El sobrepeso afecta a más de 1600 millones de adultos en el mundo y al menos 500 millones de ellos son obesos (WHO, 2005). En nuestro país el sobrepeso es un tema prioritario de salud puesto que aproximadamente el 70% de la población mexicana adulta lo padece (WHO, 2005). Más preocupante es que México ocupa el primer lugar mundial de sobrepeso infantil, con 26.8% de infantes obesos (SSA, 2010). El sobrepeso y las enfermedades asociadas (enfermedades cardiovasculares, cerebro-vasculares, hipertensión, algunos tipos de cáncer, *diabetes mellitus* tipo 2) representan un alto impacto en costos para los sistemas de salud. En 2008 las enfermedades asociadas al sobrepeso representaron el 33.2% del gasto público federal destinado a servicios de salud en México (ENSANUT, 2006). La Organización Mundial de la Salud prevé que para el año 2015 existan más de 2500 millones de personas con sobrepeso en el mundo (WHO, 2005). Dado el aumento de casos de obesidad en el mundo se requieren estudios profundos sobre los mecanismos del desarrollo de tejido adiposo. Debido a que el exceso de tejido adiposo es la característica de la obesidad, es importante el estudio de los factores y los mecanismos en la generación de nuevos adipocitos. Conocer estos mecanismos ampliara el panorama en el desarrollo de terapias anti-obesidad con blancos más específicos y efectivos.

1.2 Regulación de la ingesta alimenticia

El apetito y la saciedad son regulados por señales endógenas y exógenas al hipotálamo que involucran neurotransmisores, neuropéptidos (péptidos hipotalámicos), hormonas y proteínas que favorecen actividades orexigénicas o anorexigénicas (Erlanson-Albertsson, 2005., Atkinson, 2008). Las señales endógenas se producen en forma de péptidos en el hipotálamo, considerado el órgano endocrino con mayor número de elementos y sistemas de control sobre la ingesta alimenticia (Hirsh y cols, 1992). Las señales exógenas al hipotálamo son producidas en órganos periféricos, como el tejido adiposo, páncreas, hígado, estómago y duodeno (Majdic, 2009). Las señales exógenas o periféricas afectan regiones del hipotálamo que contribuyen en la regulación del ingesta alimenticia (Hillebrand y cols, 2002., Leibowitz y cols, 2004., Peelman y cols, 2004., Small y cols, 2004). Las señales producidas en el tejido adiposo juegan un papel importante en la regulación de la ingesta alimenticia.

1.3 El tejido adiposo secreta señales que afectan la ingesta alimenticia

El tejido adiposo blanco predomina en adultos y sirve como almacén de grasa, mientras que el tejido adiposo café genera calor en los neonatos y roedores vía desacoplamiento mitocondrial de la oxidación de lípidos (Farmer, 2008). Por mucho tiempo el tejido adiposo fue considerado básicamente como aislante térmico, almacén de grasa en mamíferos y movilizador de lípidos reguladas por innervaciones (Bowers y cols, 2001., Bartness y cols, 2007). Ahora se sabe que el tejido adiposo blanco también funciona como un órgano endocrino y secreta cerca de 100 proteínas señalizadoras conocidas como adipocinas que ejercen funciones

a nivel periférico e hipotalámicamente (Seboek y cols, 2004., Trayhurn y cols, 2006., Fonseca y cols 2007). Las adipocinas influyen sobre la homeostasis, los procesos de inflamación, inmunidad, tono vascular, resistencia a insulina, metabolismo de la glucosa y sobre la ingesta alimenticia (Trayhurn y cols, 2006). En el síndrome de la obesidad, se cambia la expresión de adipocinas y aquellas actividades reguladas por el tejido adiposo lo que contribuye al desarrollo de otros padecimientos (Trayhurn, 2005). La comunicación hipotálamo-tejido adiposo es muy importante en la regulación de la homeostasis calórica y la regulación metabólica en mamíferos (Fonseca y cols, 2007). La adipocina leptina favorece las señales de saciedad al unirse con sus receptores presentes en el hipotálamo (Fonseca y cols, 2007, Trayhurn y cols, 2006). Sin embargo, factores externos también pueden modificar o afectar la producción de adipocinas y factores involucrados en la regulación de la ingesta alimenticia. La expresión de factores orexigénicos y anorexigénicos (hipotalámicos y periféricos) es afectada por el contenido de grasas, proteínas y carbohidratos de la dieta (Beck y cols, 2002, Erdmann y cols, 2003). En ratas alimentadas con dietas altas en grasa la expresión de leptina aumenta y la producción de neuropéptido Y hipotalámico disminuye (Stricker-Krongrad y cols, 1998, Beck y cols, 2003). La ghrelina estomacal, con papel orexigénico, disminuye con dietas altas en grasa y con dietas altas en carbohidratos (Elchelby y cols, 1999., Beck y cols, 2002). En general, la producción de adipocinas se disminuye en animales con dietas altas en grasas (Havel, 2004., Barnea y cols, 2009). El estrés y los ritmos circadianos también modifican la expresión de factores orexigénicos y anorexigénicos. Ratas estresadas con frío producen mayor cantidad de neuropéptido Y (Kuo y cols,

2007). La restricción calórica en ratas provoca cambios en la modulación de la expresión de adipocinas (Perello y cols, 2004., Romero y cols, 2009) Por lo que la actividad orexigénica y anorexigénica depende tanto de factores endocrinos como de factores externos.

1.4 El tejido adiposo secreta factores neurales

Recientemente se ha reportado que el tejido adiposo produce factores neuroendocrinos, como el neuropéptido Y, proteína agouti, somastatina, kisspeptina, neurotensina y factores liberadores de mineralocorticoides (Chaldakov y cols, 2009, Trayhurn y cols 2006, Brown y cols, 2008). El tejido adiposo también produce factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro y factor neurotrófico derivado de células gliales y neurotransmisores como noradrenalina, glutamato y ácido gamma-aminobutírico (Trayhurn y cols 2006, Kos y cols, 2007, Seboek y cols, 2004). Otras sustancias secretadas por el tejido adiposo son el antígeno nuclear neuronal y nestina. (Chaldakov y cols, 2009, Seboek y cols, 2004, Hausman y cols, 2008, Brown y cols, 2008). Por lo que el tejido adiposo ha emergido como un importante órgano secretor de diversas moléculas que pueden afectar la homeostasis calórica. Moléculas como los péptidos RFamida modulan central y periféricamente la ingesta alimenticia y la acumulación de lípidos en las células adiposas. Motivo por el cual los péptidos RFamida han empezado a ser estudiados y evaluados en padecimientos como la obesidad.

1.5 Los neuropéptidos RFamida afectan la ingesta alimenticia y la acumulación lipídica

Los neuropéptidos RFamida están formados por un número pequeño de aminoácidos y funcionan como señales neurales que influyen en actividades reguladas por el sistema nervioso central (Zajac y cols, 2006). Las moléculas precursoras de neuropéptidos son generalmente polipéptidos de gran tamaño que sufren cortes para generar los fragmentos bioactivos. Solo algunos neuropéptidos pueden cruzar la barrera hematoencefálica por difusión transmembranal, sistema de transporte saturable bidireccional o unidireccional (Barrera y cols, 1987, Barrera y cols 1991). El primer neuropéptido RFamida descrito fue el tetrapéptido cardioexcitatorio del molusco *Macocallista nimbosa*, (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) y se le denominó RFamida por su secuencia de aminoácidos (Arg-Phe-NH₂) en el extremo carboxilo terminal (Price y Greenberg, 1977). El tetrapéptido fue descrito solamente en moluscos, sin embargo existen péptidos en mamíferos relacionados a RFamida, denominados FARPs (*FMRFamide related peptides*), y conocidos comúnmente como péptidos RFamida. Diferentes genes producen precursores de péptidos RFamida, los precursores sufren escisiones y generan péptidos bioactivos (Bechtold y cols, 2007). Sus funciones fisiológicas son variadas y son péptidos que se conservan entre los mamíferos (Darmer y cols, 1991). Los péptidos RFamida en mamíferos están divididos en cinco familias:

a) Familia PrRP

La familia PrPR (*prolactin releasing peptide*) está formada por dos miembros, PrRP-20 y PrRP-31. Los péptidos PrRP son producidos en las neuronas del núcleo del tracto solitario y la médula ventral lateral y dorsomedial del hipotálamo. Las funciones que se han descrito para los péptidos PrPR son: estimulación en la liberación de prolactina *in vivo* (Taylor y cols, 2001), regulación de factores pituitarios como oxitocina, de hormonas hipotalámicas como la liberadora de corticotropina, folículo estimulante y la hormona luteinizante (Maruyama y cols, 1999, Samson y cols, 2004). Además los péptidos PrRP ejercen efectos anorexigénicos cuando son inyectados intracerebroventricularmente (Leighton y cols, 2001). Los efectos de los péptidos PrRP son mediados por un receptor acoplado a proteína G denominado GPR10.

b) Familia LPXRF

La familia LPXRF se conforma de dos representantes RFRP-1 (RFamide Related Peptide-1) y RFRP-2, ambos son expresados por las neuronas del núcleo dorsomedial y paraventricular del hipotálamo y en la médula espinal. Estos péptidos actúan a través de los receptores NPFF1 y NPFF2, los cuales son los receptores putativos de la familia NPFF. Sus funciones son neuroendocrinas; participa en la percepción de estímulos nociceptivos y en la modulación del dolor (Bechtold y cols, 2007).

c) Familia de la kisspeptina

Los miembros descritos para esta familia son la metastina y la kisspeptina-10, son expresados en el hipotálamo, en la médula espinal, hipocampo, amígdala y cerebro medio. Tienen un receptor acoplado a proteína G, conocido comúnmente como GPR54. Sus funciones incluyen la inhibición de la migración de células cancerígenas provocado por metastina (Ohtaki y cols, 2001). La kisspeptina tiene un papel importante en la secreción de gonadotropinas y en la maduración y cambios producidos en la pubertad (Bechtold y cols, 2007). No ejercen efectos sobre la ingesta alimenticia o por lo menos no en ratas (Thompson y cols, 2004).

d) Familia NPFF

Formada por los neuropéptidos NPFF, NPAF, NPSF y NPVF se expresan principalmente en neuronas del núcleo del tracto solitario, médula lateral ventral, y núcleo paraventricular del hipotálamo. Sus receptores son acoplados a proteína G y se denominan NPFF1 y NPFF2. Las funciones de la familia NPFF comprenden la modulación de la analgesia inducida por opioides (Yang y cols, 1985., Dong y cols, 2001) y la contracción cardiovascular (Allard y cols, 1995). Además los péptidos NPAF, NPFF, y NPSF tienen propiedades anorexigénicas cuando se inyectan centralmente en ratas, ratones (Kavaliers, 1985, Murase y cols, 1996, Bechtold y cols, 2007) y pollos (Cline y cols, 2007). Resultados de nuestro laboratorio mostraron que los péptidos NPAF, NPFF, y NPSF producen efectos antiadipogénicos en células 3T3-F442A dependientes de la concentración. Los tres neuropéptidos también bloquearon la diferenciación adiposa de preadipocitos

humanos normales y derivados de lipoma. El efecto antiadipogénico de los neuropéptidos NPFF, NPAF y NPSF fue ligado a una sobreexpresión de Id3, factor transcripcional antiadipogénico. Además se encontró que el neuropéptido NPAF inhibe la adipogénesis de forma irreversible en las células 3T3-F442A (Herrera-Herrera y Salazar-Olivo, 2008).

e) Familia QRFP

Los péptidos QRFP (*pyroglutamylated-arginine-phenylalanine amide peptide*), se denominan así debido a que su extremo N-terminal inicia con el ácido piroglutámico y su extremo C-terminal tiene el motivo Arginina-Fenilalanina-amida. Son producidos principalmente en el núcleo ventromedial y lateral del hipotálamo y en la médula espinal de mamíferos (Chartrel y cols, 2003). QRFP es la forma de prohormona y sufre cortes mediados por convertasas que reconocen sitios ricos en arginina y lisina (FIGURA 1), generándose así los péptidos 43RFamida, 26RFamida y el fragmento 26RFamida₍₂₀₋₂₆₎ de 43, 26 y 6 aminoácidos respectivamente (Jiang y cols, 2003., Chartrel y cols, 2006., Nillni E 2007). El péptido 26RFamida fue aislado por primera vez en ranas y ha sido clonado en humanos, ratas, ratones y pollos (Chartrel y cols, 2003). El receptor de QRFP es conocido como GPR103 (G protein-coupled receptor 103) y es expresado principalmente en el hipotálamo (Jiang y cols 2003., Fukusumi y cols, 2003). Una característica importante de GPR103 es que muestra alta homología con las secuencias de los receptores NPFF2 (que unen a NPAF y NPFF), Y-Y2 (que une al neuropéptido Y) y GAL-R1 (que une a galanina). Todos estos ligandos juegan

papeles importantes en la regulación de la ingesta alimenticia (Bonini y cols, 2000). Desde el descubrimiento de los péptidos QRFP se reportó que inyectados intracerebroventricularmente producen efectos orexigénicos (Chartrel y cols, 2003, Takayasu y cols, 2006), incrementan la actividad locomotora (Primeaux y cols, 2008) y aumentan el gasto energético y el ritmo cardíaco (Takayasu y cols, 2006). El péptido 26RFamida favorece la liberación de la hormona GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) que estimula la liberación de LH (*luteinizing hormone*), por lo que 26RFamida favorece la maduración gonadal durante la edad reproductiva en ratas (Navarro y cols, 2006). La preproteína QRFP está presente en el hipotálamo en aproximadamente 6 pg/mg, pero esta concentración varía de acuerdo al ayuno, masa corporal y el contenido energético de la dieta (Beck y Richy, 2009). La expresión de QRFP se suprime en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (55% de grasas) y a su vez aumenta la concentración de leptina plasmática, y las dietas bajas en grasas (5% de grasas) aumentan la expresión de QRFP con disminución de leptina (Beck y Richy, 2009). Los valores de QRFP presentan los mayores picos durante el ayuno, característica compartida por todos los péptidos con actividad orexigénica (Takayasu y cols, 2006, Beck y cols, 2003). Entonces, la expresión de QRFP en hipotálamo es modulable.

1.6 Mecanismos de acción de péptidos RFamida y características de sus receptores

Los mecanismos de acción de los péptidos RFamida incluyen receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por actuar a través de segundos

mensajeros. Estos receptores contienen siete dominios transmembranales hidrofóbicos y su secuencia N-terminal es extracelular en tanto que la porción C-terminal es intracelular (Jackson y cols, 1991). La unión de los neuropéptidos RFamida a su receptor metabotrópico provocan un cambio conformacional que activa una proteína intracelular (proteína G) unida al receptor, desencadenando reacciones intracelulares que transducen el mensaje a través de segundos mensajeros (Bechtold y cols, 2007). Los péptidos RFamida difieren en la secuencia N-terminal; ello podría ser determinante para el reconocimiento de su receptor y para sus múltiples funciones cardiovasculares, modulatorias de la contracción muscular, de balance hídrico, actividades neuroendocrinas y neuromoduladoras (Dockray 2004, Fukusumi y cols, 2006).

El tejido adiposo ha emergido como un órgano endócrino de gran importancia en la regulación de diversos procesos homeostáticos. Se sabe que algunos neuropéptidos con actividad sobre la ingesta alimenticia son producidos también en el tejido adiposo y afectan directamente su funcionamiento. Aunque se sabe que los neuropéptidos QRFP son orexigénicos a nivel central en diversas especies, (Dockray, 2004) se ignora si ejercen efectos periféricos. Conocer los mecanismos hipotalámicos y periféricos de los péptidos QRFP aportará datos importantes sobre los mecanismos de control del balance energético y la acumulación lipídica de células grasas. Por ello nuestro trabajo evaluó el efecto de los neuropéptidos QRFP sobre la adipogénesis *in vitro* y analizó la expresión de QRFP y su receptor en la línea celular 3T3-F442A y en depósitos grasos de ratas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Neuropéptidos usados

Los neuropéptidos 43RFamida de rata (r43RFa), 26RFamida de rata (r26RFa), 26RFamida de humano (h26RFa) y los fragmentos de rata 26RFamida 1-16 (r26RFa₁₋₁₆) y 26RFamida 20-26 (r26RFa₂₀₋₂₆) usados en este trabajo fueron donados por los Profesores Manuel Tena-Sempere (Universidad de Córdoba, España), Hubert Vaudry y Jerome Leprince (Universidad de Rouen, Francia). Las secuencias de los péptidos se indican en la Tabla 1. Los neuropéptidos se reconstituyeron en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) adicionada con 0.5 g/l de albúmina de suero de bovino y se almacenaron a -20°C en alícuotas hasta su uso. Cada alícuota se usó luego de una sola descongelación.

2.2 Cultivo celular

Los preadipocitos 3T3-F442A se inocularon (1×10^4 células/pozo) en placas de cultivo de 24 pozos (Corning Glass Works) con medio L15 adicionado con 10% de suero de ternera (HyClone) (medio basal; MB). Luego de 48 horas con MB, ensayamos el efecto de concentraciones determinadas de neuropéptidos QRFP en medio adipogénico (MA): L-15 suplementado con 10% de suero fetal de bovino (HyClone), 5 µg/ml de Insulina, 10 mM de D-biotina, 0.5 g/l de D-glucosa. Usamos como control negativo medio no adipogénico (MNA): L-15, 4% de suero de gato (donado por el Dr. Walid Kuri Harcuch, CINVESTAV, México), 5 µg/ml de Insulina, 10 mM de D-biotina, 0.5 g/l de D-glucosa. Las concentraciones mencionadas de los péptidos QRFP también fueron probadas en medio libre de suero (MLS): L-15, 0.05 g/l de albúmina de suero de bovino, 2 µM de solución con 5 mg/ml de

transferrina y 1.2 μM de triyodotironina, 0.01 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 5 $\mu\text{g}/\text{m}$ de insulina, 10 mM de D-biotina, 0.5g/l de D-glucosa. Como control positivo, en experimentos con MLS, se usó medio con suero (MLSA): L15 suplementado con 10% suero fetal de bovino, 2 μM de solución con 5 mg/ml de transferrina y 1.2 μM de triyodotironina, 0.01 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Insulina, 10 mM de D-biotina, 0.5 g/l de D-glucosa. Mantuvimos los cultivos celulares a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 10 días con cambio de medio cada tercer día.

2.3 Cuantificación de la diferenciación adiposa

La diferenciación adiposa en células 3T3-F442A se estimó por cuantificación de la acumulación lipídica intracelular con la técnica de rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). Las monocapas celulares fueron fijadas con formaldehído en PBS al 4% y se incubaron con la solución saturada de rojo oleoso O (Sigma Chem) durante 48 horas a temperatura ambiente. Se extrajo el colorante retenido en las monocapas celulares y se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 510 nm. Los tratamientos control fueron medio adipogénico que representó el 100% de acumulación lipídica y el medio no adipogénico que representó el 0%. La acumulación lipídica de los tratamientos se determinó mediante la fórmula:

$$\textit{Diferenciación adiposa} (\%) = \frac{\textit{AbsT} - \textit{AbsMNA}}{\textit{AbsMA} - \textit{AbsMNA}} (100) \uparrow$$

En donde AbsT corresponde a la absorbencia del tratamiento de interés, AbsMNA es la absorbencia del tratamiento no adipogénico o control negativo y AbsMA es la absorbencia del tratamiento adipogénico.

2.4 RT-PCR

Las muestras de RNA se extrajeron de cultivos de células 3T3-F442A en cuatro estadios de la diferenciación adiposa: preadipocitos preconfluentes, confluentes, adipocitos inducidos con MA por 48 horas y adipocitos maduros. También se obtuvieron muestras de cerebro y grasas de epiplón, epidídimo, perirenal y subcutánea (inguinal) de 6 ratas macho Wistar, de 2 meses de edad (adquiridas del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM de Juriquilla, Querétaro). Las ratas fueron mantenidas con alimento y agua *ad libitum* durante 3 días desde su llegada, luego fueron sacrificadas por asfixia con CO₂. El RNA total de las muestras se obtuvo mediante el método de TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La retro-transcripción requirió de *random hexamers* (Invitrogen) como oligonucleótidos y transcriptasa reversa M-MLV (Promega). 6 µg de RNA total se usaron para la síntesis de cDNA. El volumen por reacción de PCR fue 25 µl y cada reacción contuvo 1 µg de cDNA, 150 nM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de cada dNTP, 1.0 unidades de Taq-DNA polimerasa en un amortiguador (1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20mM Tris-HCl). Las condiciones de PCR para identificar QRFP y GPR103 (TABLA 2), comprendieron una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos y 38 ciclos, etapa de alineamiento de 62.6 °C para GPR103 y de 65 °C para QRFP, finalmente la extensión se realizó a 72 °C durante 1 minuto. Los productos de amplificación se

analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1x y se tiñeron con bromuro de etidio (1µg/ml). Las imágenes se analizaron en el fotodocumentador ChemiDoc EQ (Bio Rad), con el programa Quantity One (Bio Rad).

2.5 Western blot

Las muestras provenientes de células 3T3-F442A y de tejidos de 6 ratas macho fueron lavados con PBS y solubilizados con buffer de lisis RIPA (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% de deoxicolato de sodio, 2.5 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de beta glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptina) y con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Las concentraciones de proteína fueron cuantificadas con espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. 50 µg de proteína total de cada muestra fueron mezcladas con amortiguador de muestra (75 mM Tris-HCl, 15% sulfato duodecil de sodio (SDS), 5% de β-Mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.001% de azul de bromofenol) a razón de 1:4 (v/v). Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (HyBond Amersham Biosci). Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con una solución de leche libre de grasas al 5% en TBS-T (Tris base 100 Mm pH 8, NaCl 1.5 M y Tween 20 al 0.5%) e incubamos durante toda la noche con el anticuerpo primario GAPDH (Santa Cruz Biotech) con dilución 1:200, o bien, con el anticuerpo QRFP (Phoenix lab) diluido 1:500 y fueron incubadas a 4°C toda la noche. La transferencia de proteínas se confirmó mediante tinciones con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% p/v; ácido acético

5%). Se removió el colorante de Ponceau de las membranas con lavadas de 10 minutos con TBS-T. Finalmente se incubaron las membranas durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (IgG anti-conejo SIGMA). Se retiró el exceso de anticuerpo secundario de las membranas con lavadas con TBS-T. Finalmente, se reveló la membrana con el sistema de quimioluminiscencia ECL-PLUS (G.E. Healthcare) y se detectaron las bandas inmunoreactivas. Los marcadores usados para determinar el tamaño de las bandas fueron marcadores de peso molecular pre-teñidos Precision Plus (Bio-Rad).

2.7 Análisis estadístico

Los valores experimentales son el resultado de la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía, prueba de t-Student no pareada y prueba de Dunnet's. El nivel de $P \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Los péptidos QRFP favorecen la acumulación lipídica en las células 3T3-F442A. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que los péptidos RFamida NPSF, NPAF y NPFF, anorexigénicos hipotalámicamente, ejercen además efectos antiadipogénicos en las células 3T3-F442A de ratón y en preadipocitos subcutáneos humanos (Herrera-Herrera y Salazar-Olivo, 2008). Los péptidos RFamida de la familia QRFP son orexigénicos a nivel central (Navarro y cols, 2006, Primeaux y cols, 2008) pero se desconoce si ejercen algún efecto directo sobre el tejido adiposo. Para evaluar este último aspecto nosotros ensayamos el efecto de los péptidos QRFP r43RFa, r26RFa, h26RFa, r26RFa₍₁₋₁₆₎ y r26RFa₍₂₀₋₂₆₎ sobre la adipogénesis de las células 3T3-F442A. Luego de 10 días de tratamiento con medio adipogénico las células mostraron un alto grado de acumulación lipídica. Tal acumulación lipídica fue marcadamente incrementada por la adición de 1 μ M de los péptidos ensayados. r43RFa estimuló la acumulación lipídica en 183% respecto al control adipogénico, r26RFa lo hizo en 208%, h26RFa en 323% y los fragmentos r26RFa₍₁₋₁₆₎ y r26RFa₍₂₀₋₂₆₎ en 230% y 291% respectivamente (FIGURA 2). Nuestros resultados muestran que los péptidos QRFP, orexigénicos a nivel hipotalámico, estimulan la acumulación lipídica de las células adiposas actuando directamente sobre éstas. Estos resultados sugieren que los neuropéptidos QRFP podrían ser un nuevo elemento mediante el cual el hipotálamo regula la lipogénesis en las células de los depósitos grasos.

3.2 El neuropéptido r26RFa estimula la acumulación lipídica de forma dosis-dependiente. Para evaluar a mayor detalle el potencial proadipogénico de QRFP, probamos el efecto de diferentes concentraciones de r26RFa sobre la proliferación y la acumulación lipídica de células 3T3-F442A. Para ello, primero determinamos que las concentraciones de r26RFa por ensayar no afectan la proliferación o la supervivencia de las células 3T3-F442A. Como se muestra en la FIGURA 3, las concentraciones 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μ M no afectaron la proliferación celular ni la supervivencia de los preadipocitos 3T3-F442A a lo largo de 7 días. Se ensayó el efecto proadipogénico de las concentraciones anteriormente señaladas del neuropéptido r26RFa y se indujo un incremento en la acumulación lipídica de las células en orden de 123%, 159%, 154%, 168% y 209% respectivamente (FIGURA 4) lo que prueba que el efecto proadipogénico de r26RFa es favorecido a medida que aumenta la concentración del péptido. Cuando se inyectan intracerebroventricularmente los péptidos 26RFa (Chartrel y cols, 2003) y el 43RFa (Primeaux y cols, 2008) se favorece la ingesta alimenticia también a medida que aumentan las concentraciones de los mismos. Por tanto los efectos hipotalámicamente y periféricamente son dependientes de la concentración.

3.3 El péptido r26RFa no tiene actividad adipogénica intrínseca sobre las células 3T3-F442A. La adipogénesis de las células 3T3-F442A depende de factores séricos denominados genéricamente “Factores adipogénicos”, cuya naturaleza es pobremente conocida (Kuri-Harcuch y Green, 1978). Tales factores adipogénicos inducen el compromiso a la diferenciación terminal de los preadipocitos 3T3-F442A mediante la reprogramación génica durante las primeras

48 horas de quiescencia proliferativa de estas células. El efecto proadipogénico de los neuropéptidos QRFP plantea la posibilidad de que éstos funcionen como uno de tales factores adipogénicos que regulan la diferenciación terminal de los adipocitos 3T3-F442A. Para evaluar esta posibilidad, estudiamos el efecto proadipogénico de diferentes concentraciones de r26RFa en preadipocitos 3T3-F442A mantenidos en un medio libre de suero que no induce la diferenciación adiposa de estas células. Nuestros resultados muestran que r26RFa no favoreció significativamente la acumulación lipídica de las células 3T3-F442A (FIGURA 5), ya que sólo produjo entre el 12% y 16% de acumulación lipídica, y no representaron valores estadísticamente significativos ni dependientes de la concentración. Los resultados obtenidos sugieren que el péptido r26RFa no posee propiedades adipogénicas intrínsecas y por tanto requiere de componentes presentes en suero para ejercer sus efectos proadipogénicos. Ciertos factores como la hormona de crecimiento son capaces de favorecer la acumulación lipídica en un medio libre de suero (Morikawa y cols, 1984). La presencia de hormona de crecimiento 25 ng/ml en nuestro MLS produjo hasta 41% de diferenciación adiposa, respecto al MLS (datos no mostrados). Por tanto, la falta de efectos proadipogénicos de r26RFa en MLS no fueron provocados por la disfuncionalidad del medio, sino por la ausencia en este péptido de una capacidad adipogénica propia. Futuros experimentos sobre la expresión génica en presencia de los péptidos QRFP, permitirán aclarar el mecanismo de acción por el cual estos péptidos estimulan la acumulación lipídica en células adiposas.

3.4 Los mRNA para QRFP y su receptor GPR103 se expresan en preadipocitos 3T3-F442A. Para determinar si el efecto proadipogénico del péptido r26RFa sobre las células 3T3-F442A es mediado por el receptor GPR103, analizamos la expresión del mRNA de GPR103 en diferentes etapas de la diferenciación adiposa de células 3T3-F442A. Nuestros resultados mostraron que el mRNA de GPR103 es expresado únicamente en preadipocitos proliferantes de 3T3-F442A, pero no en preadipocitos quiescentes, preadipocitos inducidos a diferenciación, ni en adipocitos maduros (FIGURA 6). Estos resultados sugieren que el efecto proadipogénico de r26RFa sobre las células 3T3-F442A podría ser mediada por un receptor diferente de GPR103. Se sabe que GPR103 comparte alta identidad con otros receptores como NPY1, el receptor del neuropéptido Y, con GAL1, el receptor de galanina, así como con NPFF1 y NPFF2, los receptores del neuropéptido NPFF. Se sabe también que los efectos centrales de QRFP y NPFF pueden ser parcialmente bloqueados por un antagonista de NPY1, lo que sugiere un alto grado de promiscuidad para receptores y ligandos de péptidos RFa (Zajac y cols, 2006., Gouarderes y cols, 2007). La expresión del mRNA de QRFP en esta línea celular y encontramos que preadipocitos proliferantes expresan el mRNA de QRFP (FIGURA 6). Aunque los mRNAs de QRFP y GPR103 se expresan en la etapa preadiposa de células 3T3-F442A, QRFP no afecta de ningún modo la proliferación de esta línea celular (FIGURA 3).

3.7 Los mRNAs de QRFP y GPR103 se expresan en depósitos grasos de ratas. Debido a que la línea celular 3T3-F442A es un modelo de adipogénesis que solo se aproxima a la fisiología *in vivo*, es necesario analizar la expresión de

QRFP y GPR103 directamente de depósitos grasos. Trabajos previos documentaron la secreción de neuropéptidos por el tejido adiposo, como el neuropéptido Y, que es orexigénico a nivel central y proadipogénico periféricamente (Kuo y cols, 2007, Kos y cols, 2007). Por ello analizamos por RT-PCR la expresión de los mRNAs de QRFP y GPR103 en cerebro y depósitos grasos de epiplón, tejido epididimal, perirenal y subcutáneo de ratas Wistar alimentadas *ad libitum*. Nosotros encontramos que todos los depósitos grasos analizados expresaron el mRNA de QRFP y que el mRNA de GPR103 se expresó en grasa epididimal, perirenal y epiplón pero no en grasa subcutánea (FIGURA 7). Nuestros resultados sugieren que QRFP podría participar endocrina y/o autocrinamente en el proceso de adipogénesis de estos depósitos grasos.

3.8 Los depósitos grasos de rata producen la proteína de QRFP en grasas.

Para confirmar la presencia de la proteína de QRFP evaluamos la expresión de la proteína QRFP por western blot en los depósitos grasos y en la línea celular 3T3-F442A. Nosotros encontramos que los preadipocitos proliferantes de 3T3-F442A no expresan la proteína QRFP. En cambio, todos los depósitos grasos analizados expresaron la proteína QRFP. (FIGURA 8A). Interesantemente, el cerebro expresó muy baja cantidad de proteína QRFP, aun cuando la calidad de proteína de cerebro fue adecuada (FIGURA 8B), ello puede deberse al régimen alimenticio *ad libitum* que tenía la rata y es que la expresión de QRFP en el cerebro es alta durante el ayuno y prácticamente nula en animales recién alimentados (Beck y cols, 2009). Nuestras ratas tuvieron acceso *ad libitum* a los alimentos incluso unos minutos antes a su sacrificio, por lo que la falta de ayuno pudo influir en la

expresión de QRFP. Por otra parte, la expresión de la proteína QRFP en los tejidos adiposos muestra que QRFP es un nuevo elemento neuroendocrino expresado por tejido adiposo que pudiera influir en la adipogénesis de forma autocrina o endocrina. Entonces nosotros planteamos que la señal de QRFP se produce de forma complementaria en tejido adiposo e hipotálamo, ello es que la secreción en hipotálamo favorece el apetito y periféricamente estimula la acumulación de lo ingerido en forma de grasa, es decir periféricamente es proadipogénico. Además QRFP podría tener una expresión modulada por el tipo de dieta, del mismo modo que en hipotálamo (Beck y Richy, 2009). Experimentos futuros nos permitirán conocer con más detalle si la expresión de QRFP en los depósitos grasos varía con el tipo de dieta.

III. CONCLUSIONES

Los neuropéptidos r43RFa, h26RFa, r26RFa, r26RFa₍₁₋₁₆₎ y r26RFa₍₂₀₋₂₆₎ estimularon la acumulación lipídica de células 3T3-F442A mantenidas en condiciones adipogénicas hasta en 300%. Además el efecto de r26RFa es dependiente de la concentración, ya que 1 μ M de r26RFa favorece una mayor acumulación lipídica que las concentraciones de 0.1 nM, 1nM, 10 nM, o 100 nM. El efecto proadipogénico de r26RFa en presencia de medio adipogénico es modulable según la concentración del mismo. Ninguna de las concentraciones usadas de r26RFa son citotóxicas o citostáticas.

Sin embargo, estos péptidos no parecen tener actividad proadipogénica intrínseca, dado que r26RFa no estimuló la acumulación lipídica cuando se ensayó en un medio libre de suero. Nuestros resultados también sugieren que el efecto de los neuropéptidos QRFP sobre la acumulación lipídica de células 3T3-F442A es mediado por un receptor diferente a GPR103, dado que este receptor se presenta únicamente en estado preadiposo y no en adipocitos de esta línea celular. Otros receptores como NPY1, NPFF1 o Gal1 podrían mediar los efectos de QRFP debido a su alta identidad con GPR103. Los depósitos grasos subcutáneo inguinal, epididimal, perirenal y epiplón de ratas Wistar alimentadas *ad libitum* expresaron los mRNAs de QRFP y GPR103. Los depósitos grasos analizados también expresaron la proteína QRFP. Nosotros proponemos a QRFP como un nuevo elemento neuroendocrino que es expresado en tejido adiposo y pudiera tener actividad endocrina o autocrina. Sin embargo, más experimentos son necesarios para identificar la función exacta de QRFP en los depósitos grasos y en el proceso de adipogénesis.

IV. REFERENCIAS

- Allard M, Labrousche S, Nosjean A, Laguzzi R. 1995. Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPY in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 274:577-83.
- Atkinson T. 2008. Central and peripheral neuroendocrine peptides and signalling in appetite regulation: considerations for obesity pharmacotherapy. *Obes rev* 9:108-20.
- Barnea M, Zechara M, Oren F. 2009. High-fat diet delays and fasting advances the circadian expression of adiponectin signaling components in mouse liver. *Endocrinology* 150:161-8.
- Barrera C, Kastin A, Banks W. 1987. D-(Ala¹)-peptide T-amide is transported from blood to brain by a saturable system. *Brain Res Bull* 19:629-33.
- Barrera C, Kastin A, Fasold M, Banks W. 1991. Bidirectional saturable transport of LHRH across the blood-brain barrier. *Am J Physiol* 261:E312-8.
- Bartness T, Song C. 2007. Brain-adipose tissue neural crosstalk. *Physiol Behav* 91:343-51.
- Bechtold D, Luckman S. 2007. The role of RFamide peptides in feeding. *J Endocrinol* 192:3-15.
- Beck B, Musse N, Stricker K. 2002. Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long Evans rats. *Biochem Biophys Res Commun* 292:1031-35.
- Beck B, Richy A. 2003. Ghrelin and body weight regulation in the obese Zucker rat in relation to feeding state and dark/light cycle. *Exp Biol Med* 228:1124-31.
- Beck B, Richy S. 2009. Suppression of QRFP 43 in the hypothalamic ventromedial nucleus of long-Evans rats fed a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 383:78-82.
- Bonini J., Kenneth A. Jones, Nika Adham, Carlos Forray, Roman Artymyshyn, Margaret M. Durkin, Kelli E. Smith, Joseph A. Tamm, Lakmal W. Boteju, Parul P. Lakhlani, Rita Raddatz, Wen-Jeng Yao, Kristine L. Ogozalek, Noel Boyle, Evguenia V. Kouranova, Yong Quan, Pierre J. Vaysse, John M. Wetzel, Theresa A. Branchek, Christophe Gerald and Beth Borowsky. 2000. Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem* 275:39324-31.
- Bowers R, Festuccia W, Song C, Shi H, Migliori R, Bartness T. 2001. Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R1167-75.
- Brown R, Imran S. 2008. Wilkinson M. KiSS-1 mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Mol Cell Endocrinol* 281:64-72.

- Chaldakov G, Toncher A, Aloe L. 2009. NGF and BDNF: from nerves to adipose tissue, from neurokines to metabokines. *Riv Psichiatr* 44:79-87.
- Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Régo JC, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain JC, Vaudry H. 2003. Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Ann N Y Acad Sci* 100:15247-52.
- Cline M, Nandar W, Rogers J. 2007. Central neuropeptide FF reduces feed consumption and affects hypothalamic chemistry in chicks. *Neuropeptides* 41:433-9.
- Darmer D, Schmutzler C, Diekhoff D, Grimmelikhuijzen CJ. 1991. Primary structure of the precursor for the sea anemone neuropeptide Antho-RFamide (less than Glu-Gly-Arg-Phe-NH₂). *Ann N Y Acad Sci* 88:2555-9.
- Dockray GJ. 2004. The expanding family of RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol* 89:229-35.
- Dong X, Han S, Zylka M, Simon M, Anderson D. 2001. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell* 106:619-32.
- Erdman J, Lippl F, Schusdziarra V. 2003. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 116:101-7.
- Erlanson-Albertsson. 2005. Appetite regulation and energy balance. *Acta Paediatric Suppl* 94:40-1.
- Farmer Stephen. 2008. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev* 22:1397-409.
- Fonseca M, Takada J, Alonso M, Lima F. 2007. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr* S192-203.
- Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S. 2006. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 27:1073-86.
- Gouarderes C, Mazarguil H, Mollereau C, Chartrel N, Leprince J, Vaudry H, Zajac JM. 2007. Functional differences between NPFF1 and NPFF2 receptor coupling high intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of (35S) GTP gamma binding. *Neuropharmacology* 52:376-86.
- Hausman G, Barb C, Dean R. 2008. Patterns of gene expression in pig adipose tissue: insulin-like growth factor system proteins, neuropeptide-Y, NPY receptors, neurotrophic factors. *Domest Anim Endocrinol* 35:24-34.

- Havel P. 2004. Update on adipocyte hormones –regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53:S143-51.
- Herrera-Herrera M, Salazar Olivo. 2008. RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 377:29-34.
- Hillebrand J, Wied D, Adan R. 2002. Neuropeptides, food intake, and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23:2283-306.
- Hirsh J, Leibel R, Chua S. 1992. A clinical perspective on peptides and food intake. *Am J Clin Nutr* 55:296S-8S.
- Jackson, T. 1991. Structure and function of G protein coupled receptor. *Pharmacology* 50:425-42.
- Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Laverty M, Murgolo N, Vassileva G, Zeng M, Laz T, Behan J, Qiu P, Wang L, Wang S, Bayne M, Greene J, Monsma F Jr, Zhang FL. 2003. Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* 278:27652-7.
- Kavaliers M, Hirst M. 1985. FMRFamide, a putative endogenous opiate antagonist: evidence from suppression of defeat-induced analgesia and feeding in mice. *Neuropeptides* 6:485-94.
- Kos K, Harte A, James S David R. Snead, Joseph P, O'Hare, Philip G. McTernan, Kumar S. 2007. Secretion of neuropeptide Y in human adipose tissue and its role in maintenance of adipose tissue mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1335-40.
- Kuo G, Kitlinska J, Tilan J, Li L, Baker S, Johnson M, Lee E, Burnett M, Fricke S, Kvetnansky R, Herzog H, Zukowska Z. 2007. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 803-811.
- Kuri-Harcuch y Green H. 1978. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6107-9.
- Leibowitz S, Wortley K. 2004. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25:473-504.
- Leighton J, Caroline J, Small S, Dhillon W, Stanley S, Abbot C, Ghatei M, Bloom S. 2001. PRL-releasing peptide inhibits food intake in male rats via the dorsomedial hypothalamic nucleus and not the paraventricular hypothalamic nucleus. *Endocrinology* 142:4236-43.
- Majdic G. 2009. Integrative role of brain and hypothalamus in the control of energy. *Acta Chim Slov* 56: 289–96.

- Maruyama M, Matsumoto K, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M, Higuchi T, Inoue K. 1999. *Neurosci Lett*. 276:193-6.
- Morikawa M, Green H, Lewis U. 1984. Activity of human Growth hormone and related polypeptides on the adipose conversion of 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 228-31.
- Murase T, Arima H, Kondo K, Oiso Y. 1996. Neuropeptide FF reduces food intake in rats. *Peptides* 17:353-4.
- Navarro V, Fernandez F, Nogueiras R, Vigo S, Tovar S, Chartrel N, Le Marec, Leprince J, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Vaudry H, Sempere T. 2006. Novel role of 26RFa, a hypothalamic RFamide orexigenic peptide, as putative regulator of the gonadotropic axis. *J Physiol* 573:237-49.
- Nilni E. 2007. Regulation of prohormone convertases in hypothalamic neurons: implications for prothyrotropin releasing hormone and proopiomelanocortin. *Endocrinology* 148:4191-200.
- Ohtaki T, Shintani Y, Hondas. 2001. Metastasis suppressor gene KISS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-7.
- Peelman F, Waelput W, Iserentant H, y cols. 2004. Leptin: Linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog Lipid Res* 43:283-301.
- Perello M, Spinedi E. 2004. Aspectos neuroendocrinos de la obesidad. *Medicina* 64:257-64.
- Price D, Greenberg M. 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* 197:670-1.
- Primeaux S, Blackmon C, Barnes M, Braymer H, Bray G. 2008. Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides* 29:1994-2000.
- Ramirez-Zacarias, J, Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O. *Histochemistry* 97:493-7.
- Romero M, Fernandez J, Esteve M, Alemany M. 2009. Different modulation by dietary restriction of adipokine expression in White adipose tissue sites in the rat. *Cardiovasc Diabetol* 8:42.
- Samson W, Keown C, Samson C, Samson H, Lane B, Baker J, Taylor M. 2004. Prolactin-releasing peptide and its homolog RFRP-1 act in hypothalamus but not in anterior pituitary gland to stimulate stress hormone secretion. *Endocrine* 20: 59-66.

- Seboek D, Linscheid P, Zulewski H, Langer I, Christ-Crain M, Keller U, Müller B. 2004. Somatostatin is expressed and secreted by human adipose tissue upon infection and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4833-9.
- Secretaría de Salud de México. Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria: Estrategia contra el sobrepeso la obesidad (ANSA). Primera edición 2010. http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/ANSA_acuerdo_original.pdf
- Secretaría de Salud de México. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). 2006. <http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>
- Small C, Bloom S. 2004. Gut hormones and the control of appetite. *Trends Endocrinol Metab* 15:259-63.
- Stricker-Krongrad, Cumin F, Burlet C, Beck B. 1998. Hypothalamic neuropeptide-Y and plasma leptin after long term high-fat feeding in the rat. *Neuroscience* 254:157-160.
- Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, Iguchi H, Kawasawa YI, Ikeda Y, Sakakibara I, Ohno K, Ioka RX, Murakami S, Dohmae N, Xie J, Suda T, Motoike T, Ohuchi T, Yanagisawa M, Sakai J. 2006. A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci* 103:7438-43.
- Taylor M, Samson W. 2001. The prolactin releasing peptides RFamide peptides. *Cell. Mol. Life Sci* 58:1206-15.
- The World Health Organization. Obesity and overweight, 2005. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
- Thompson E, Patterson M, Murphy K, Smith K, Dhillo W, Todd J, Ghatei M, Bloom S. 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 16:850-8.
- Trayhurn P. 2005. Endocrine and signaling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Act Physiol Scan* 184: 285-93.
- Trayhurn P, Bing C, Wood I. 2006. Adipose tissue and adipokines-energy regulation from the human perspective. *J Nutr* 136:1935-39.
- Yang H, Fratta W, Majane E, Costa E. 1985. Isolation, sequencing, synthesis and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc. Natl Acad Sci* 82:7757-61.
- Zajac J, Mollereau C. 2006. RFamide peptides Introduction. *Peptides* 27:941-2.

V. PIES DE FIGURAS

FIGURA 1. Representación esquemática del precursor QRFP en humano, bovino, rata y ratón. Los sitios de escisión son representados con las líneas verticales. Las letras K y R representan a lisina y a arginina respectivamente. Tomado de Chartrel y cols, 2006.

FIGURA 2. Los neuropéptidos QRFP estimulan la acumulación lipídica de los adipocitos 3T3-F442A. Preadipocitos 3T3-F442A preconfluentes se indujeron a diferenciación adiposa con medio adipogénico suplementado con 1 μ M de los neuropéptidos señalados. Luego de 10 días de tratamiento las células se fijaron con 4% de formaldehído y la acumulación lipídica de los distintos tratamientos se cuantificó con el método de rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías y cols, 1992). Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes y por triplicado cada uno. MA (medio adipogénico) es el control positivo y representa el 100%, MNA (medio no adipogénico) equivale al 0% de diferenciación adiposa. Las letras minúsculas representan diferencia significativa ($p \leq .05$) mediante ANOVA de una vía y prueba de Dunnet's

FIGURA 3. El neuropéptido r26RFa no afecta la proliferación celular de los preadipocitos 3T3-F442A. Preadipocitos 3T3-F442A preconfluentes se inocularon en cajas de cultivo de 35 mm (1.0×10^4 células por pozo) con MB. Un día después, los cultivos se realimentaron con MB suplementado con las diferentes concentraciones de r26RFa. La densidad celular se determinó en los días

señalados mediante recuentos celulares en un hematímetro. La figura representa el valor promedio \pm DE de dos experimentos independientes por duplicado. Las letras minúsculas representan diferencia significativa ($p \leq .05$) mediante ANOVA de una vía.

FIGURA 4. El efecto proadipogénico del neuropéptido r26RFa depende de su concentración. Cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación adiposa con MA suplementado con las concentraciones indicadas de r26RFa. Luego de 10 días las células se fijaron con 4% de formaldehído y se cuantificó la acumulación lipídica por el método de rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías y cols, 1992). La figura representa el valor promedio \pm DE de cuatro experimentos independientes por duplicado. Las letras minúsculas representan diferencia significativa ($p \leq .05$) mediante ANOVA de una vía.

FIGURA 5. El neuropéptido r26RFa no estimula la acumulación lipídica en un medio de cultivo libre de suero. Preadipocitos 3T3-F442A (1.5×10^4 células/ pozo) preconfluentes se indujeron a diferenciación adiposa con MLS suplementado con las concentraciones señaladas de r26RFa. Luego de 10 días las células se fijaron con 4% de formaldehído y la acumulación lipídica se cuantificó con el método de rojo oleoso O (Ramírez-Zacarías y cols, 1992). Los valores representan el promedio \pm DE de cuatro experimentos independientes y por triplicado cada uno. Las letras minúsculas representan diferencia estadística significativa ($p \leq .05$) mediante ANOVA de una vía.

FIGURA 6. Los mRNAs codificantes de QRFP y de su receptor se expresan en los preadipocitos de células 3T3-F442A. RT-PCR de preadipocitos 3T3-F442A en proliferación (PP), quiescentes (PQ), adipocitos inducidos (AI) y adipocitos maduros (AM). El control positivo fue cDNA de cerebro de rata Wistar y el control de carga β -Actina. El experimento fue realizado por triplicado.

FIGURA 7. Los mRNAs codificantes de QRFP y GPR103 se expresan en depósitos grasos de rata. RT-PCR de la expresión de los mensajeros QRFP y GPR103 de 4 tejidos grasos de rata; epiplón, grasa epididimal, perirenal y subcutánea. El control positivo fue cDNA de cerebro de rata Wistar de la misma condición y el control de carga fue β -Actina. El experimento fue realizado por duplicado.

FIGURA 8. La proteína QRFP es expresada en depósitos grasos de rata alimentada *ad libitum*. (A) Extractos de proteína fueron aislados de cerebro, de 4 depósitos grasos de rata; epiplón, epidídimo, perirenal y subcutánea y de células 3T3-F442A; preadipocitos proliferantes (PP), quiescentes (PQ), adipocitos inducidos (AI) y adipocitos maduros (AM). 50 microgramos de cada extracto fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, transferidos a membranas de nitrocelulosa y analizados por western blot. El sistema de detección consistió de anticuerpo conjugado a peroxidasa de conejo y se identificó la banda de 13 kD correspondiente al tamaño de QRFP por quimioluminiscencia. Se usó proteína de cerebro como control positivo. La figura (B) muestra una tinción de Coomassie para confirmar la Integridad de la proteína de los diferentes

depósitos grasos de rata y de las células 3T3-F442A. Los experimentos fueron repetidos por duplicado.

TABLA 1: Neuropéptidos QRFP utilizados en el presente trabajo

Péptido	Especie	Secuencia	Peso molecular (grs/mol)
r43RFa	Rata	EDSGSEATGFLPTDSEKASGPLGLTAEELSSYSRRKGGFSFRF-NH ₂	4553.9
r26RFa	Rata	ASGPLGLTAEELSSYSRRKGGFSFRF-NH ₂	2820.21
h26RFa	Humano	TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH ₂	2833.21
r26RFa₍₁₋₁₆₎	Rata	ASGPLGLTAEELSSYS	1581.7
r26RFa₍₂₀₋₂₆₎	Rata	GGFSFRF-NH ₂	815.9

* Secuencias obtenidas de los artículos Chartrel y cols 2003, Fukusumi y cols, 2003, Jiang y cols, 2003.

TABLA 2: Oligonucleótidos diseñados para RT-PCR

Mrna	ESPECIFICIDAD	SECUENCIA (5' - 3')	TAMAÑO DE PRODUCTO (PB)
QRFP	Rata, ratón	Fw. CCA CAG ACA TCG GTG ACA TC Rv. CTC CCT AGA CGG AAG CCA GT	160
GPR103	Humano, rata y ratón	Fw. CGC ACC GTC ACC AAC ATC TT Rv. GGC AGG AGG AAG AGG ATG AC	450

* Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa Fast PCR y OLIGO 4.1, la especificidad fue probada con alineamientos de secuencias en NCBI.

VI. FIGURAS

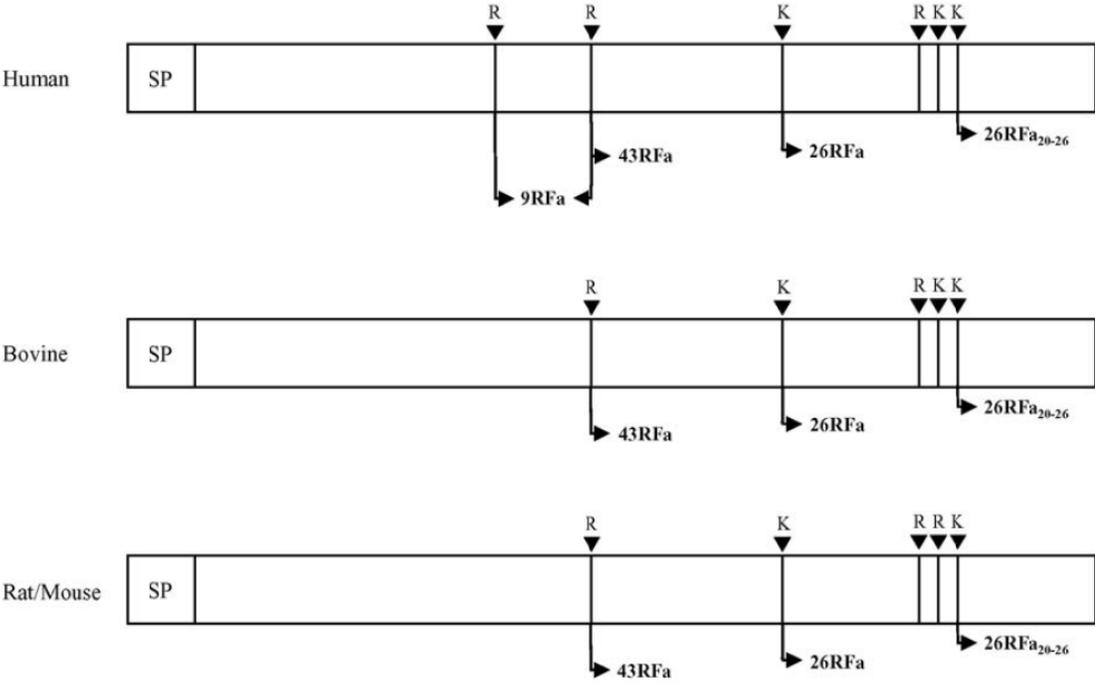


FIGURA 1

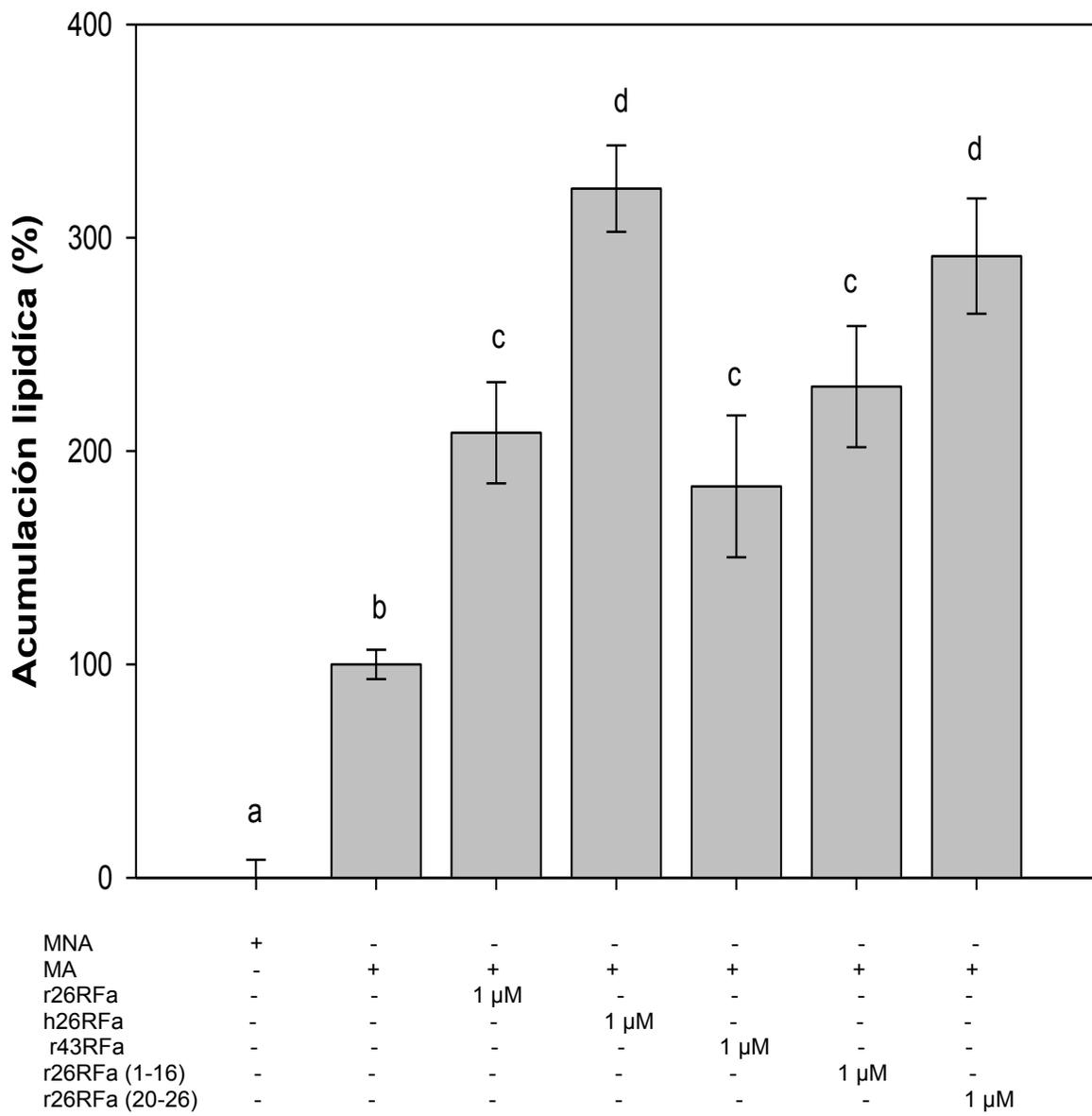


FIGURA 2

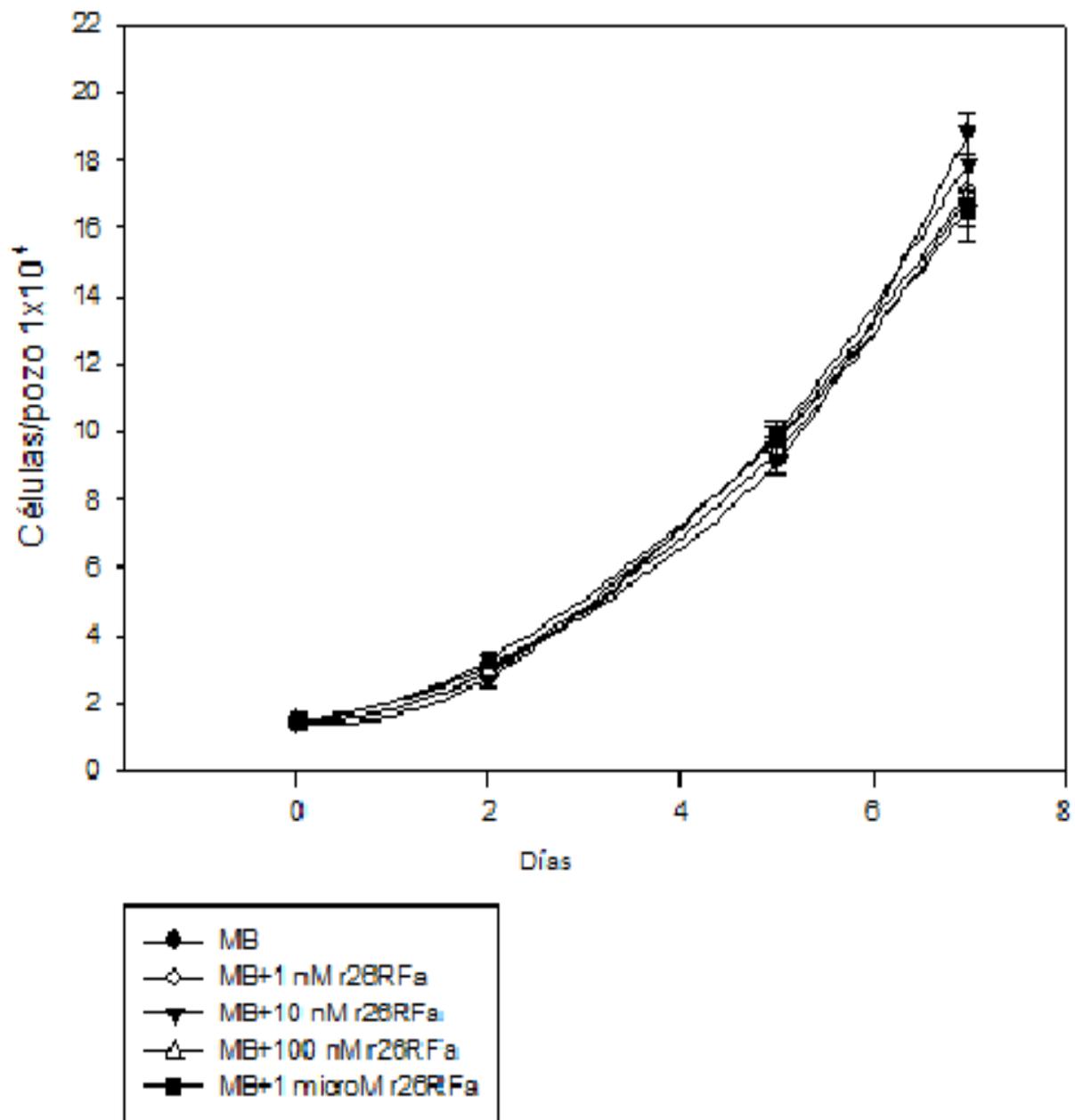


FIGURA 3

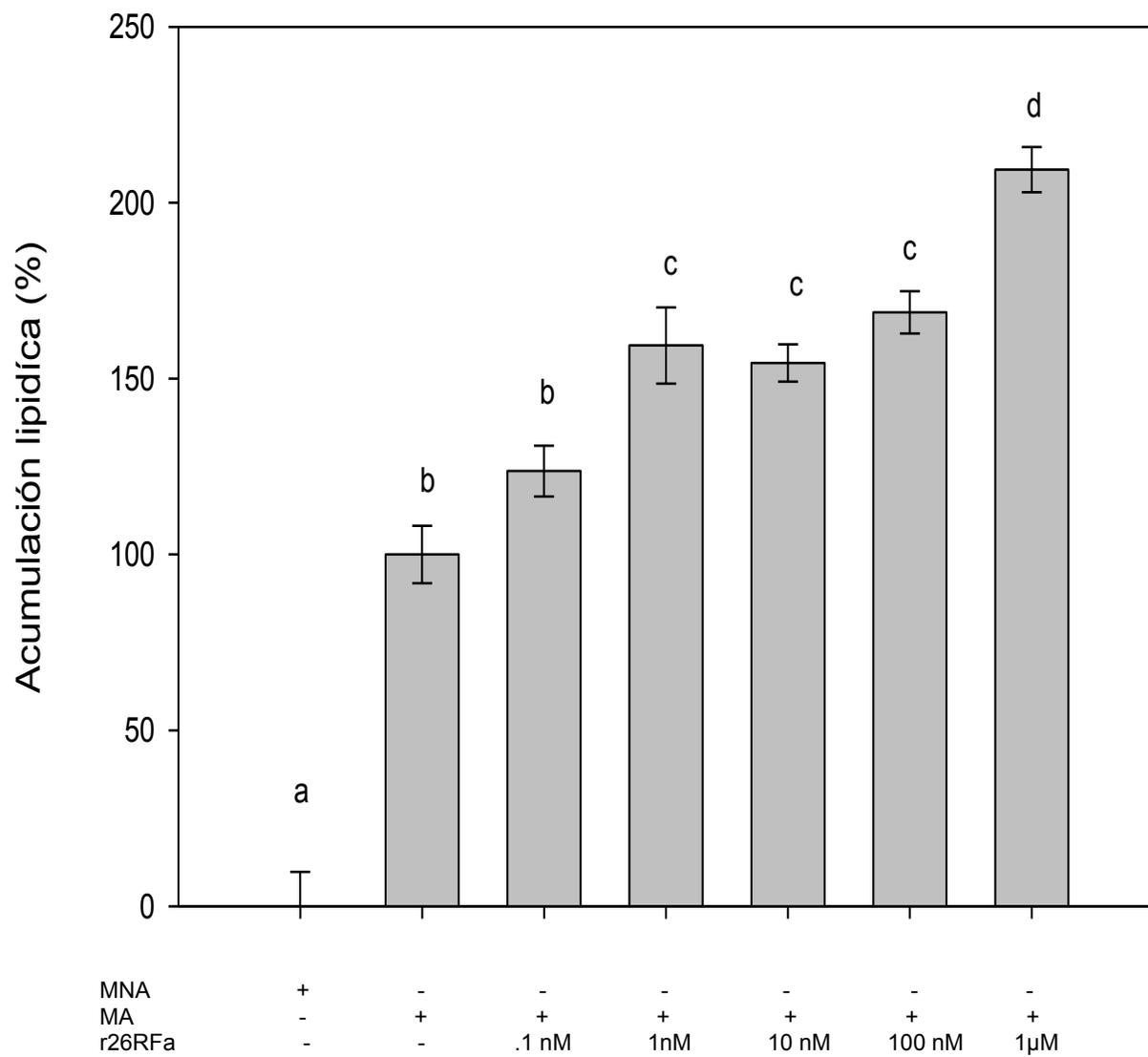


FIGURA 4

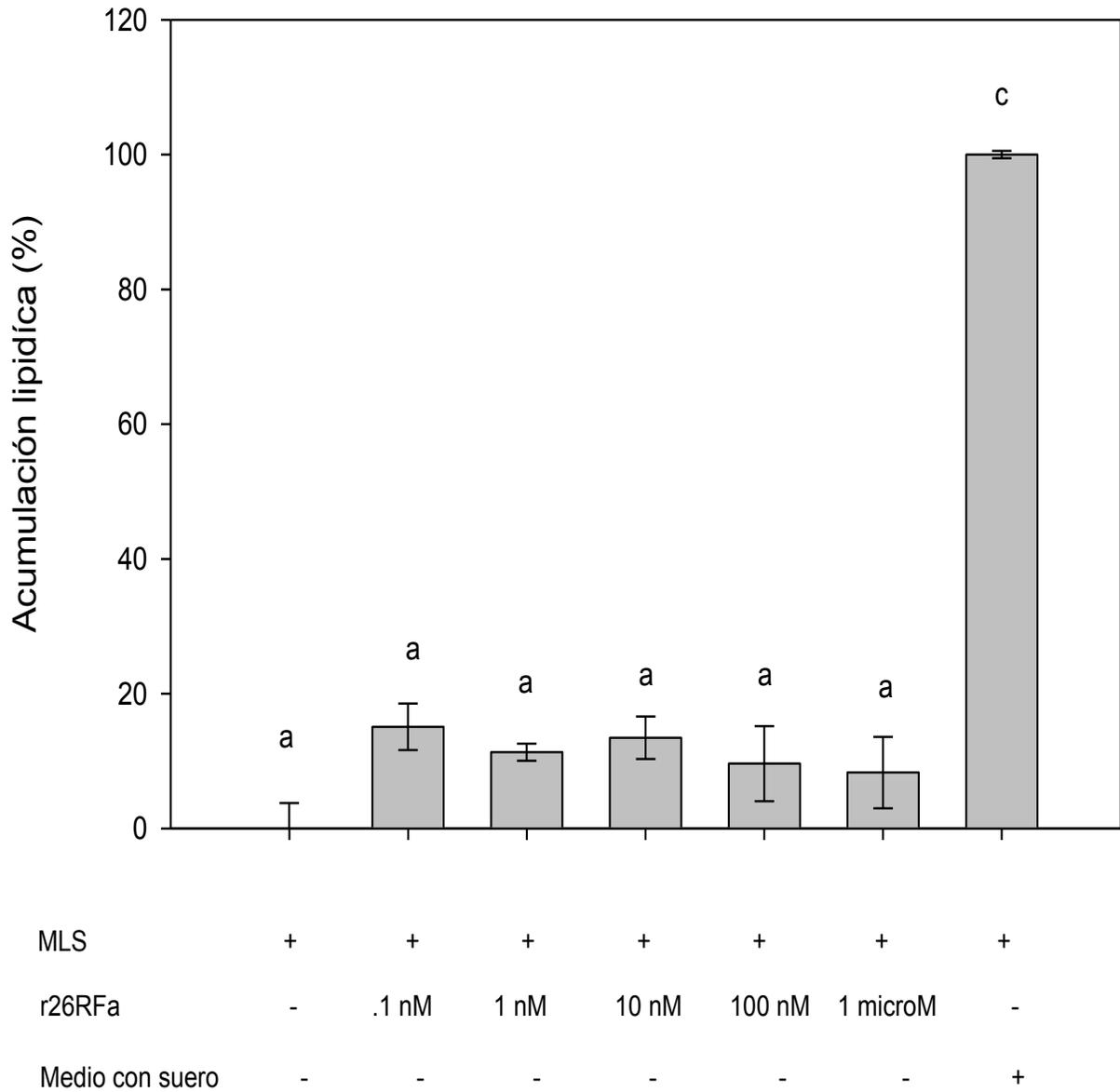


FIGURA 5

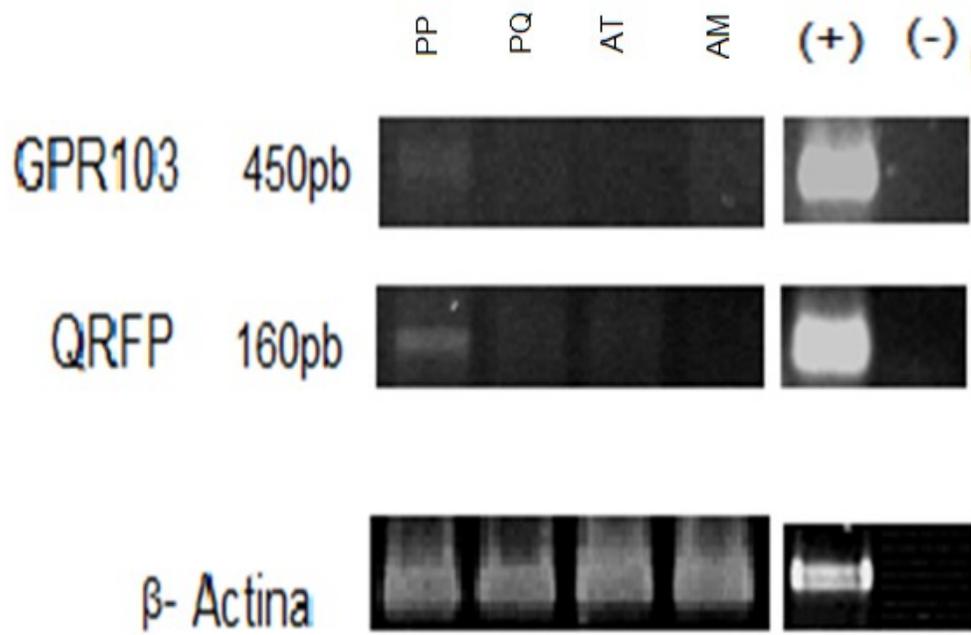


FIGURA 6

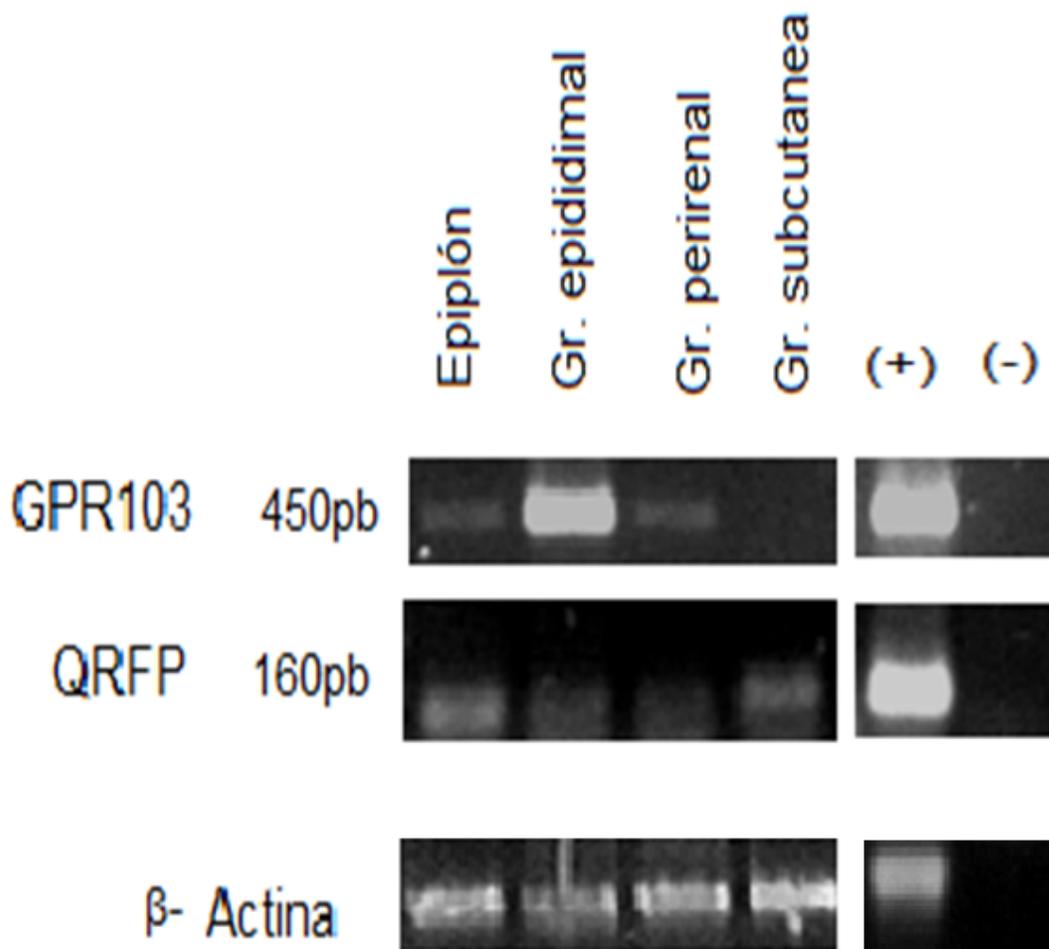


FIGURA 7

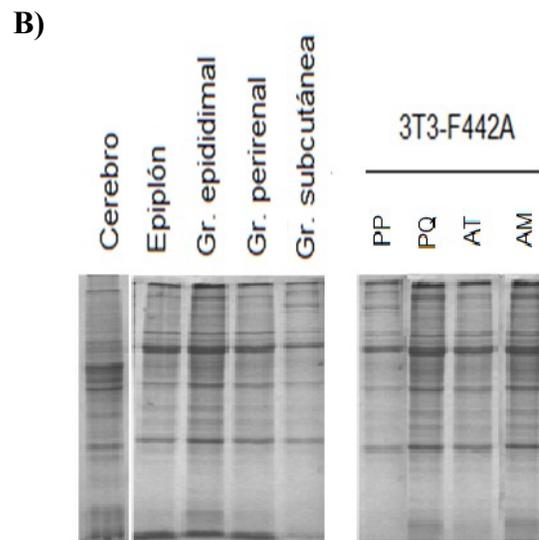
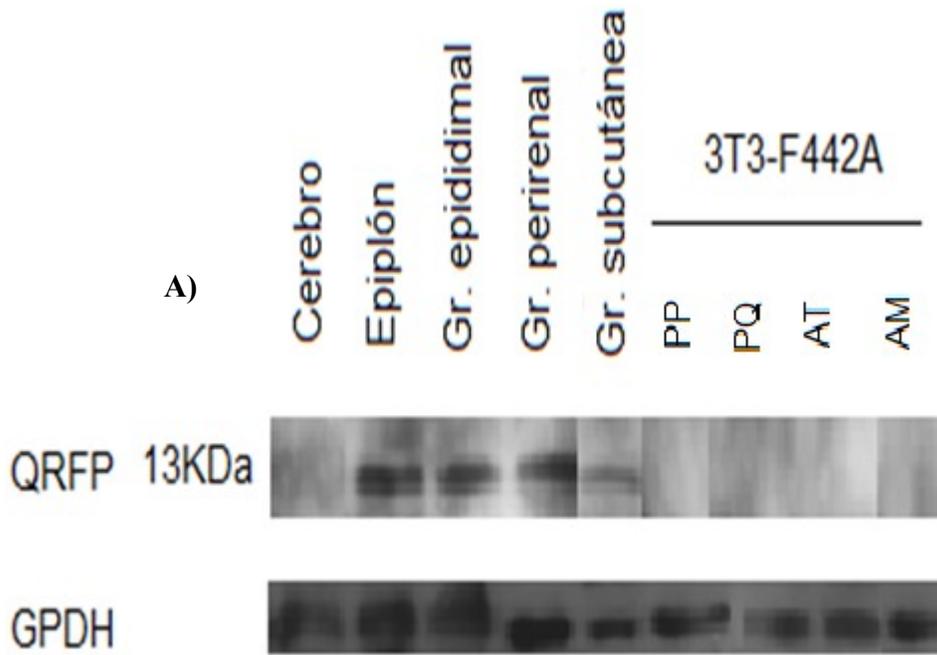


FIGURA 8

