



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**ADIPOGÉNESIS EN MAMÍFEROS: SU INHIBICIÓN POR
NEUROPEPTIDOS RFamida Y UNA ESTRATEGIA MÁS EFICIENTE
PARA EL CULTIVO DE PREADIPOCITOS HUMANOS**

Tesis que presenta

Mireya Liliana Herrera Herrera

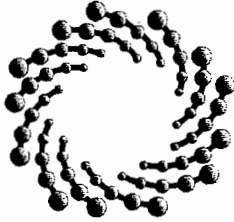
Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis

Dr. Luis Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., Octubre de 2008



IPICYT

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS

La tesis "**Adipogénesis en mamíferos: su inhibición por neuropéptidos RFamida y una estrategia más eficiente para el cultivo de preadipocitos humanos**" presentada para obtener el Grado de de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mireya Liliana Herrera Herrera** y aprobada el **16 de Octubre de 2008** 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. Walid Kuri Harcuch

Dr. Edgar P. Heimer

Dr. Rubén López Revilla

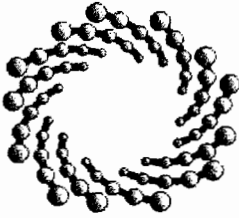
Dr. Luis Salazar Olivo



CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se realizó en la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Salazar Olivo y fue financiada parcialmente por CONACYT (2004-C01-45804).

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. de registro 172319).



IPICYT

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 017 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 24 días del mes de octubre del año 2008, se reunió a las 13:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|---|------------------------|------------------|
| Dr. Walid Kuri Harchuch | Presidente | CINVESTAV |
| Dr. Rubén López Revilla | Secretario | IPICYT |
| Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera | Sinodal externo | UNAM |
| Dr. Luis Antonio Salazar Olivo | Sinodal | IPICYT |

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mireya Liliana Herrera Herrera

sobre la Tesis intitulada:

Adipogénesis en mamíferos: su inhibición por neuropéptidos RFamida y una estrategia más eficiente para el cultivo de preadipocitos humanos

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 14:30 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 24 días del mes de octubre de 2008.

L.C.C. Ivonne Lizbeth Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedico esta tesis principalmente a mis hijos DANIEL y DIEGO, por el sacrificio callado e incondicional, son la luz de mi vida y por ustedes he hecho todo hasta ahora y siempre. Los amo pequeños.

A mi esposo HUGO: por apoyarme, acompañarme, por confiar en mí y sobre todo por estar conmigo siempre. Te amo baby.

A mis papás JUAN y LUPITA: por su apoyo, comprensión y confianza en cada uno de los pasos que he dado. Lo que soy se los debo todo.

A mis hermanos VEROCAS, GÜERA y JUANITO por su tiempo para escuchar y por todo el apoyo que me han brindado. Somos un equipo.

Gracias por todo los amo.

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS A DIOS POR TODO

A mi asesor el Dr. Luis Salazar por cada una de sus enseñanzas y consejos.

A los Drs. Rubén López Revilla, Carlos Barajas, Ángel Alpuche, Sergio Casas y Gerardo Argüello, por sus asesorías.

A Rebeca Mejía, a Claudia Silva y a Cytllalic Rangel por su amistad, apoyo, conocimientos y colaboración en el laboratorio.

Al apoyo técnico de Ing. Cytllalic Rangel, Biol. Mireya Sánchez, Q.F.B. Rosalba Castillo , Dr. José Romo Yañez y Tec. Rosa Espinosa Luna.

Gracias.

CONTENIDO

ADIPOGÉNESIS EN MAMÍFEROS: SU INHIBICIÓN POR NEUROPEPTIDOS RFamida Y UNA ESTRATEGIA MÁS EFICIENTE PARA EL CULTIVO DE PREADIPOCITOS HUMANOS

| | |
|--|-----|
| Hoja de aprobación de la tesis | i |
| Créditos Institucionales | iii |
| Acta de examen | iv |
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| 1. Resumen | x |
| 2. Abstract | xi |
| 3. Introducción general | 1 |
| Parte 1. Efecto de los neuropéptidos RFamida sobre adipogénesis | 1 |
| <i>El tejido adiposo es regulado por el sistema nervioso</i> | 2 |
| <i>Aspectos generales de los neuropéptidos</i> | 3 |
| <i>Neuropéptidos RFamida</i> | 6 |
| <i>Mecanismos de acción de los neuropéptidos RFamida</i> | 7 |
| <i>Propiedades funcionales de los neuropéptidos</i> | 10 |
| Parte 2. Estrategias de cultivo para el crecimiento y diferenciación de preadipocitos de ratón y humano | 13 |
| <i>Aspectos generales del cultivo de células adiposas</i> | 13 |
| <i>Medio de cultivo L15</i> | 14 |
| <i>Usos del medio L15</i> | 14 |
| 4. Resultados y conclusiones | 16 |
| 5. Referencias | 20 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|---|
| 1 Clasificación tentativa de los neuropéptidos..... | 5 |
| 2. Comparación de la estructura primaria de los péptidos RFamida..... | 8 |

ANEXOS

| | |
|---|----|
| Artículos publicados | 32 |
| Anexo 1. RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.071 | 32 |
| Anexo 2. Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human preadipocytes for translational applications. <i>Cytotherapy</i> . En prensa | 33 |

1. RESUMEN

Esta tesis está estructurada en dos partes para facilitar el análisis de los resultados y se centra en dos diferentes aspectos de la adipogénesis: el efecto de los neuropéptidos RFamida y el cultivo de adipocitos de ratón y humano.

Parte 1. Efecto de los neuropéptidos RFamida sobre adipogénesis

El metabolismo energético y el tejido adiposo son regulados estrechamente por el sistema nervioso. Los neuropéptidos RFamida NPFF y NPAF alteran la expresión génica en los adipocitos 3T3-L1 terminalmente diferenciados, pero se desconoce su papel en la adipogénesis. Aquí mostramos que los neuropéptidos RFamida NPFF, NPAF y NPSF inhiben la diferenciación de los preadipocitos 3T3-F442A en función de su concentración, pero no afectan la adipogénesis de la línea celular relacionada 3T3-L1. Así mismo, los tres neuropéptidos bloquean la diferenciación de preadipocitos humanos subcutáneos normales y derivados de lipoma. La inhibición de la adipogénesis por los neuropéptidos RFamida es simultánea a la sobreexpresión de Id3, un factor de transcripción que previene la diferenciación adiposa. NPAF bloquea de manera irreversible el establecimiento del compromiso a la diferenciación terminal en los preadipocitos 3T3-F442A. Esto hace a NPAF un inhibidor único y útil para el estudio del compromiso a la diferenciación adiposa terminal.

Parte 2. Estrategias de cultivo para el crecimiento y diferenciación de preadipocitos de ratón y humano

Con el medio L15 logramos mejores tasas de proliferación y de diferenciación para preadipocitos humanos subcutáneos que con DMEM-F12, el medio tradicionalmente usado en estos cultivos. El medio L15 también permite mejores condiciones de cultivo para los preadipocitos 3T3 de ratón.

Conclusiones. Nuestros resultados confirman que los neuropéptidos RFamida generados en el sistema nervioso central regulan el desarrollo del tejido adiposo, siendo NPAF un inhibidor único debido a su capacidad irreversible para prevenir el compromiso de los preadipocitos. Además, proporcionan una técnica mejorada para la diferenciación adiposa y explora técnicas de cultivo de célula humanas troncales derivadas del tejido adiposo humano para usos biotecnológicos.

2. ABSTRACT

This thesis is constructed in two reports to facilitate the analysis of the results and its investigation is based on two different aspects of the adipogenesis: the effect of the neuropeptides RFamide and culture of murine and human preadipocytes.

Part 1. Effect of the neuropeptides RFamide on adipogenesis

Energetic and adipose metabolism are regulated by the nervous system. RFamide neuropeptides NPF and NPAF affect gene expression of terminally differentiated 3T3-L1 adipocytes but their role on adipogenesis is unknown. Here we show that neuropeptides NPF, NPAF and NPSF inhibit differentiation of 3T3-F442A preadipocytes in a concentration-dependent manner but do not affect 3T3-L1 differentiation. All three neuropeptides also block adipose differentiation of normal and lipoma-derived human subcutaneous preadipocytes. Inhibition by RFamide neuropeptides is associated to overexpression of the Id3 gene which encodes a transcription factor that anticipates adipose differentiation. Since inhibition of adipogenesis by NPAF was not arrested after removal of the neuropeptide and further incubation of 3T3 cells with adipogenic medium, this neuropeptide appears to irreversibly block the commitment to terminal differentiation in 3T3-F442A preadipocytes. These results make NPAF a unique inhibitor to study commitment to adipose terminal differentiation.

Part 2. Culture techniques for growth and differentiation of murine and human preadipocytes

To improve the culture of primary human adipocytes we tested the L15 medium which does not require a special atmosphere. With this medium we achieved better rates of proliferation and differentiation for primary human subcutaneous preadipocytes and 3T3 murine preadipocytes than with the traditionally used DMEM-F12 medium.

Conclusions

Our results confirm that RFamide neuropeptides generated in the central nervous system regulate the development of adipose tissue system among which NPAF is unique due to its ability to irreversibly prevent preadipocyte commitment, and provide an improved technique for adipocyte differentiation and to explore biotechnological applications of human stromal adipose cell cultures.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

La investigación que aquí se presenta está dividida en dos partes, y cada una de ellas abordan el estudio de la adipogénesis desde diferentes ángulos, por lo que siguen su propia lógica, técnicas de investigación y presentación de resultados. El primer trabajo está centrado en caracterizar los efectos de los neuropéptidos RFamida sobre la diferenciación in Vitro de los preadipocitos de ratón y humano. Y el segundo fue resultado de la búsqueda de estrategias más simples para el cultivo de preadipocitos humanos.

Parte 1 Efecto de los neuropéptidos RFamida sobre adipogénesis

El estudio del tejido adiposo es importante por tres aspectos relevantes para la salud. Primero, por la naturaleza endócrina del tejido adiposo, ya que hasta hace algunos años este tejido fue considerado como un mero almacén de energía en forma de grasa. Motivado en gran medida por el descubrimiento de la leptina (hormona producida y liberada principalmente por este tejido), se ha puesto de manifiesto que el tejido adiposo blanco produce una gran variedad de moléculas (Gullicksen et al. 2003). Estas moléculas modulan procesos fisiológicos tales como la maduración sexual y la reproducción, el crecimiento, la presión arterial, la homeostasis, la inflamación, etc. además del metabolismo energético, por lo que actualmente se considera al tejido adiposo como un órgano endócrino (Gullicksen et al. 2003). El segundo aspecto importante para el estudio del tejido adiposo, es que agencias como la Organización Mundial de la Salud (OMS), reconocieron la existencia de niveles epidémicos de obesidad de carácter mundial (<http://www.who.int/archives/inf-pr-1997/en/pr97-46.html>) y se le considera como una pandemia desde finales de siglo XX. Un informe de la OMS (<http://www.who.int/en/>) advierte que en México hay 32 millones de adultos con sobrepeso y obesidad, de los cuales cinco millones están en riesgo de convertirse en pacientes diabéticos en los próximos cinco años. Esta pandemia de obesidad afecta a todos los grupos demográficos, incluyendo a los niños (Martorell et al. 1998; Taubes 1998) y no es privativa de los países desarrollados. Debido a esto,

se ha optado por combatir a la obesidad con estrategias correctivas como el desarrollo de programas de control de peso o de alimentos dietéticos (Colditz 1992). El hecho de que estas estrategias para enfrentar los crecientes índices de obesidad no hayan funcionado, sugiere que la solución del problema requiere mayor investigación (Wickelgren 1998).

Un aspecto adicional para el estudio del tejido adiposo es que en los últimos años se le ha reconocido como una fuente promisoría de células troncales, que poseen la capacidad de diferenciarse in vitro en diferentes linajes celulares: osteocitos, adipocitos, miocitos y condrocitos, cuando son tratados con factores específicos del linaje a establecer (Zuk et al. 2001). Estas células también pueden ser infectadas con alta eficiencia por adenovirus, oncoretrovirus y vectores lentivirales. De este modo, el tejido adiposo por su propiedad de plasticidad o transdiferenciación, representa una fuente potencial de células para la medicina regenerativa, y proporciona un nuevo reservorio de células madre adultas para la investigación y aplicaciones clínicas. Todos estos aspectos nos llevan ineludiblemente, a realizar mayor investigación básica y a la búsqueda de protocolos más simples que aseguren la expansión, mantenimiento y diferenciación de las células adiposas de ratón y humano con alta capacidad clonogénica.

Una estrategia ampliamente usada para estudiar el desarrollo del tejido adiposo es el análisis de los mecanismos de acción de compuestos que afectan la diferenciación de las células adiposas. Es por ello que en este proyecto de investigación se buscó en primera instancia estudiar moléculas que afecten el desarrollo y funcionamiento del tejido adiposo.

El tejido adiposo es regulado por el sistema nervioso

El metabolismo energético y el desarrollo del tejido adiposo son fuertemente influenciados por el sistema nervioso. Así como el tejido adiposo produce o sintetiza moléculas que actúan sobre diferentes tejidos, también existen moléculas provenientes de otros tejidos que actúan sobre él. El sistema nervioso ejerce diversas funciones sobre el tejido adiposo, como la estimulación de la lipólisis que

favorece la movilización de los triglicéridos y su participación en la regulación de la distribución de la grasa corporal. Esto lo hace a través de la innervación simpática (Bowers et al. 2004) y parasimpática (Fliers et al. 2003), por los efectos del neurotransmisor postganglionar primario, norepinefrina (Bartness y Bamshad, 1998) que actúa a través de los receptores beta adrenérgicos estimulando la lipólisis y la movilización de lípidos (Carpene et al. 1998).

Numerosos estudios han mostrado que el sistema nervioso central monitorea la composición corporal y ajusta la ingesta y el consumo de energía para estabilizar la masa total del tejido adiposo (Weigle y Kuijper, 1996). Asimismo, se ha propuesto que neuropéptidos liberados por el sistema nervioso periférico podrían modular la homeostasis de la glucosa, antagonizando la acción de la insulina (Koopmans et al. 1998). Tales neuropéptidos afectarían de esta manera el metabolismo y el desarrollo del tejido adiposo. La participación neural en el desarrollo y funcionamiento del tejido adiposo ha sido enfatizada por la acumulación de grasa en músculos de pacientes con distrofia muscular de Duchenne (Cullen y Mastaglia. 1980) y distrofia muscular de Emery-Dreifuss (Fishbein et al. 1993). Ambas afecciones implican la degeneración de las fibras del sistema nervioso periférico en los órganos afectados. Estos resultados sugieren que el tejido nervioso periférico regula el desarrollo del tejido adiposo, probablemente mediante la producción de factores tróficos que afectarían positiva o negativamente la diferenciación de las células precursoras de adipocitos (preadipocitos) en adipocitos maduros.

Diversos factores neurales que afectan el tejido adiposo no han sido estudiados detalladamente (Turtzo y Lane 2002), y los avances en esta investigación probablemente ampliarán nuestro conocimiento sobre las enfermedades como hiperlipidemia, lipodistrofia y diabetes mellitus tipo 2.

Aspectos generales de los neuropéptidos.

Los neuropéptidos (de Wied et al. 1969, Kastin et al. 1979) son pequeñas proteínas neurales co-expresadas en el sistema nervioso como transmisores clásicos u hormonas (la Hökfelt 1991, Lundberg 1996). Inicialmente se pensó que

los neuropéptidos actuaban sólo sobre tejido nervioso, pero hoy en día se sabe que son un instrumento de la comunicación entre el sistema nervioso central y los órganos periféricos. Los neuropéptidos son denominados por la secuencia de su estructura (por ejemplo, neuropéptido Y) o por su primera función descrita (el péptido de liberación de gastrina), aún cuando más tarde se demuestre que están implicados en diversas funciones. Los neuropéptidos se agruparon inicialmente según el sitio de origen, pero esto se complicó, ya que la mayoría de los neuropéptidos son encontrados en diversos órganos. Una clasificación tentativa de los neuropéptidos se muestra en la Tabla 1.

Las moléculas precursoras de los neuropéptidos funcionales son por lo general de gran tamaño y contienen una o varias copias del mismo o diferentes péptidos activos. Por ejemplo, la pro-opiomelanocortina (POMC) contiene secuencias que dan lugar a diversos neuropéptidos bioactivos: hormona α , β y γ estimuladora de melanocitos (MSH) y además secuencias de lipoproteína- β , adrenocorticotropina (ACTH) y endorfina- β (Acher 1980). Durante la evolución han ocurrido cambios menores atribuidas a la duplicación génica, que ha dado como resultado secuencias diferentes del mismo péptido en especies diferentes. Acher (1980) describió la evolución de vasopresina y oxitocina, dos neuropéptidos que evolucionaron a partir del mismo precursor. La primera duplicación génica causó la generación de dos péptidos distintos con actividades diferentes: vasopresina y oxitocina. Las siguientes duplicaciones causaron diferencias menores en las secuencias de anfibios, reptiles y mamíferos. Es importante mencionar que aún cuando el péptido sea sumamente homólogo entre especies diferentes, los receptores por lo general demuestran tener menor grado de homología: la vasopresina es idéntica en la rata y en humano, pero sus receptores en estas especies tienen sólo el 50 % de homología (Hoyle 1999). Moléculas de gran peso molecular e hidrofóbicas, como los neuropéptidos, tienen dificultad para penetrar la barrera hematoencefálica. Algunos neuropéptidos sin embargo, pueden cruzar la barrera por difusión transmembranal (Banks y Kastin 1985), como sucede con la vasopresina, o por sistema de transporte saturable bidireccional (Barrera et al. 1991) o unidireccional (Barrera et al. 1987).

Tabla 1 Clasificación tentativa de los neuropéptidos

| FAMILIA | PEPTIDOS Y ABREVIACIONES | SIMILITUD EN ESTRUCTURA | REFERENCIA | |
|--|---|-------------------------|--|---|
| Péptido tipo bombesina | Bombesina | | Varvarigou et al 2004 | |
| | Péptido liberador de Gastrina | GRP | | |
| | Neuromedina B | NMB | | |
| | Rantesina | | | |
| Opioides endógenos | Proencefalina | | 3 genes: tamaño similar y posición de intrones, 6 cisteinas cerca del extremo N-terminal | |
| | Prodinorfina | | | |
| | Pro-opiomelanocortina | POMC | | |
| Péptido relacionado con el gen de calcitonina | Calcitonina | CT | CGRP desarrollado por splicing alternativo de CT | |
| | Péptido del gen relacionado con calcitonina | CGRP | | |
| Colecistocinina | Colecistocinina | CCK | C-terminal GWDMF | Eng et al. 1982 |
| Péptidos hipotalámicos | Oxitocina | OXY | CYXQNCPXG-NH ₂ | |
| | Vasopresina | VP | | |
| Péptidos relacionados a hipotálamo | Hormona liberadora de Corticotropina | CRH | - | Heinrichs et al 1993 Spina et al 1996; Legradi et al 1998. |
| | Hormona liberadora de la hormona de crecimiento | GHRH | | |
| | Hormona liberadora de la hormona luteinizante | LHRH | | |
| | Hormona liberadora de tiotropina | TSHRH | | |
| Factores de crecimiento tipo insulina | Insulina | | - | Rotwein 1991 |
| | Factor de crecimiento tipo insulina | GHRH | | |
| | Relaxina | | | |
| Neurotensina | Neuromedina | | C-terminal PYIL | Luttinger et al 1982 |
| | Neurotensina | NT | | |
| Polipéptidos pancreáticos | Neuropéptido Y | NPY | Estructura similar del precursor 24% homología al péptido activo. | Stanley et al 1998 |
| | Polipéptido pancreático | PP | | |
| | Péptido YY | PYY | | |
| Neuropéptidos RFamida | Mestina | KISS | C-terminal RF-NH ₂ | Allard et al. 1995; Laguzzi et al. 1996. Sorenson et al. 1984; Fehmann et al. 1990; Murase et al. 1996; Labrouche et al. 1998; Desprat y Zajac, 1997. |
| | Neuropéptido FF | NPFF | | |
| | Neuropéptido SF | NPSF | | |
| | Péptido de liberación de prolactina P518 | PrRP | | |
| | RFRPs | RFRP | | |
| Somatostatina | Somatostatina | SS | - | Liapakis et al 1996 |
| Somatotropinas | Coriomamotropina | PL | Prototipo Ancestral - GH-PRL. >90% | |
| | Hormona del | GH | | |

| | crecimiento | | similaridad de regions codificantes | |
|---|---|-------|--|--|
| | Prolactina | PRL | | |
| Taquiquinas | Neuroquinina A | NKA | C-terminal FXGLM | Chang et al. 1971 Kimball et al. 1988 |
| | Neuroquinina B | NKB | | |
| | Sustancia P | SP | | |
| | Bradiquinina | - | | |
| Familia VIP-secretina Glucagon | Péptido inhibitorio gastrico | GIP | Similar estructura en la organización de genes | Turton et al 1996 |
| | Glucagon | - | | |
| | Péptido activador de la adenilato ciclasa | PACAP | | |
| | Secretina | | | |
| | Péptido Vasoactivo intestinal | | | |

Los neuropéptidos son también capaces de cambiar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a otras sustancias. Un ejemplo son los melanocorticoides que puede alterar la difusión pasiva en la membrana y así facilitar el paso de algún agente radiactivo (Rudman y Kutner 1978).

Neuropéptidos RFamida

Históricamente, el neuropéptido RFamida, péptido cardioexcitatorio del molusco *Macocallista nimbosa* fué el primer péptido aislado e identificado con un Arg-Phe-amida en su extremo carboxilo terminal (C-terminal) basándose en su secuencia de aminoácidos (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) (Price y Greenberg 1977). Este neuropéptido fue involucrado en la modulación de analgesia inducida por opioides (Tang et al. 1984). Este tetrapéptido es encontrado solo en molusco pero existen otros neuropéptidos relacionados, aislados de vertebrados e invertebrados: Nemátodos, Anélidos, Artrópodos y Córdados. Estos péptidos son conocidos como FARPs (en Inglés FMRFamide related peptides) y colectivamente como neuropéptidos RFamida o RF-NH₂. Los neuropéptidos RFamida, ejercen influencia sobre gran variedad de procesos fisiológicos como la ingesta alimenticia, la percepción del dolor y actividad endócrina (Tsutsui y Ukena, 2006; Zajac y Mollereau, 2006).

Se conocen cinco genes que codifican varios péptidos RFamida en mamíferos (Tabla 1) (Perry et al. 1997, Hinuma et al. 1998, Hinuma et al. 2000, Kotani et al.

2001a, Liu et al. 2001, Jiang et al. 2003). En invertebrados, más de 20 péptidos han sido caracterizados. El primer neuropéptido RF amida reportado de mamífero fue el NPFF (FLFQPQRF-NH₂) aislado del cerebro bovino (Yang et al, 1985b)

El péptido de liberación de prolactina (PrRP), encontrado en 1998 como el ligando de un receptor acoplado a proteínas G, UHR1/GPR10 (Hinuma et al. 1998) se expresa en hipotálamo. La pre-proteína PrRP también contiene dos secuencias posibles para neuropéptidos maduros, SRAHQHXMEIRTPDINPAXYAGRGIRPVG y TPDINPAWYAGRGIRPVGR, llamados PrRP31 Y PrRP20, respectivamente. El PrRP20 puede ser una forma truncada de PrRP31. La organización estructural del gen es mostrada en la Tabla 2. Dos grupos de investigadores buscaron un péptido precursor común en la base de datos del genoma humano y tuvieron éxito en el aislamiento de un precursor para dos neuropéptidos de mamíferos: RFRP-1 (MPHSFANLPLRF-NH₂) Y RFRP-3 (VPNLPQRF) O NPSF y NPVF (Hinuma et al. 2000, Fukusumi et al. 2001). La alta homología en este péptido precursor apareció en los genes de humano, rata, ratón, bovino y codorniz (Hinuma et al. 2000; Liu et al. 2001). Los aminoácidos C-terminal de hRFRP-3 son idénticos a los de NPFF, y los cuatro aminoácidos del extremo C-terminal de hRFRP-1 coinciden con los aminoácidos del pollo LPLRF-NH₂ (Dockray et al. 1983), sugiriendo para estos neuropéptidos un ancestro evolutivo común. Otros neuropéptidos RFamida son NPFF (FLFQPQRFamida), NPAF (AGEGLSSPFWSLAAPQRFamida) y NPSF (SLAAPQRFamida), se componen de entre 8 y 18 residuos de aminoácidos y su expresión esta limitada a las regiones discretas del sistema nervioso central incluyendo el hipotálamo y la médula espinal (Perry et al. 1997).

Mecanismos de acción de los neuropéptidos RFamida

Los neuropéptidos se unen a varios tipos de receptores que activan diferentes sistemas de segundos mensajeros y pueden cambiar la afinidad de un receptor a su ligando específico. Los neuropéptidos se unen más comúnmente a los receptores acoplados a proteínas G (Di Cosmo et al. 2006) los cuales tienen siete dominios transmembranales y genera al adenosín monofosfato cíclico (cAMP), al

fosfatidil inositol bifosfato (PIP), o a los iones de calcio (Ca_{2+}) como segundos mensajeros (Cottrell et al.1990). Por ejemplo, los neuropéptidos de la familia de la oxitocina y vasopresina se unen a cuatro receptores, el OXY y V1a-, V1B-y V2.

Tabla 2. Comparación de la estructura primaria de los péptidos RFamida (modificada de Zajac y Mollereau, 2006)

| Neuropéptido | Estructura | Origen |
|--------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| NPAF | AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH2 | Bovino (Yang et al. 1985a) |
| NPAF humano | AGEGLNSPFWSLAAPQRF-NH2 | Humano (Yang et al. 1985b) |
| NPSF | SLAAPQRF-NH2 | bovino, humano (Yang et al. 1985a) |
| NPFF | FLFQPQRF-NH2 | bovino, humano (Yang et al. 1985) |
| GnIH-RP-2 | SSIQSLLNLPQRF-NH2 | codorniz (Satake et al. 2001) |
| FGRP | SLKPAANLPLRF-NH2 | rana (Koda et al. 2002) |
| RFRP-2 | SAGATANLPLRS-NH2 | bovino (Hinuma et al. 2000) |
| RFRP-1 | MPHSFANLPLRF-NH2 | bovino (Hinuma et al. 2000) |
| RFRP-3 | VPNLPQRF-NH2 | bovino (Hinuma et al. 2000) |
| GnIH | SIKPSAYLPLRF-NH2 | Codorniz (Tsutsui et al. 2000) |
| LPLRFamida | LPLRF-NH2 | pollo (Dockray et al. 1983) |
| RFRP | ANMEAGTMSHFPSLPQRF-NH2 | rata (Ukena et al. 2002) |
| PrRP20 | TPDINPAWYAGRGIRPVGRF-NH2 | bovino (Hinuma et al. 1998) |
| PrRP31 | SRAHQHSMEIRTPDINPAWYAGRGIRPVGRF-NH2 | Bovino(Hinuma et al. 1998) |
| C-RFa | SPEIDPFWYVGRGVRPIGRF-NH2 | carp (Fisher et al. 1997) |
| KiSS-14 | DLPNYNWNFSGLRF-NH2 | humano, rata (Kotani et al. 2001) |
| P518 | TSPGLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH2 | Humano (Jiang et al. 2003) |

El receptor OXY es selectivo para oxitocina, y el resto preferentemente se une a la vasopresina. El receptor V2 activa la adenil ciclasa y aumenta la cantidad de cAMP; los otros receptores generan fosfolipasa C y la vía de PIP (Hoyle 1999). La diversidad adicional en los efectos de los neuropéptidos es el resultado de la unión de los receptores y diferentes clases de proteínas G (inhibidoras o activadoras), y el efecto es la suma de todos los segundos mensajeros (Fuxe et al. 1995). La guanilil ciclasa es una enzima intracelular que puede estar unida a la membrana o libre en el citosol (Wedel y Garbers 1997). Esta enzima genera cGMP, un compuesto similar al cAMP, que contiene guanosina en vez de adenosina. La guanilil ciclasa unida a la membrana actúa como un receptor para el péptido atrial natriurético, y la guanilil ciclasa es activada por el óxido nítrico y radicales libres.

Los neuropéptidos RFamida (Arquero et al. 1995), actúan recíprocamente con el óxido nítrico, y así pueden modular la vía de guanilil libre en el citosol. El RFamida se une a receptores acoplados a proteínas G (Higgins et al. 1978) y a canales iónicos (Lingueglia et al. 1995). El extremo C-terminal de la secuencia del neuropéptido representa la región de unión entre el péptido y su receptor (Mazarguil et al. 2001, Kotani et al. 2001b). RFRP y NPFF comparten los cuatro últimos aminoácidos del extremo C-terminal; la forma no-amidada de los neuropéptidos es inactiva (Kotani et al. 2001b). Además de la regulación cardiovascular y de sus efectos parecidos a hormonas, NPFF posee funciones tanto anti-opioides como pro-opioides, que han complicado la búsqueda de un receptor específico. Actualmente se han propuesto un mismo receptor OT7T022 para RFRP's (Hinuma et al. 2000) y NPFF y por otro lado Bonini y colaboradores en el 2000 mostraron que NPFF activa receptores acoplados a proteínas G, NPFF1 y NPFF2.

NPFF, NPAF y NPSF son los ligandos más potentes encontrados en mamíferos, con valores de EC_{50} (concentración efectiva media) de 15.6 nM para NPFF, de 24.9 nM para NPAF y de 12 nM para NPSF (Bonini et al. 2000; Elshourbagy et al. 2000; Liu et al. 2001). Estos receptores son abundantes en

tejidos humanos, NPFF1 es encontrado principalmente en el SNC en la médula espinal y NPFF2 en la placenta. Además de la activación de receptores acoplados a proteínas G, NPFF pueden unirse a canales catiónicos sensibles a ácido (Askwith et al. 2000) que en el humano son llamados ASIC2A+3, (Catarsi et al. 2001).

Propiedades funcionales de los neuropéptidos RFamida

Los neuropéptidos RFamida durante mucho tiempo fueron reconocidos por sus efectos en la modulación del dolor así como por su papel fundamental en la analgesia y el desarrollo de tolerancia a opioides (Fehmann et al. 1990; Panula et al. 1996). Pero estos neuropéptidos RFamida también tienen diversos efectos periféricos, modulan la función cardiaca y vascular (Allard et al. 1995; Laguzzi et al. 1996), secreción de insulina y somatostatina (Sorenson et al. 1984; Fehmann et al. 1990), ingesta de alimentos (Murase et al. 1996), producción suprarrenal de aldosterona (Labrouche et al. 1998) y regulan la temperatura corporal (Desprat y Zajac 1997).

Tanto NPFF (entre 3 y 30 nM, in vitro) como PrRP (100 nM-1 μ M, in vitro) tiene actividad de liberación de prolactina (Aarnisalo et al. 1997, Hinuma et al. 1998), pero ambos son más potentes en otros sistemas como en el control cardiovascular (Roth et al. 1987; Samson et al. 2000) y en la modulación del dolor (Roumy y Zajac 1998). NPFF y FMRFamida afectan la contractilidad gástrica (Raffa y Jacoby 1989; Demichel et al. 1993; Decker et al. 1997). El efecto de NPFF sobre los intestinos es algo contradictorio, parece bloquear la inhibición de evacuaciones intestinales en el íleon inducida por morfina (en las dosis de 10 nmol-1 μ mol) (Demichel et al. 1993) pero lo potencia en el colon (en 13 nmol) (Raffa y Jacoby 1989). NPFF afecta el comportamiento alimenticio también a través del SNC; inyecciones intracerebroventriculares de NPFF (5-10 μ g) reducen la ingesta de alimentos (Murase et al. 1996). Hasta ahora ninguna prueba muestra la unión de NPFF a las células gastrointestinales, lo que sugiere que sus efectos sobre la regulación de la ingesta alimenticia y las evacuaciones intestinales podrían estar regulados a través de la sangre. La identificación de secreción pulsátil de NPFF en

el plasma humano sugiere que los péptidos pudieran actuar como hormonas (Sundblom et al. 1995) y explica las diversas acciones periféricas descritas para estos péptidos.

NPFF y NPAF inducen en 3T3-L1 la sobreexpresión de C/EBP's y la subexpresión de PPAR's, factores de transcripción que inducen la adipogénesis, y de Id1 e Id2, dos factores de transcripción que previenen la diferenciación adiposa (Lefrère et al. 2002). 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 et al. 2002) otro factor de transcripción que participa en la inducción de la diferenciación adiposa. Estos resultados se obtuvieron con adipocitos 3T3-L1 terminalmente diferenciados, se ignora el efecto que estos neuropéptidos pudieran tener sobre el proceso mismo de la diferenciación adiposa.

El objetivo central de este estudio fue evaluar los efectos de los neuropéptidos RFamida NPFF, NPAF y NPSF sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 y 3T3-F442A, líneas celulares extensamente usadas como modelo de estudio de la diferenciación adiposa (Gregoire et al. 1998; Ntambi y Kim 2000) así como de la diferenciación in vitro de preadipocitos humanos.

En los preadipocitos de ratón y humano evaluamos el efecto de los neuropéptidos sobre la diferenciación adiposa terminal, evaluada por la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos, actividad de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, así como la expresión de factores de transcripción que participan en los eventos tempranos de la diferenciación adiposa.

Nosotros hemos encontrado que los neuropéptidos NPFF, NPAF y NPSF inhiben la diferenciación adiposa de diversas clonas de preadipocitos 3T3 de ratón y preadipocitos humanos subcutáneos normales y derivados de lipoma. Dicha inhibición no se debe a citotoxicidad, depende de la concentración y del tipo de neuropéptido, previene el establecimiento del compromiso a la diferenciación adiposa terminal y está mediada por la sobreexpresión del gen Id3, factor de transcripción que inhibe la diferenciación adipogénica en estas células (Moldes et

al. 1997). Nuestros resultados mostraron además que la inhibición de la adipogénesis inducida por NPAF en los preadipocitos 3T3-F442A es irreversible. Todos los inhibidores de la adipogénesis de las células 3T3 y de otros modelos in vitro conocidos antes de este trabajo actúan de manera reversible. El ácido retinoico (Kuri-Harcuch 1982; Salazar-Olivo et al. 1994], los ésteres de forbol (Yun y Scott 1983), el ácido araquidónico (Mater et al 1998) o proteínas de la familia hedgehog (Hh) (Spinella-Jaegle et al. 2001) son algunos de los múltiples inhibidores de la adipogénesis empleados en el estudio de este proceso. Asimismo, diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante tipo β (Ignotz y Massague 1985), el factor de crecimiento fibroblástico (Hayashi et al. 1981), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Hayashi et al. 1981), el factor de necrosis tumoral (Navre y Ringold 1988), la endotelina 1 (Shinohara et al. 1992) y el factor de preadipocitos 1 (pref-1) (Smas y Sul 1993) inhiben la diferenciación adiposa de líneas celulares o de preadipocitos primarios en cultivo. Los efectos antiadipogénicos de estos factores pueden deberse a su actividad mitogénica (Sparks y Scott 1986; Sparks et al. 1986; Smas y Sul 1993), o ser independientes de ésta (Hayashi et al. 1981, Navre y Ringold 1988; Sparks et al. 1986).

La inhibición de la adipogénesis ocurre mientras están presentes en el medio de cultivo y su efecto se revierte luego de su retiro y con la alimentación de los cultivos con medio fresco que contiene señales adipogénicas. La irreversibilidad del efecto inhibitorio de NPAF sugiere que este neurotransmisor puede servir para definir los eventos moleculares que median el establecimiento de compromiso a la diferenciación adiposa terminal.

Parte 2. Estrategias de cultivo para el crecimiento y diferenciación de preadipocitos de ratón y humano

Durante el proceso de caracterizar los efectos de los neuropéptidos RFamida nos vimos en la necesidad de buscar técnicas de cultivo más ventajosas y simples para el crecimiento y diferenciación de adipocitos de ratón y sobre todo de humano. Esto nos llevó a ensayar la utilidad de L15, un medio de cultivo que no demanda atmósferas especiales. Aunque las líneas celulares preadiposas de ratón representan una valiosa herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares de la adipogénesis (Ntambi y Kim 2000) no reflejan cabalmente la diversidad de las poblaciones adiposas humanas, en las cuales son poco conocidas las bases moleculares de su potencial adipogénico (Adams et al. 1997; Lefebvre et al. 1998).

Además, el tejido adiposo se ha vuelto una fuente promisoría de células troncales con un alto desarrollo potencial, que puede ser muy útil para la ingeniería de tejidos (Fraser et al. 2006; Gimble et al. 2007; Helder et al. 2007). Técnicas de cultivo que garanticen una expansión celular y diferenciación de adipocitos de ratón y humano, permitirán realizar estudios dirigidos a la terapia génica (Goh et al 2007; Parker et al 2007; Suga et al 2007).

Aspectos generales del cultivo de células adiposas

Líneas de preadipocitos o adipocitos primarios son mantenidos rutinariamente en medios de cultivo que usan sistemas a base de bicarbonato los cuales requieren atmósferas que contienen concentraciones definidas de CO₂ y equipos de incubación especializados. Aunque el bicarbonato imita al amortiguador que protege la sangre, esto tiene algunas desventajas principales. El pKa de bicarbonato es 6.1, que es lejano al pH deseado en los medios de cultivo de las células (7.0-7.4). Además, la producción metabólica de CO₂ en cultivos de alta densidad celular complica el control de los niveles de CO₂ en el ambiente celular, y las fluctuaciones de pH en los cultivos a largo plazo tienen efectos adversos sobre el crecimiento celular y la síntesis de proteínas o de lípidos, (Barngrover et al. 1985; Mackenzie et al. 1961). Finalmente, aún cuando el bicarbonato es

relativamente económico, un suministro constante de CO₂ y la exigencia de incubadoras especiales o fermentadores para mantener una atmósfera controlada da como resultado cultivos celulares a largo plazo costosos.

Medio de cultivo L15

Una solución alternativa a estos problemas fue desarrollada por Leibovitz (1963) quien diseñó el medio de cultivo L15, que contiene altos niveles de las formas básicas de aminoácidos libres (principalmente arginina, cisteína e histidina) para obtener el pH deseado y eliminar fluctuaciones rápidas en el pH con su toxicidad implicada (Mackenzie et al. 1961). El reemplazo de glucosa por galactosa como fuente de bicarbonato en L15 causa una producción inferior de ácido láctico y disminuye la necesidad de un amortiguador de pH (Mackenzie et al. 1961). Debido a que L15 carece de un sistema amortiguador a base de bicarbonato, no requiere una atmósfera especial y trabaja en una atmósfera libre de intercambio de gases. El contenido de piruvato y alanina en L15 permite a las células generar el bicarbonato requerido para reacciones de síntesis.

Usos del medio L15

L15 ha sido usado para cultivar diferentes tipos de células tanto de vertebrados como de invertebrados en una atmósfera libre de intercambio de gases. Células Schwann de los nervios ciáticos de la rata (Yang et al. 2007), células astrogiales de pez (Wen et al. 2008), hepatocitos primarios de rata, humano y pollo (Mitaka et al. 1993; Coundouris et al. 1993; Fujii et al. 1996), y células de corazón (Le Marrec-Croq et al. 1998) han sido satisfactoriamente cultivadas en L15. Recientemente, se ha mostrado que L15 es una alternativa útil para el cultivo de células de la piel (de Jesus Ribeiro et al. 2005) y conserva la capacidad clonogénica de células humanas hematopoyéticas en la sangre completa almacenada (de Kreuk et al. 2001). A pesar de sus ventajas técnicas y económicas, L15 aún no ha sido probado para el cultivo de células adiposas. En este estudio realizamos una técnica de cultivo más simple utilizando medio de cultivo L15 el cual proporcionó apropiadas condiciones para la proliferación y

diferenciación de líneas celulares de preadipocitos 3T3 de ratón y de preadipocitos humanos subcutáneos normales y derivados de lipoma

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES GENERALES

Parte 1.

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

Indujimos la diferenciación de líneas celulares establecidas de preadipocitos 3T3 en presencia de los neuropéptidos NPFF, NPAF y NPSF. Los tres inhibieron la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-F442A, medida por la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos, en función de la concentración y con diferente potencia, pero no afectaron la adipogénesis de 3T3-L1. Los tres neuropéptidos bloquearon la diferenciación de los preadipocitos humanos subcutáneos normales y derivados de lipoma. De los tres neuropéptidos, NPFF mostró la menor capacidad 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: NPFF produjo 60% de inhibición; NPAF 79%, NPSF 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-NPFF 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 et al. 2000). Investigaciones futuras analizarán el efecto

de los neuropéptidos NPA-NPFF 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 Scout. 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 la proteína Id3, factor de transcripción que inhiben la diferenciación adiposa de las células 3T3 (Lasorella et al. 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. Además, la presencia de los neuropéptidos amidados FF, AF, SF en cultivos de preadipocitos humanos normales y derivados de lipoma inhibieron la diferenciación adiposa aunque en menor grado que los preadipocitos de 3T3-F442A. Nuestros resultados sugieren que los neuropéptidos RFamida FF, AF, SF regulan el desarrollo de los preadipocitos de ratón y humano. Además, podrían participar en la regulación del desarrollo del tejido adiposo a través del sistema nervioso central.

Parte 2

Por otro lado, el reconocimiento del tejido adiposo como una fuente promisoría de células madre adultas con aplicaciones en la medicina regenerativa lleva a la búsqueda de procedimientos más ventajosos para el conocimiento, cultivo y conservación de células adiposas. Las potenciales aplicaciones biotecnológicas de células adiposas exigen estrategias de estudio para conocer a detalle el funcionamiento del tejido adiposo humano y demanda protocolos de cultivo de células que aseguren la rápida expansión de células sumamente clonogénicas aplicables a procedimientos clínicos que requieren grandes poblaciones celulares. Por lo tanto, conocer detalladamente el mecanismo y naturaleza del tejido adiposo humano así como simplificar las técnicas de cultivo, nos llevó a explorar la utilidad de L15, un medio de cultivo que no requiere una atmósfera con una concentración de CO₂ definida. La importancia de la atmósfera en el cultivo celular aún no está bien definida, y la atmósfera más comúnmente usada puede ser la menos apropiada. La función del adipocito es altamente regulada en respuesta al cambio en los niveles de oxígeno y la regulación fisiológica de la formación del adipocito involucra factores originalmente identificados como proteínas de respuesta a hipoxia (Floyd et al. 2007). Nuestros resultados muestran que los adipocitos

subcutáneos de humano normales y derivados de lipoma mostraron una más alta diferenciación adiposa en el medio L15 que en DMEM o DMEM-F12 en presencia de CO₂, demostrando que la hipoxia detiene reversiblemente la diferenciación adiposa, disminuyendo la expresión de marcadores tempranos y tardíos de la adipogénesis en el cultivo de líneas establecidas de ratón y en cultivos primarios de preadipocitos humanos en DMEM o DMEM-F12 (Gentil et al. 2006; Lin et al. 2006). L15 conservó la capacidad clonogénica de las células humanas hematopoyéticas, manteniendo el crecimiento celular y la diferenciación de células adiposas de ratón y humanas. Aquí mostramos que el medio L15 apoya el crecimiento y adipogénesis de líneas establecidas de células preadiposas de ratón y preadipocitos humano subcutáneos normales y derivados de lipoma en un grado mayor que DMEM o DMEM-F12. Así, el empleo rutinario de L15 para el cultivo de células adiposas simplificará sus aplicaciones en investigación y usos biotecnológicos.

En conclusión, nuestro trabajo muestra que los neuropéptidos amidados NPFF, 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 puede ser una herramienta útil para estudiar los eventos moleculares que median el establecimiento del compromiso a la diferenciación adiposa terminal.

Analizar los efectos positivos o negativos que tienen diversas moléculas frente al desarrollo, metabolismo, y función del tejido adiposo, nos proporcionan datos importantes para dilucidar la naturaleza del tejido adiposo. Esta tesis es solo el principio diversos estudios para entender el metabolismo y desarrollo del tejido adiposo. Conocer los mecanismos de la diferenciación del tejido adiposo, podría diseñar estrategias terapéuticas para las patologías involucradas con este. Y aprovechando sus células precursoras, reparar tejidos dañados.

5. REFERENCIAS

<http://www.who.int/archives/inf-pr-1997/en/pr97-46.html>

<http://www.who.int/en/>

- Aarnisalo A. A. Tuominen R. K. Nieminen M. Vainio P. and Panula P. (1997) Evidence for prolactin releasing activity of neuropeptide FF in rats. *Neuroendocrinol. Lett.* 18, 191-196.
- Acher R. (1980) Molecular evolution of biologically active polypeptides. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 210, 21-43.
- Adams M. Montague C.T. Prins J.B. Holder J.C. Smith S.A. Sanders L. Digby J.E. Sewter C.P. Lazar M.A. Chatterjee V.K. O'Rahilly S. (1997) Activators of peroxisome proliferator-activated receptor γ have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* 100, 3149-3153
- Allard M. Labrousche S. Nosjean A. and Laguzzi R. (1995) Mechanisms underlying the cardiovascular responses to peripheral administration of NPF in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 577-583.
- Askwith C.C. Cheng C. Ikuma M. Benson C. Price M.P. and Welsh M.J. (2000) Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 26, 133-141.
- Banks W.A. and Kastin A.J. (1985) Permeability of the blood-brain barrier to neuropeptides: the case for penetration. *Psychoneuroendocrinology* 10, 385-399.
- Barngrover D. Thomas J. Thilly W.G. (1985) High density mammalian cell growth in Leibovitz bicarbonate-free medium: effects of fructose and galactose on culture biochemistry. *J. Cell Sci.* 78, 173-189.
- Barrera C.M. Kastin A.J. and Banks W.A. (1987) D-[Ala¹]-peptide T-amide is transported from blood to brain by a saturable system. *Brain Res Bull* 19, 629-633.
- Barrera C.M. Kastin A.J. Fasold M.B. and Banks W.A. (1991) Bidirectional saturable transport of LHRH across the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.* 261, E312-E318.

- Bartness T.J. and Song C.K. (2007) Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J. Lipid. Res.* 48, 1655-1672.
- Bell D. and McDermott B. (1996) Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: Characterization of receptor populations and their (Patho) physiological significance. *Pharmacological Reviews*, 48, 253-288.
- Bonini J.A. Jones K.A. Adham N. Forray C. Artymyshyn R. Durkin M. M. Smith K.E. Tamm J.A. Boteju L.W. Lakhani P.P. Raddatz R. Yao W.J. Ogozalek K.L. Boyle N. Kouranova E.V. Quan Y. Vaysse P.J. Wetzel J.M. Branchek T.A. Gerald C. and Borowsky B. (2000) Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J. Biol. Chem.* 275, 39324-39331.
- Bowers R.R. Festuccia W.T. Song C.K. Shi H. Migliorini R.H. and Bartness T.J. (2004). Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R1167-R1175
- Bruehl S. Chung, O.Y. Ward P. Johnson B. (2004) Endogenous opioids and chronic pain intensity: interactions with level of disability. *Clin. J. Pain* 20, 283-292.
- Carpene C. Bousquet-Melou A. Galitzky J. Berlan M. and Lafontan M. (1998) Lipolytic effects of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Ann. NY Acad. Sci.* 839, 186-189.
- Catarsi S. Babinski K. and Seguela P. (2001) Selective modulation of heteromeric ASIC proton-gated channels by neuropeptide FF. *Neuropharmacology* 41, 592-600.
- Chang M. Leeman S. and Niall H. (1971) Amino acid sequence of Substance P. *Nature New Biol.* 232, 86-87.
- Colditz GA. (1992) Economic costs of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 503s-507s.
- Cottrell G.A. Green K.A. and Davies N.W. (1990) The neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) can activate a ligand-gated ion channel in Helix neurones. *Pflugers Arch.* 416, 612-614.

- Coundouris J.A. Grant M.H. Engeset J. Petrie J.C. Hawksworth G.M. (1993) Cryopreservation of human adult hepatocytes for use in drug metabolism and toxicity studies. *Xenobiotica* 23, 1399-1409.
- Cullen M.C. Mastaglia F.L. (1980) Morphological changes in dystrophic muscle. *Br. Med. Bull.* 36, 45-52
- de Jesus Ribeiro C. Ohara M.T. Gama P. (2005) Alternative model to human skin organ culture: a preliminary study with Leibovitz L15 medium. *Microsc. Res. Tec.* 66, 139-144.
- de Kreuk A.M. Jonkhoff A.R. Zevenbergen A. Hendriks E.C.M. Schuurhuis G.J. Ossenkoppele G.J. Dräger A.M. van Oostveen J.W. and Huijgens P.C. (2001) Storage of unprocessed G-CSF-mobilized whole blood in a modified Leibovitz's L15 medium preserves clonogenic capacity for at least 7 days. *Bone Marrow Transplant* 28, 145-155.
- De Wied D. Witter A. Versteeg D.H. and Mulder A.H. (1969) Release of ACTH by substances of central nervous system origin. *Endocrinol.* 85, 561-569.
- Decker B. Vadokas B. Kutschenreuter U. Golenhofen K. Voigt K. McGregor G. P. and Mandrek K. (1997) Action of FMRFamide-like peptides on porcine gastrointestinal motility in vitro. *Peptides* 18, 1531-1537.
- Demichel P. Rodriguez J.C. Roquebert J. and Simonnet G. (1993) NPFF, a FMRF-NH₂-like peptide, blocks opiate effects on ileum contractions. *Peptides* 14, 1005-1009.
- Desprat C. and Zajac J.M. (1997) Differential modulation of mu- and delta-opioid antinociception by neuropeptide FF receptors in young mice. *Neuropeptides* 31, 1-7.
- Di Cosmo A. and Di Cristo C. (2006) Molluscan bioactive peptides. In: Kastin AJ, editor. Handbook of biologically active peptides. Burlington M.A: *Academic Press*. 235-239.
- Dockray G.J. Reeve J.R. Jr. Shively J. Gayton R.J. and Barnard C.S. (1983) A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature* 305, 328-330.

- Elshourbagy N.A. Ames R.S. Fitzgerald L.R. Foley J.J. Chambers J.K. Szekeres P.G. Evans N.A. Schmidt D.B. Buckley P.T. Dytko G.M. Murdock P.R. Tan K.B. Shabon U. Nuthulaganti P. Wang D.Y. Wilson S. Bergsma D.J. Sarau H.M. (2000) Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 25965-25971.
- Eng J. Shiina Y. Strauss E. and Yalow R.S. (1982) Post-translational processing of cholecystokinin in pig brain and gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 4918-4922.
- Fehmann H.C. McGregor G. Weber V. Eissele R. Goke R. Goke B. and 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.
- Filipak M. Sparks R.L. and Tzen C.Y. Scott R.E. (1988) Tumor necrosis factor inhibits the terminal event in mesenchymal stem cell differentiation. *J. Cell Physiol.* 137, 367-373.
- Fishbein R.J. Siegel R.J. Thomson C.E. Hopkins L.C. (1993) Sudden death of a carrier of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Ann. Inter. Med.* 119, 900-905.
- 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.
- Floyd Z.E. Kilroy G. Wu X. and Gimble J.M. (2007) Effects of prolyl hydroxylase inhibitors on adipogenesis and hypoxia inducible factor 1 alpha levels under normoxic conditions. *J Cell Biochem.* 101:1545-57.
- Fraser J.K. Wulur I. Alfonso Z. and Hedrick M.H. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnol.* 24:150-154.
- Fujii M. Yoshino I. Suzuki M. Higuchi T. Mukai S. Aoki T. Fukunaga T. Sugimoto Y. Inoue Y. Kusuda J. Saheki T. Sato M. Hayashi S. Tamaki M. and Sugano T. (1996) Primary culture of chicken hepatocytes in serum-free medium (pH 7.8) secreted albumin and transferrin for a long period in free gas exchange with atmosphere. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 1381-1391.

- Fukusumi S. Habata Y. Yoshida H. Iijima N. Kawamata Y. Hosoya M. Fujii R. Hinuma S. Kitada C. Shintani Y. Suenaga M. Onda H. Nishimura O. Tanaka M. Ibata Y. and Fujino M. (2001) Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1540, 221-232.
- Fuxe K. Li X. M. Tanganelli S. Hedlund P. O'Connor W.T. Ferraro L. Ungerstedt U. and Agnati L.F. (1995) Receptor-receptor interactions and their relevance for receptor diversity. Focus on neuropeptide/dopamine interactions. *Ann. N Y Acad. Sci.* 757, 365-376.
- Gimble J.M. Katz A.J. and Bunnell B.A. (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* 100,1249-60.
- Goh B.C. Thirumala S. Kilroy G. Devireddy R.V. and Gimble J.M. (2007) Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1, 322-324.
- Gregoire F.M. Smas C.M. Sul H.S. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78 783-809.
- Gullicksen P.S. Della-Fera M.A. and Baile C.A. (2003) Leptin-induced adipose apoptosis: Implications for body weight regulation. *Apoptosis* 8, 327–335
- Hayashi I. Nixon T. Morikawa M. and Green H. (1981) Adipogenic and anti-adipogenic factors in the pituitary and other organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 3969-3972.
- Heinrichs S.C. Menzaghi F. Pich E.M. Hauger R.L. and Koob G.F. (1993) Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulated feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res.* 611, 18-24.
- Helder M.N. Knippenberg M. Klein-Nulend J. and Wuisman P.I. (2007) Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Eng.* 13, 1799-1808.
- Higgins W.J. Price D.A. and Greenberg M.J. (1978) FMRFamide increases the adenylate cyclase activity and cyclic AMP level of molluscan heart. *Eur. J. Pharmacol.* 48, 425-430.
- Hinuma S. Habata Y. Fujii R. Kawamata Y. Hosoya M. Fukusumi S. Kitada C. Masuo Y. Asano T. Matsumoto H. Sekiguchi M. Kurokawa T. Nishimura O.

- Onda H. and Fujino M. (1998) A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393, 272-276.
- Hinuma S. Shintani Y. Fukusumi S. Iijima N. Matsumoto Y. Hosoya M. Fujii R. Watanabe T. Kikuchi K. Terao Y. Yano T. Yamamoto T. Kawamata Y. Habata Y. Asada M. Kitada C. Kurokawa T. Onda H. Nishimura O. Tanaka M. Ibata Y. and Fujino M. (2000) New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat. Cell Biol.* 2, 703-708.
- Hökfelt T. (1991) Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron.* 7, 867-879.
- Hoyle C.H. (1999) Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. *Brain Res.* 848, 1-25.
- Ignatz R.A. and Massague J. (1985) Type β transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8530-8534.
- Jiang Y. Luo L. Gustafson E. L. Yadav D. Lavery M. Murgolo N. Vassileva G. Zeng M. Laz T. M. Behan J. Qiu P. Wang L. Wang S. Bayne M. Greene J. Monsma F. Jr. and Zhang F. L. (2003) Identification and characterization of a novel RFamide peptide ligand for orphan G-protein coupled receptor SP9155. *J. Biol. Chem.*
- Kastin A.J. Olson R.D. Schally A.V. and Coy D.H. (1979) CNS effects of peripherally administered brain peptides. *Life Sci.* 25, 401-414.
- Kimball E.S. and Persico F.J. (1988) Substance P, Neurokinin A and Neurokinin B induce generation of IL-1 like activity in P388D1 cells. *J. Immunol.* 141, 3564-3569.
- Kivipelto L. Majane E.A. Yang H.Y. and Panula P. (1989) Immunohistochemical distribution and partial characterization of FLFQPQRfamidelike peptides in the central nervous system of rats. *J. Comp. Neurol.* 286, 269-287.
- Koopmans S.J. Leighton B. and DeFronzo R.A. (1998) Neonatal de-afferentation of capsaicin-sensitive sensory nerves increases in vivo insulin sensitivity in conscious adult rats. *Diabetology* 41, 813-820.

- Kotani M. Detheux M. Vandenbogaerde A. Communi D. Vanderwinden J.M. Le Poul E. Brezillon S. Tyldesley R. Suarez-Huerta N. Vandeput F. Blanpain C. Schiffmann S.N. Vassart G. and Parmentier M. (2001a) The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 276, 34631-34636.
- Kotani M. Mollereau C. Detheux M. Le Poul E. Brezillon S. Vakili J. Mazarguil H. Vassart G. Zajac J. M. and Parmentier M. (2001b) Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides. *Br. J. Pharmacol.* 133, 138-144.
- Kuri-Harcuch W. (1982). Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23, 164-169.
- Labrousse S. Laulin J.P. Le Moal M. Tramu G. and 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. and 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.
- Le Marrec-Croq F. Fritayre P. Chesné C. and Wuisman P.I. (1998) Cryopreservation of *Pecten maximus* heart cells. *Cryobiology* 37, 200-206.
- Lefebvre A.M. Laville M. Vega N. Riou J.P. van Gaal L. Auwerx J. and Vidal H. (1998) Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47, 98-103
- Lefrère I. Coppet P. Camelin J.C. Le Lay S. Mercier N. Elshourbagy N. Bril A. Berrebi-Bertrand I. Fève B. and Krief S. (2002) Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* 277, 39169-39178.
- Legradi G. and Lechan R.M. (1998) The arcuate nucleus in the major source for neuropeptide Y- innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic para-ventricular nucleus. *Endocrinology* 139, 3262-3270
- Leibovitz A. (1963) The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am. J. Hygiene* 78,173-180.

- Liapakis G. and Tallent M. (1996) Reisine Molecular and functional properties of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism*. 45, 12-13.
- Lingueglia E. Champigny G. Lazdunski M. and Barbry P. (1995) Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel. *Nature* 378, 730-733.
- Liu Q. Guan X.M. Martin W.J. McDonald T.P. Clements M.K. Jiang Q. Zeng Z. Jacobson M. Williams D.L. Jr. Yu H. Bomford D. Figueroa D. Mallee J. Wang R. Evans J. Gould R. and Austin C.P. (2001) Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception. *J. Biol Chem*. 276, 36961-36969.
- Lundberg J.M. (1996) Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.* 48, 113-178.
- Luttinger D. King R.A. Sheppard D. Strupp J. Nemeroff C.B. and Prange Jr A.J. (1982) The effect of neurotensin on food consumption in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 81, 499-503.
- Mackenzie C.G. Mackenzie J.B. and Beck P. (1961) The effect of pH on growth, proteins synthesis and lipid rich particles of cultured mammalian cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 141-156.
- Majane E.A. and Yang H.Y. (1990) FMRF-NH₂-like peptide is deficient in the pituitary gland of the Brattleboro rat. *Peptides* 11, 345-349.
- Majane E.A. and Yang H.Y. (1991) Mammalian FMRF-NH₂-like peptide in rat pituitary: decrease by osmotic stimulus. *Peptides* 12, 1303-1308.
- Martorell R. Kettel-Kan L. Huges M.L. and Grummer-Strawn L.M. (1998) Obesity in latin american women and children. *J. Nutr.* 128, 1464-1473
- Mater M.K. Pan D. Bergen W.G., and Jump D.B. (1998) Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoid pathway. *J. Lipid Res.* 39, 1327-1334.
- Mazarguil H. Gouarderes C. Tafani J. A. Marcus D. Kotani M. Mollereau C. Roumy m.M. and Zajac J. M. (2001) Structure-activity relationships of neuropeptide FF: role of C-terminal regions. *Peptides* 22, 1471-1478.

- Mitaka T. Norioka K. and Mochizuki Y. (1993) Redifferentiation of proliferated rat hepatocytes cultured in L15 medium supplemented with EGF and DMSO. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 29A, 714-722.
- Moldes M. Lasnier F. Fève B. Pairault J. Djian P. (1997) Id3 prevents differentiation of preadipose cells. *Mol. Cell Biol.* 17, 1796-1804.
- Monck N. (2001) Cizolirtine (Laboratorios Dr Esteve) *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2, 1269-1272.
- Murase T. Arima H. Kondo K. and Oiso Y. (1996) Neuropeptide FF reduces food intake in rats. *Peptides* 17, 353-354.
- Navre M. and Ringold G.M. (1988) A growth factor-repressible gene associated with protein kinase C-mediated inhibition of adipocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 107, 279-286.
- Ntambi J.M. and Kim Y-Ch. (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130, 3122S-3126S.
- Panula P. Aarnisalo A.A. and Wasowicz K. (1996) Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions. *Prog. Neurobiol.* 48, 461-487.
- Parker A.M. Shang H. Khurgel M. and Katz A.J. (2007) Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. *Cytotherapy* 9, 637-646.
- Perry S.J. Yi-Kung H. E. Cronk D. Bagust J. Sharma R. Walker R.J. Wilson S. and Burke J.F. (1997) A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPFF and FMRFamide. *FEBS Lett.* 409, 426-430.
- Price D.A. and Greenberg M.J. (1977a) Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Prep. Biochem.* 7, 261-281.
- Price D.A. and Greenberg M.J. (1977b) Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* 197, 670-671.
- Raffa R.B. and Jacoby H.I. (1989) A-18-famide and F-8-famide, endogenous mammalian equivalents of the molluscan neuropeptide FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), inhibit colonic bead expulsion time in mice. *Peptides* 10, 873-875.

- Roth B.L. Disimone J. Majane E.A. and Yang H.Y. (1987) Elevation of arterial pressure in rats by two new vertebrate peptides FLFQPQRF-NH₂ and AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH₂ which are immunoreactive to FMRF-NH₂ antiserum. *Neuropeptides* 10, 37-42.
- Rotwein P. (1991) Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 5, 3-18.
- Roumy M. and Zajac J.M. (1998) Neuropeptide FF, pain and analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 345, 1-11.
- Rudman D. and Kutner M.H. (1978) Melanotropic peptides increase permeability of plasma/cerebrospinal fluid barrier. *Am. J. Physiol.* 234, E327-E332.
- Salazar-Olivo L. A. Castro-Muñozledo F. de la Garza M. and 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.
- Samson W.K. Resch Z.T. and Murphy T.C. (2000) A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res.* 858, 19-25.
- Shinohara O. Murata Y.I. and Shimizu M. (1992) Endothelin-1 suppression of rat adipocyte precursor cell differentiation in serum-free culture. *Endocrinol.* 130, 2031-2036.
- Smas C.M. and Sul H.S. (1993) Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725-734.
- Sorenson R.L. Sasek C.A. and Elde R.P. (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.
- Sparks R.L. and Scott R.E. (1986) Transforming growth factor type β is a specific inhibitor of 3T3 T mesenchymal stem cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 165, 345-352.
- Sparks R.L. Siebel-Ross E.I. Wier M. and Scott R.E. (1986) Differentiation, dedifferentiation, and transdifferentiation of Balb/c 3T3 T mesenchymal stem

- cells: potential significance in metaplasia and neoplasia. *Cancer Res.* 46, 5312-5319.
- Spina M. Merlo-Pich E. Chan P.K. Basso A.M. Rivier J, Vale W, Koob G.F. (1996) Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuro-peptide. *Science* 273, 1561-1564.
- Spinella-Jaegle S. Rawadi G. Kawai S. Gallea S. Faucheu C. Mollat P. Courtois B. Bergaud B. Ramez V. and Blanchet A.M. Adelmant G. Baron R. Roman-Roman S. (2001) Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J. Cell Sci.* 114, 2085-2094.
- Stanley B.G. Kyrkouli S.E. Lampert S. and Leibowitz S.F (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189-1192.
- Suga H. Shigeura T. Matsumoto D. Inoue K. Kato H. Aoi N. Murase S. Sato K. Gonda K. Koshima I. and Yoshimura K. (2007) Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. *Cytotherapy* 9,738-745.
- Sundblom D. M. Panula P. and Fyhrquist F. (1995) Neuropeptide FF-like immunoreactivity in human plasma. *Peptides* 16, 347-350.
- Tang J. Yang H. Y. and Costa E. (1984) Inhibition of spontaneous and opiate-modified nociception by and endogenous neuropeptide with Phe-Met-Arg-Phe-NH₂-like immunoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5002-5005.
- Taubes G. 1998. As obesity rates rise, experts struggle to explain why. *Science* 280, 1367-1368.
- Tsutsui K. Saigoh E. Ukena K. Teranishi H. Fujisawa Y. Kikuchi M. Ishii S. and Sharp J.P. (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 661-667.
- Turton M.D. O'Shea D. Gunn I. Beak S.A., Edwards C.M., Meeran K. Choi S. J.Taylor G.M. Heath M.M., Lambert P.D., Wilding J.P., Smith D.M., Ghatei M.A., Herbert J. and Bloom S.R. (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379, 69-72.

- Turtzo L.C. and Lane M.D. NPY and neuron–adipocyte interactions in the regulation of metabolism. *Horm. Metab. Res.* 34, 607-615
- Varvarigou A. Bouziotis P. Zikos Ch. Scopinaro F. De Vincentis G. (2004) Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biother. Radiopharm.* 19, 219-29.
- Wedel B.J. and Garbers D.L. (1997) New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptors. *FEBS Lett.* 410, 29-33.
- Weigle D.S. and Kuijper J.L. (1996) Obesity genes and the regulation of body fat content. *Bioessays* 18, 867-874.
- Wen C.M. Cheng Y.H. Huang Y.F. and Wang C.S. (2008) Isolation and characterization of a neural progenitor cell line from tilapia brain. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 49, 167-180.
- Wickelgren I. (1998) Obesity: how big a problem? *Science* 280, 1364-1367.
- Yang H.Y. Fratta W. Majane E.A. and Costa E. (1985a) Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7757-7761.
- Yang H.Y. Tang J. Iadarola M. Panula P. and Costa E. (1985b) Are Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ immunoreactive peptides endocoids modulating opiate antinociception? *Prog. Clin. Biol. Res.* 192, 313-322.
- Yang S.P. Lee Y. and Voogt J.L. (2000) Involvement of endogenous opioidergic neurons in modulation of prolactin secretion in response to mating in the female rat. *Neuroendocrinol.* 72, 20-28.
- Yang Y. Chen X. Ding F. Zhang P. Liu J. and Gu X. (2007) Biocompatibility evaluation of silk fibroin with peripheral nerve tissues and cells in vitro. *Biomaterials* 28, 1643-1652.
- Yun K. and Scott R.E. (1983) Biological mechanisms of phorbol myristate acetate-induced inhibition of proadipocyte differentiation. *Cancer Res.* 43, 88-96.
- Zajac J.M. and Mollereau C. (2006) Special issue: RFamide peptides-introduction. *Peptides* 27, 941-942.
- Zuk, P.A. Zhu, M. Mizuno, H. Huang, J.I. Futrell, W.J. Katz, A.J. Benhaim, P. Lorenz, H.P. and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-226.

6. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Anexo 1

RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. [doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.071](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.071)

Anexo 2

Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human preadipocytes for translational applications. *Cytotherapy*. En prensa

Decision Letter (CYTH-2008-0045.R2)

From: barrettj@nhlbi.nih.gov

To: olivo@ipicyt.edu.mx

Cc:

Subject: Cytotherapy - Decision on Manuscript ID CYTH-2008-0045.R2

Body: 19-Sep-2008

Dear Dr. Salazar-Olivo:

Thank you for submitting your revised manuscript entitled "Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human preadipocytes for translational applications".

We are pleased to inform you that your manuscript is acceptable, in its current form, for publication in *Cytotherapy*. On behalf of the Editors of *Cytotherapy*, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Cytotherapy Editorial Office
cytotherapy@bellsouth.net

Date Sent: 19-Sep-2008



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

RFamide neuropeptides inhibit murine and human adipose differentiation

Mireya L. Herrera-Herrera, Luis A. Salazar-Olivo*

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP 78216, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2008

Available online xxxxx

Keywords:

RFamide neuropeptides

3T3 adipogenesis

Human adipogenesis

Id3 expression

ABSTRACT

RFamide neuropeptides NPFF and NPAF affect gene expression in mature 3T3-L1 adipocytes but their role on adipogenesis is unknown. Here, we show that NPFF, NPAF, and NPSF inhibited the differentiation of 3T3-F442A preadipocytes in a concentration-dependent manner, but had no effect on 3T3-L1 adipogenesis. All three neuropeptides also blocked the adipose differentiation of normal and lipoma-derived human preadipocytes. The antiadipogenic effect of RFamide neuropeptides was linked with the overexpression of Id3 gene and the inhibition by NPAF remained after neuropeptide removal and further incubation of 3T3 cells with adipogenic medium. Our results show that NPFF, NPAF and NPSF negatively affect adipogenesis and suggest that these compounds participate in the regulation of the adipose tissue development by the central nervous system.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Adipose tissue is strongly influenced by the nervous system [1]. The sympathetic innervation of adipose depots is the principal initiator of lipid mobilization in mammals [2] and a regulator of fat cellularity [3]. Sensory innervation of adipose tissue has also been documented, suggesting a possible role of sensory neural fibers in conveying information on the degree of adiposity to the brain [4].

Besides the sympathetic and sensory adipose innervation, many circulating factors serving as efferent and afferent signals has been described to mediate multiple aspects of brain–adipose communication [5–8]. A lot of neural factors acting on adipose tissue, however, are still poorly known, and advances in their study would extend our knowledge of obesity and associated co-morbidities. RFamide neuropeptides, initially described in molluscan [9], constitute a family of small peptides widely distributed in animal phyla [10]. NPFF, NPAF and NPSF are mammalian neuropeptides expressed in discrete regions of the central nervous system including hypothalamus, medulla, and the dorsal horn of spinal cord [11,12]. These neuropeptides, mainly recognized by their roles in pain modulation and opioid analgesia [12,13], also modulate cardiac and vascular function [14], insulin and somatostatin secretion [15], aldosterone production [16], body temperature [17], and food intake [10,18]. The recognition of pulsatile secretion of NPFF in human plasma suggests a hormonal role for these peptides [19].

RFamide neuropeptides act through NPFF-R1 and NPFF-R2 G protein-coupled receptors [20–22], and the expression of NPFF-R2 in adipose tissue [21] suggests a role for RFamide neuropeptides in the metabolism and/or development of this tissue. Although it has been shown that NPFF and NPAF neuropeptides alter gene

expression in mature 3T3 L1 adipocytes [23], their effect on adipogenesis remains unexplored. Therefore, the central aim of this study was to evaluate the effects of NPFF, NPAF and NPSF on the *in vitro* differentiation of murine and human preadipocytes. Our work show that RFamide neuropeptides inhibit adipogenesis and suggest that these compounds participate in the regulation of the adipose tissue development by the central nervous system.

Materials and methods

3T3 cell culture. 3T3-F442A preadipocytes were differentiated with DMEM (GIBCO BRL) containing 7% calf serum (CS; GIBCO BRL), 5 µg/ml insulin and 1 µM D-biotin, the adipogenic medium (AM), or maintained under non-adipogenic medium (NAM; DMEM containing 5% domestic adult cat serum, 5 µg/ml insulin and 1 µM D-biotin) [24]. 3T3-L1 adipogenesis was induced in confluent preadipocytes with AM supplemented with 0.1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) and 0.25 µM dexamethasone for 48 h and then incubating cultures in DMEM supplemented with 7% CS and 5 µg/ml insulin. Effects of NPAF, NPFF and NPSF neuropeptides on 3T3 adipogenesis were assayed in 7–14 d postconfluent cultures maintained at 37 °C in a humidified 95% air, 5% CO₂ atmosphere with medium changes every other day. All medium supplements except sera were from Sigma–Aldrich.

Isolation and culture of human preadipocytes. Human adipose tissue samples were obtained at the outpatient plastic surgery service, Hospital General de Ciudad Valles (San Luis Potosí, México), from patients who gave their informed consent. Normal (HNPA) and lipoma-derived (HLPa) subcutaneous adipose samples were extensively washed with sterile PBS added with antibiotics (penicillin G 2000 U/ml and streptomycin sulphate 100 µg/ml), finely

* Corresponding author. Fax: +52 444 834 2010.

E-mail address: olivo@ipicyt.edu.mx (L.A. Salazar-Olivo).

Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human pre-adipocytes for translational applications

ML Herrera-Herrera, R Zapata-Bustos and LA Salazar-Olivo

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México

Background

Adipose tissue has become a promising source of adult stem cells. Looking for optimal culture conditions, we evaluated the ability of L15, a free-gas exchange culture medium, to support cell proliferation and adipogenesis of murine 3T3-F442A and human normal (HNPA) and lipoma-derived (HLPA) pre-adipocytes.

Methods

3T3-F442A, HNPA and HLPA cell proliferation were compared in short-term cultures and along multiple passages in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) or DMEM-F12 under a 5% CO₂ atmosphere or L15 medium under a free-gas exchange atmosphere. Adipogenesis in these cells was evaluated by quantifying lipid accumulation and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity, and by assaying the expression of adipogenic markers by reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results

3T3 pre-adipocytes grew at similar rates in serum-supplemented L15 or DMEM, but L15 induced bigger colony-forming efficiency in these

cells. HNPA and HPLA grew more actively in L15 than in DMEM-F12 for more than 10 successive passages and reached higher colony-forming efficiency in L15 medium. On the other hand, while high-glucose DMEM and L15 supplemented with glucose 1 g/L induced similar levels of 3T3 adipogenesis, L15 with no added glucose increased HNPA and HPLA adipogenesis with respect to DMEM-F12, as measured by lipid accumulation, GPDH activity and expression of adipogenic markers C/EBP α , GLUT-4, LPL and aP2.

Discussion

The free-gas exchange medium L15 supports cell proliferation and adipogenesis of murine 3T3 and normal and lipoma-derived human subcutaneous pre-adipocytes to a greater extent than DMEM or DMEM-F12. The routine use of L15 will optimize translational applications of adipose cells.

Keywords

3T3 pre-adipocytes, adipogenesis, cell proliferation, human subcutaneous pre-adipocytes, L15 medium.

Introduction

Adipose tissue has become a promising source of adult stem cells with high developmental potential, which could be very useful for the cell-based therapies envisaged by regenerative medicine [1–3]. This has led to the search for more advantageous procedures for culturing and preserving adipose cells [4–6]. Pre-adipose cell lines and primary adipocytes or pre-adipocytes are routinely maintained in culture media using bicarbonate-based buffering systems that require atmospheres containing defined CO₂ concentrations. Although bicarbonate mimics the blood buffering

system, it has some major drawbacks. The pKa of bicarbonate is 6.1, which is far from the desired pH range of cell culture media (7.0–7.4). Additionally, metabolic production of CO₂ in high cell density cultures complicates the control of CO₂ levels in the cell environment, and pH fluctuations in long-term cultures have adverse effects on the cell growth and protein or lipid synthesis [7,8]. Finally, although bicarbonate is cheap, a constant supply of CO₂ and the requirement for special incubators or fermentors to maintain a controlled atmosphere for cell cultures result in greater expense in the long term.

Correspondence to: Luis A. Salazar-Olivo, PhD, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Ap. Post. 3–74, Tangamanga, San Luis Potosí 78231, SLP, México. E-mail: olivo@ipicyt.edu.mx.