



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

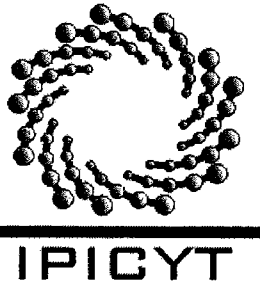
**La Resiniferatoxina Inhibe la Adipogénesis de los
Preadipocitos 3T3-F442A.**

Tesis que presenta
Claudia Olivia Silva Ortega

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

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



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

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 003 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 4 días del mes de agosto del año 2004, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

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

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Claudia Olivia Silva Ortega

sobre la Tesis intitulada:

La Resiniferatoxina Inhibe la Adipogénesis de los Preadipocitos 3T3-F442A.

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 13:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

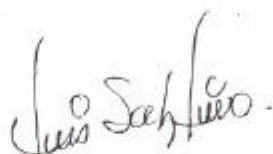
A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes agosto de 2004.


Dr. Marcial Bonilla Borin
Secretario Académico


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



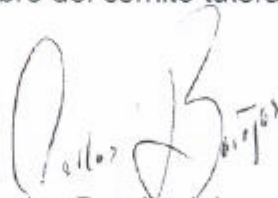
La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Claudia Olivia Silva Ortega y aprobada el 09 de julio del 2004 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.



Dr. Luis Salazar Olivo
Director de la tesis



Dr. Rubén López Revilla
Miembro del comité tutorial



Dr. Carlos Barajas López
Miembro del comité tutorial

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

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. de registro 176116).

ÍNDICE

Hoja de aprobación de la tesis.....	1
Dedicatorias.....	4
Agradecimientos.....	5
Lista de figuras.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Material y Métodos.....	12
Resultados.....	15
Discusión.....	17
Referencias.....	20

A MIS PAPAS: ANTONIO Y OLIVIA

A MIS HERMANOS: JUAN ANTONIO, YAZMIN Y YOVANA

AGRADEZCO

A usted Dr. Luis, por ser mi maestro, por su tiempo y paciencia.

Al Dr. Rubén López Revilla y al Dr. Carlos Barajas López por dedicar tiempo en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Víctor Saavedra, al Dr. Roberto Quezada Calvillo y a Rosa Espinoza Luna por su valiosa ayuda en la realización de esta tesis.

LISTA DE FIGURAS

1.	Efecto de la Resiniferatoxina sobre la diferenciación de preadipocitos 3T3-F442A	24
2.	Reversibilidad de la inhibición adipogénica por resiniferatoxina	25
3.	Morfología de las células 3T3-F442A en presencia de resiniferatoxina	26
4.	Expresión de mRNAs para los receptores vainilloides VR1 y VRL-1 en células 3T3-F442	27
5.	Expresión de la proteína VR1 en corazón de rata	28

RESUMEN

Los capsaicinoides, compuestos picantes del chile (*Capsicum annum*), afectan el metabolismo de lípidos y el desarrollo del tejido adiposo en animales de laboratorio, pero se desconocen los mecanismos de acción por los que ejercen tales efectos. Para determinar si el tejido adiposo es un blanco directo de los capsaicinoides evaluamos el efecto de la resiniferatoxina (RTX), un análogo ultrapotente de la capsaicina, sobre la diferenciación in vitro de preadipocitos 3T3-F442A de ratón. La acumulación intracitoplásmica de triglicéridos, un rasgo principal de la adipogénesis terminal, fue inhibida por RTX y en función de la concentración. El tratamiento de los preadipocitos 3T3-F442A con RTX 1 μ M redujo la acumulación lipídica en un 45%, mientras que RTX 10 μ M la redujo en un 90%. El efecto antiadipogénico se revirtió al retirar la RTX del medio de cultivo y realimentar las células con medio adipogénico, pero no cuando éstas se realimentaron con medio no adipogénico. Este resultado sugiere que la RTX previene de manera reversible el establecimiento del compromiso a la diferenciación. Dado que los efectos biológicos de los capsaicinoides son mediados por el receptor vainilloide VR1, analizamos la expresión de los mRNAs para VR1 y su homólogo VRL-1 en preadipocitos y adipocitos 3T3-F442A. Ninguno de los dos estadios de diferenciación expresó el mRNA para VR1, aunque tanto preadipocitos como adipocitos expresaron el mRNA para VRL-1, un receptor vainilloide no activado por capsaicinoides. Nuestros resultados son la primera evidencia de que el tejido adiposo es un blanco directo del efecto antiadipogénico de la RTX y sugieren que tal efecto no es mediado por el receptor VR1.

Palabras clave: 3T3-F442A • Adipogénesis • Resiniferatoxina • VR1 • VRL-1

ABSTRACT

Capsaicinoids, the pungent compounds in the fruits of *Capsicum*, affect lipid metabolism and in vivo development of adipose tissue, but their mechanisms of action remain unknown. To determine whether adipose tissue is a direct target for capsaicinoids, we evaluated the effect of resiniferatoxin (RTX), an ultrapotent analog of capsaicin, on the in vitro differentiation of 3T3-F442A murine preadipocytes. Intracytoplasmic triglyceride accumulation, a main trait of 3T3-F442A adipogenesis, was inhibited by RTX in a dose-dependent manner. One μM RTX decreased triglyceride accumulation by 45%, whereas 10 μM RTX decreased it by 90%. The antiadipogenic effect of RTX was reverted after toxin removal from the culture medium and when the cells were fed with adipogenic medium but not with nonadipogenic medium. This result suggests that RTX prevents the establishment of cell commitment to adipogenic differentiation in a reversible manner. Because biological effects of capsaicinoids are mediated by the vanilloid receptor VR1, we assayed the mRNA expression of both VR1 and VRL-1 receptors in 3T3-F442A. Neither preadipose nor adipose states of 3T3-F442A cells expressed VR1 mRNA although both cell states expressed VRL-1 mRNA, a vanilloid receptor not activated by capsaicinoids. Our results show for the first time that adipose cells are a direct target for the antiadipogenic effect of RTX and suggest that the antiadipogenic effect is not mediated by VR1 receptor.

Key words: 3T3-F442A • Adipogenesis • Resiniferatoxin • VR1 • VRL-1

INTRODUCCIÓN

Los capsaicinoides son compuestos que dan al fruto del chile (*Capsicum annum*) sus propiedades irritantes. La capsaicina (CAP), el más abundante de los capsaicinoides naturales, es una neurotoxina con un amplio espectro de actividades farmacológicas (Govindarajan y Sathyanarayana, 1991). La CAP destruye en forma selectiva las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal encargadas de transmitir estímulos que provocan dolor (Jancso y cols., 1977; Nagy y cols., 1983; Chard y cols., 1995) y modula la liberación de algunos neurotransmisores (Cordell y Araujo, 1993; Purkiss y cols., 2000).

Los capsaicinoides también afectan el metabolismo de lípidos y el desarrollo del tejido adiposo en animales de laboratorio. La inclusión de CAP en la dieta de ratas Wistar adultas disminuye la masa de algunos depósitos de tejido adiposo sin afectar el volumen de los adipocitos ni la absorción intestinal de lípidos (Kawada y cols., 1986). Otros trabajos señalan que la CAP, inyectada subcutáneamente en ratas Sprague-Dawley, atrofia el tejido adiposo café y disminuye la masa del tejido adiposo blanco (Cui y Himms-Hagen, 1992; Melnyk y Himms-Hagen, 1995). A diferencia de inhibidores de la adipogénesis in vitro como el ácido retinoico y el factor de crecimiento transformante tipo beta, cuyos efectos pueden revertirse con el retiro de estos compuestos del medio de cultivo, los efectos antiadipogénicos in vivo de la CAP parecen ser permanentes. Animales tratados con CAP desarrollan hasta un 30% menos en la masa de algunos depósitos grasos que los animales control, 12 meses después de interrumpido el tratamiento (Melnyk y Himms-Hagen, 1995). Efectos antiadipogénicos similares se han descrito para otros capsaicinoides como el capsiato o compuestos relacionados como el alcaloide evodiamina, el cual es un agonista del receptor vainilloide VR1 (Kobayashi y cols., 2001). El capsiato incrementa la temperatura corporal, promueve el metabolismo energético y suprime la acumulación de grasa corporal en ratones (Ohnuki y cols., 2001a; 2001b). Asimismo, el capsiato induce la sobreexpresión de proteínas desacoplantes en los tejidos adiposo y muscular,

importantes en el gasto de energía, el mantenimiento del peso corporal y la termorregulación (Masuda y cols., 2003).

La resiniferatoxina (RTX), un diterpeno irritante aislado de la planta *Euphorbia resinifera* (Hergenhahn y cols, 1975), comparte rasgos estructurales con ésteres de forbol y capsaicinoides. La RTX es un análogo ultrapotente de la CAP y presenta muchos de los efectos biológicos de ésta (Szallasi y Blumberg, 1989). La CAP y la RTX ejercen sus efectos biológicos activando un receptor membranal denominado receptor vainilloide o VR1 (Szallasi y Blumberg, 1990; 1999). Este receptor es un canal catiónico no selectivo activado no sólo por capsaicina y RTX sino también por calor ($>43^{\circ}\text{C}$) o por protones (Caterina y Julius, 2001). Aunque VR1 se describió inicialmente en neuronas sensoriales (Szallasi y Blumberg, 1999) su expresión se ha probado también en células no neurales tales como células cebadas (Bíró y cols., 1998), queratinocitos epidérmicos humanos (Denda y cols., 2001, Inoue y cols., 2002) y cardiomiocitos de rata (Dvorakova y Kummer 2001). Un receptor homólogo a VR1 recientemente clonado, VRL-1 (Caterina y cols., 1999), es activado por calor ($>52^{\circ}\text{C}$) e insensible a capsaicina (Caterina y cols., 2001) y su expresión se conoce sólo en neuronas sensoriales (Caterina y cols., 1999, Stenholm y cols., 2002, Ichikawa y Sugimoto, 2003).

Dado que se ignoran los mecanismos por los cuales los capsaicinoides afectan el metabolismo y el desarrollo del tejido adiposo, el presente trabajo buscó determinar si el tejido adiposo es un blanco directo del efecto antiadipogénico de estos compuestos y si tal efecto es mediado por el receptor VR1. Para ello evaluamos el efecto de RTX, un potente análogo de la CAP, sobre la diferenciación adiposa de preadipocitos 3T3-F442A de ratón y analizamos la expresión de los receptores vainilloides VR1 y VRL-1 en éstas células. Nuestros resultados muestran que la RTX inhibe la diferenciación adiposa de las células 3T3-F442A en función de la concentración, de manera reversible y previniendo el establecimiento del compromiso a la diferenciación. Nuestros resultados también muestran que estas células no expresan el receptor VR1 pero sí el receptor homólogo VRL-1. Este trabajo constituye la primera evidencia de que el tejido

adiposo es un blanco directo del efecto antiadipogénico de los capsaicinoides y sugiere que dicho efecto no es mediado por el receptor VR1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (MA: medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL; Grand Island, NY) adicionado con 10% de suero fetal de bovino (Gibco BRL), insulina 5 µg/ml y biotina 1 µM) El medio adipogénico fue suplementado con distintas concentraciones de RTX (Sigma Chem.; St. Louis, MO) durante las 72 horas iniciales de post-confluencia. Cultivos paralelos usados como control recibieron MA adicionado con ácido retinoico (Sigma Chem.), un inhibidor conocido de la adipogénesis en células 3T3 (Kuri-Harcuch, 1982; Salazar-Olivo y cols., 1994), o medio no adipogénico (MNA; DMEM adicionado con 2% de suero de gato adulto, insulina 5 µg/ml y biotina 1µM), una condición de cultivo que no promueve la diferenciación de los preadipocitos 3T3 ni previene la manifestación fenotípica de preadipocitos ya comprometidos a la diferenciación (Kuri-Harcuch y Green, 1978). Después de 72 horas los medios de los distintos tratamientos se retiraron y los cultivos se mantuvieron durante 6 días adicionales en medio definitivo (MD: DMEM adicionado con transferrina 5 mg/ml, triyodotironina 2 µM, factor de crecimiento epidérmico 0.5 µl/ml, insulina 5 µg/ml, biotina 1 µM, albúmina de suero bovino al 0.1% y 1% de suero de gato) para permitir el 100% de diferenciación adiposa en los controles positivos.

Cuantificación de la diferenciación adiposa

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

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

donde Abs T es la absorbencia del tratamiento respectivo, Abs MNA es la absorbencia del tratamiento en medio no adipogénico y Abs MA es la absorbencia del tratamiento en medio adipogénico.

RT-PCR

El RNA total de preadipocitos y adipocitos 3T3-F442A, así como de corazón y ganglio trigémino de ratas macho Sprague-Dawley (250-300 g) se extrajo por el método del isotiocianato de guanidina (Sambrook y Russel, 2001). El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de RNA total usando transcriptasa reversa (Promega; Madison, WI) en presencia de oligo(dT) durante 1 hora a 42 °C. La PCR se realizó en mezclas de reacción (25 µl) con 100 ng o 200 ng de cDNA para VR1 o VRL-1 respectivamente, dNTP 200 µM, MgCl₂ 2 mM, una unidad de *Taq* DNA polimerasa y 35 pmoles de oligonucleótidos específicos para VR1 o VRL-1. Los oligonucleótidos para VR1 fueron: oligonucleótido sentido 5'-GACATGCCACCCAGCAGG-3' y oligonucleótido antisentido 5'-TCAATTCCCACACACCTCCC-3' que corresponden a los nucleótidos 2491-2508 y 2733-2752, respectivamente, de la secuencia de cDNA de VR1 (Mezey y cols., 2000). Los oligonucleótidos para VRL-1 fueron: oligonucleótido sentido 5'-TCGTCAATGCCAGTGCACCGATG-3' y oligonucleótido antisentido 5'-GCACTGTTCTCAGGCGAGTTATCTGC-3' que corresponden a los nucleótidos 784-807 y 1098-1123, respectivamente, de la secuencia de cDNA de VRL-1. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 5 min, 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 1 min a 72°C durante 40 ciclos y extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se obtuvieron con un documentador ChimiDoc EQ (Bio-Rad; Hercules, CA).

Western Blot

Extractos totales de preadipocitos 3T3-F442A, adipocitos 3T3-F442A, así como de corazón de ratas macho Sprague-Dawley (250-300 g) se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (8%) en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilidenofluoruro (Bio-Rad) y ésta se incubó durante una noche con un anticuerpo policlonal contra VR1 (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) diluido 1:500. La membrana se incubó durante 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Amersham Bioscience; Sao Paulo, Brasil) diluido 1:1500. La detección se realizó con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

La resiniferatoxina inhibe la adipogénesis de las células 3T3-F442A en función de la concentración

La acumulación intracitoplásmica de triglicéridos es el rasgo más característico de la diferenciación adiposa terminal y un marcador de adipogénesis fácilmente cuantificable. Para determinar el efecto de la RTX sobre la diferenciación adiposa tratamos cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A con medio adipogénico y distintas concentraciones de RTX durante 72 horas post-confluencia. Luego del tratamiento, los cultivos se mantuvieron durante seis días adicionales en MD para lograr un 100% de diferenciación adiposa en los cultivos control. Al noveno día de postconfluencia las monocapas se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica en los distintos tratamientos. Como se muestra en la figura 1, la acumulación de triglicéridos en los preadipocitos 3T3-F442A fue inhibida en función de la concentración de la toxina. RTX 1 μ M disminuyó la acumulación lipídica aproximadamente un 45% mientras que RTX 10 μ M ejerció una inhibición de aproximadamente el 90% en la acumulación de triglicéridos. Concentraciones de RTX 0.1 μ M o menores no afectaron la acumulación lipídica de los adipocitos 3T3-F442A.

El efecto antiadipogénico de la RTX es reversible

Para determinar si el efecto antiadipogénico de la RTX es permanente o reversible, tratamos cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A con medio adipogénico o medio no adipogénico en presencia de RTX durante seis días post-confluencia. Luego del tratamiento, los cultivos se mantuvieron durante siete días adicionales en medio adipogénico o medio no adipogénico. Al decimotercer día de postconfluencia las monocapas se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica en los distintos tratamientos. La figura 2 muestra que los cultivos mantenidos durante 13 días con medio adipogénico y RTX (MA+RTX) alcanzaron una diferenciación menor al 10% respecto a los controles mantenidos en medio adipogénico durante el mismo periodo. Por el contrario, los cultivos mantenidos durante seis días en medio

adipogénico y RTX y luego por siete días adicionales en medio adipogénico fresco (MA+RTX → MA) mostraron una diferenciación de más del 50%. Este alto grado de diferenciación no se alcanzó en cultivos inhibidos durante siete días con RTX y luego alimentados con medio no adipogénico (MA+RTX → MNA). Resultados similares se observaron en los cultivos tratados con ácido retinoico, un inhibidor conocido de la adipogénesis que actúa en forma reversible, previniendo el compromiso a la diferenciación adiposa de los preadipocitos 3T3. La figura 3 muestra la morfología de las células sometidas a los distintos tratamientos descritos.

Las células 3T3-F442A no expresan el mRNA para el receptor VR1 pero sí el mRNA para VRL-1

La CAP y la RTX, entre otros vainilloides, ejercen sus efectos biológicos activando el receptor membranal VR-1. Un receptor homólogo a VR-1, el receptor VRL-1, no es activado por capsaicina, sino por altas temperaturas (>52°C). Para determinar si el efecto antiadipogénico de la RTX es mediado por el receptor VR1 o VRL-1, analizamos la expresión de estos dos receptores en células 3T3-F442A mediante RT-PCR. Empleando oligonucleótidos específicos para VR1 (fig. 4A) logramos detectar un producto de amplificación de 262 pb obtenido a partir de RNA de corazón de rata (fig. 4B), como se reportó previamente (Dvorakova y Kummer, 2001). Sin embargo el mismo ensayo no detectó un producto de amplificación similar a partir de RNA total de preadipocitos o adipocitos 3T3-F442A (fig. 4B). Por el contrario, el análisis de RT-PCR realizado con oligonucleótidos específicos para el receptor VRL-1 (fig. 4A) permitió detectar una banda de 342 pb tanto en el ganglio trigémino de rata (Ichikawa y Sugimoto, 2000), como en ambos estadios de diferenciación de las células 3T3-F442A (fig. 4C). La expresión de la proteína VR1 en extractos totales de corazón de rata fue confirmada mediante Western blot (fig. 5).

DISCUSIÓN

Aunque desde hace casi 20 años se sabe que los capsaicinoides afectan el metabolismo de lípidos e inhiben el desarrollo de algunos depósitos de tejido adiposo (Kawada y cols., 1986; Cui y Himms-Hagen, 1992; Melnyk y Himms-Hagen, 1995; Ohnuki y cols., 2001a), aún desconocemos los mecanismos por los que estos compuestos ejercen tales efectos. Hasta ahora, los trabajos que documentan los efectos de los capsaicinoides sobre el tejido adiposo han empleado como modelos experimentales solamente animales completos. Por ello no ha sido posible establecer si los capsaicinoides ejercen su actividad antiadipogénica directamente sobre las células del tejido adiposo o si su efecto es mediado por algún otro tejido. Aunque algunos autores sugieren que los efectos antiadipogénicos de los capsaicinoides podrían estar mediados por el sistema nervioso periférico (Himms-Hagen y cols., 1990; Purkiss y cols., 2000), los datos disponibles no establecen con claridad el mecanismo de acción de tales efectos. Para determinar si el tejido adiposo es un blanco directo del efecto antiadipogénico de los capsaicinoides empleamos como modelo de estudio la línea celular de preadipocitos 3T3-F442A de ratón. Estas células son fibroblastos capaces de diferenciarse en adipocitos cuando permanecen quiescentes durante al menos 48 horas en presencia de señales adipogénicas de origen sérico (Kuri-Harcuch y Green, 1978; Zaitso y Serrero, 1990).

El tratamiento de cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A con RTX durante las 72 horas iniciales de quiescencia indujo una marcada inhibición de la adipogénesis. El efecto inhibitorio de la RTX dependió de su concentración; 10 μ M de la toxina indujo una inhibición superior al 90%. Por otro lado, el efecto antiadipogénico fue revertido al retirar la toxina del medio de cultivo y alimentar las células con medio adipogénico. Tal reversión de la inhibición no se presentó cuando los cultivos se realimentaron con medio no adipogénico luego del retiro de la toxina. Estos resultados sugieren que la RTX inhibe la diferenciación de los preadipocitos 3T3-F442A bloqueando el establecimiento del compromiso a la diferenciación y no la manifestación fenotípica de dicho compromiso, y que dicho efecto es reversible.

Otros inhibidores de la adipogénesis de las células 3T3-F442A, como el ácido retinoico, el factor de necrosis tumoral α o el factor de crecimiento transformante tipo β , bloquean la etapa de compromiso inhibiendo la expresión de factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la manifestación del fenotipo adiposo terminal (Stephens y cols., 1993; Schwarz y cols., 1997). El efecto inhibitorio de RTX sobre la etapa de compromiso sugiere que este compuesto también podría afectar la expresión de factores de transcripción que inducen adipogénesis como C/EBP o PPAR? (Mandrup y Lane, 1997), o de las proteínas Id que previenen la diferenciación adiposa (Moldes y cols., 1997). Experimentos de RT-PCR permitirán analizar si alguno de estos marcadores tempranos de la diferenciación adiposa es afectado por RTX.

Para analizar el mecanismo antiadipogénico de los capsaicinoides en las células 3T3-F442A evaluamos la expresión de VR1, el receptor que parece mediar la mayoría de los efectos biológicos de estos compuestos. No obstante el marcado efecto inhibitorio de la RTX, ni los preadipocitos ni los adipocitos 3T3-F442A expresaron el mRNA para VR1, lo cual sugiere que el efecto antiadipogénico de la RTX puede estar mediado por un mecanismo alternativo a la vía conocida de los capsaicinoides. La expresión de VR1 en las células 3T3-F442A se analizó en cultivos no tratados con RTX. Aunque no existen evidencias de que la expresión del receptor sea inducible por capsaicinoides, el análisis de la expresión de VR1 en preadipocitos y adipocitos 3T3-F442A tratados con RTX permitirá confirmar o rechazar nuestros resultados.

Tanto los preadipocitos como los adipocitos 3T3-F442A expresan el mRNA para el receptor VRL-1, homólogo de VR1 que no es activado por capsaicinoides. Aunque éste último receptor no parece ser estimulado por capsaicina, su expresión y el efecto de la RTX sobre las células 3T3-F442A sugiere que a través de éste la RTX podría ejercer el efecto antiadipogénico. Sin embargo, la ausencia de antagonistas para el receptor VRL-1 restringe el análisis de su participación en tal efecto.

Por otro lado, existe evidencia creciente de la implicación de los receptores canabinoides y sus ligandos endógenos, los endocannabinoides, en la regulación de la ingesta de alimento y del metabolismo energético (Cota y cols., 2003; Ravinet y cols., 2004). El receptor CB1 para endocannabinoides se expresa en células del tejido adiposo y en células 3T3-F442A (Bensaid y cols., 2003) y capsaicinoides como el olvanil y la pseudocapsaicina son capaces de unirse a este receptor (Di Marzo y cols., 1998). La interacción entre capsaicinoides y receptores canabinoides plantea la posibilidad de que el efecto antiadipogénico de la RTX sea mediado por el receptor CB1 para endocannabinoides. La existencia del antagonista SR141716 del receptor canabinoide CB1 (Bensaid y cds., 2003) permitiría evaluar si el efecto antiadipogénico de la RTX es mediado por CB1.

En resumen, nuestro trabajo muestra que la RTX tiene un efecto antiadipogénico sobre los preadipocitos 3T3-F442A, el cual es reversible y depende de la concentración del compuesto. Nuestros resultados sugieren que la RTX afecta la diferenciación adiposa por un mecanismo alterno al receptor vainilloide VR1, ya que éste no se expresa en células 3T3-F442A. Así, nuestro trabajo representa la primera evidencia experimental de que el tejido adiposo es un blanco directo del efecto antiadipogénico de los capsaicinoides.

REFERENCIAS

- Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrié P (2003) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 63:908-914
- Bíró T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Ács G, Ács P, Paus R, Blumberg PM (1998) Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood* 91:1332-1340
- Caterina MJ, Julius D (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24:487-517
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441
- Chard PS, Bleakman D, Savidge RJ, Miller RJ (1995) Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience* 65:1099-1108
- Cordell GA, Araujo OE (1993) Capsaicin: identification, nomenclature and pharmacotherapy. *Ann Pharmacother* 27:330-336
- Cota D, Marsicano G, Tschop M, Gruble Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112:423-431
- Cui J, Himms-Hagen J (1992) Long term decrease in body fat and in brown adipose tissue in capsaicin-desensitized rats. *Am J Physiol* 262:R568-R573
- Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Adamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K (2001) Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1250-1252
- Di Marzo V, Bisogno T, Melck D, Ross R, Brockie H, Stevenson L, Pertwee R, De Petrocellis L (1998) Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett* 436:449-454

- Dvorakova M, Kummer W (2001) Transient expression of vanilloid receptor subtype 1 in rat cardiomyocytes during development. *Histochem Cell Biol* 116:223-225
- Govindarajan VS, Sathyanarayana MN (1991) Capsicum: Production, technology, chemistry and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition and metabolism; structure, pungency, pain and desensitization sequences. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29:435-474
- Hergenhahn M, Adolph W, Hecker E (1975) Resiniferatoxin and other esters of novel polyfunctional diterpenes from *Euphorbia resinifera* and *unispina*. *Tetrahedron Lett* 19:1595-1598
- Himms-Hagen J, Cui J, Sigurdson SL (1990) Sympathetic and sensory nerves in control of growth of brown adipose tissue: Effects of denervation and of capsaicin. *Neurochem Int* 17:271-279
- Ichikawa H, Sugimoto T (2000) Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system. *Neuroscience* 101:719-725
- Ichikawa H, Sugimoto T (2003) The co-expression of VR1 and VRL-1 in the rat vagal sensory ganglia. *Brain Res* 980:293-296
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Kazuhide Inoue K, Denda M (2002) Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291:124-129
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A (1977) Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. *Nature* 270:741-743
- Kawada T, Hagihara KI, Iwai K (1986) Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J Nutr* 116:1272-1278
- Kobayashi Y, Nakano Y, Kizaki M, Hoshikuma K, Yokoo Y, Kamiya T (2001) Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist. *Planta Med* 67:628-633
- Kuri-Harcuch W (1982) Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23:164-169.

- Kuri-Harcuch W, Green H (1978) Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:6107-6109
- Mandrup S, Lane MD (1997) Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 272:5367-5370
- Masuda Y, Haramizu S, Oki K, Ohnuki K, Watanabe T, Yazawa S, Kawada T, Hashizume S, Fushiki T (2003) Upregulation of uncoupling proteins by oral administration of capsiate, a nonpungent capsaicin analog. *J Appl Physiol* 95:2408-2415
- Melnyk A, Himms-Hagen J (1995) Resistance to aging-associated obesity in capsaicin-desensitized rats one year after treatment. *Obesity Res* 3:337-344
- Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci* 97:3655-3660
- Moldes M, Lasnier F, Féve B, Pairault J, Djian P (1997) Id3 prevents differentiation of preadipose cells. *Mol Cell Biol* 17:1796-1804
- Nagy JI, Iversen LL, Goedert M, Chapman D, Hunt SP (1983) Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rats. *J Neurosci* 3:1145-1150
- Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T (2001a) Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:2735-2740
- Ohnuki K, Haramizu S, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T (2001b) CH-19 Sweet, non-pungent cultivar of red pepper, increased body temperature in mice with vanilloid receptors stimulation by capsiate. *J Nutr Sci Vitaminol* 47:295-298
- Purkiss J, Welch M, Doward S, Foster K (2000) Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol* 59:1403-1406

- Ramírez-Zacarías JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipid with oil red O. *Histochemistry* 97:493-497
- Ravinet TC, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P (2004) CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disor* 28:640-648
- Salazar-Olivo LA, Castro-Muñozledo F, de la Garza M, Kuri-Harcuch W (1994) Inhibition of 3T3 adipogenesis by retinoic acid is not mediated by cytoplasmic retinoic acid-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 204:257-263
- Sambrook J, Russel DW (2001). "Molecular Cloning. A Laboratory Manual". 3rd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA (1997) Retinoic acid blocks adipogénesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 17:1552-1561
- Stenholm E, Bongenhielm Ulf, Ahlquist M, Fried K (2002) VR1 and VRL-1-like immunoreactivity in normal and injured trigeminal dental primary sensory neurons of the rat. *Acta Odontol Scand* 60:72-79
- Stephens JM, Butts M, Stone R, Pekala PH, Bernlohr DA (1993) Regulation of transcription factor mRNA accumulation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation by antagonists of adipogénesis. *Mol Cell Biochem* 123:63-71
- Szallasi A, Blumberg PM (1989) Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30:515-520
- Szallasi A, Blumberg PM (1990) Specific binding of resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog, by dorsal root ganglion membranes. *Brain Res* 524: 106-111
- Szallasi A, Blumberg PM (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51:159-212
- Zaitso H, Serrero G (1990) Pedersen fetuin contains three adipogenic factors with distinct biochemical characteristics. *J Cell Physiol* 144:485-491

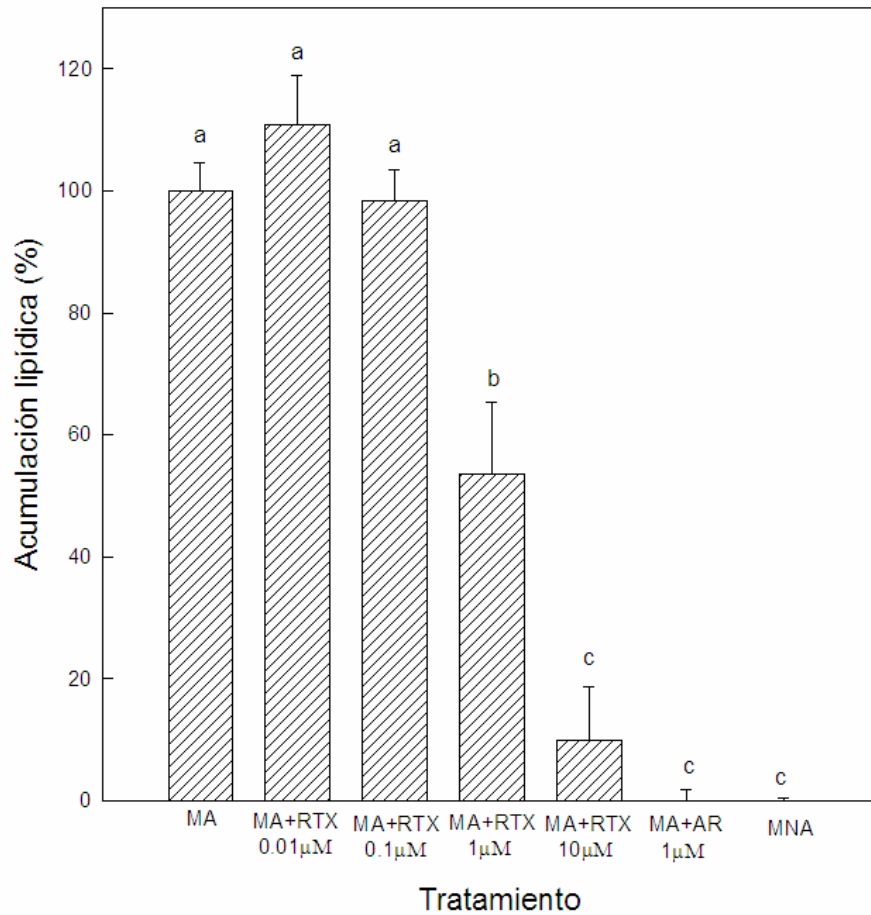


Figura 1. Efecto de la resiniferatoxina (RTX) sobre la diferenciación de preadipocitos 3T3-F442A. Cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (MA) en presencia de las concentraciones indicadas de resiniferatoxina (MA + RTX) durante 72 horas post-confluencia. Tratamientos con ácido retinoico 1 µM (MA + AR) o medio no adipogénico (MNA) se incluyeron como controles. Luego de 6 días en medio definitivo las monocapas se fijaron con formaldehído al 4% en PBS y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos. Las columnas representan la media de dos experimentos ± el error estándar. Las letras minúsculas denotan diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

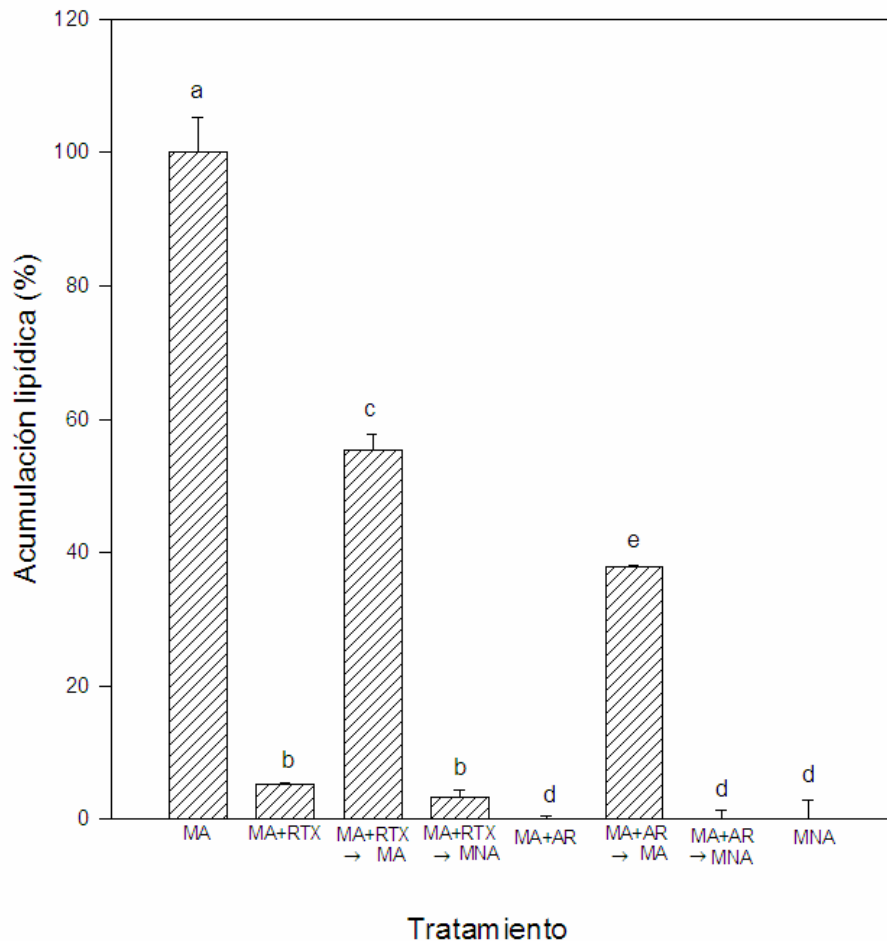


Figura 2. Reversibilidad de la inhibición adipogénica por resiniferatoxina. Cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (MA) en ausencia o en presencia de 10 μ M de resiniferatoxina (MA + RTX). Luego de 6 días de tratamiento, a algunos de los cultivos mantenidos con RTX se les retiró el medio y se les añadió MA o MNA durante 7 días adicionales. Tratamientos con ácido retinoico 1 μ M (MA + AR) o medio no adipogénico (MNA) se incluyeron como controles. Las columnas representan la media de dos experimentos \pm el error estándar. Las letras minúsculas denotan diferencia significativa ($P \leq 0.05$).

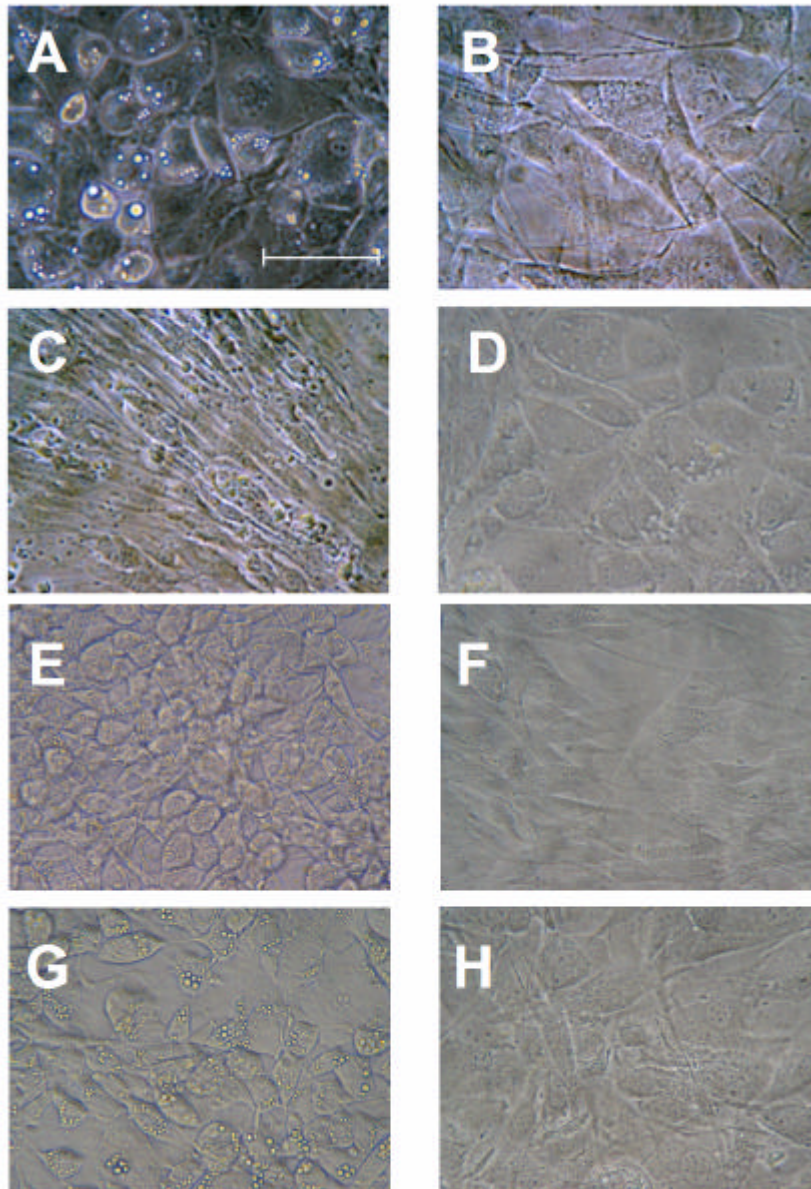


Figura 3. Morfología de las células 3T3-F442A en presencia de resiniferatoxina. Cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A se indujeron a diferenciación con medio adipogénico (MA) (A), en presencia de ácido retinoico (MA + AR) (C) o en presencia de resiniferatoxina (MA + RTX) (D) durante 6 días post-confluencia. Después de este tiempo se retiró el medio y se añadió medio adipogénico (E y G) o medio no adipogénico (F y H) durante 7 días adicionales. Algunos cultivos se mantuvieron en medio no adipogénico (MNA) (B) como controles. Barra = 50 μ m.

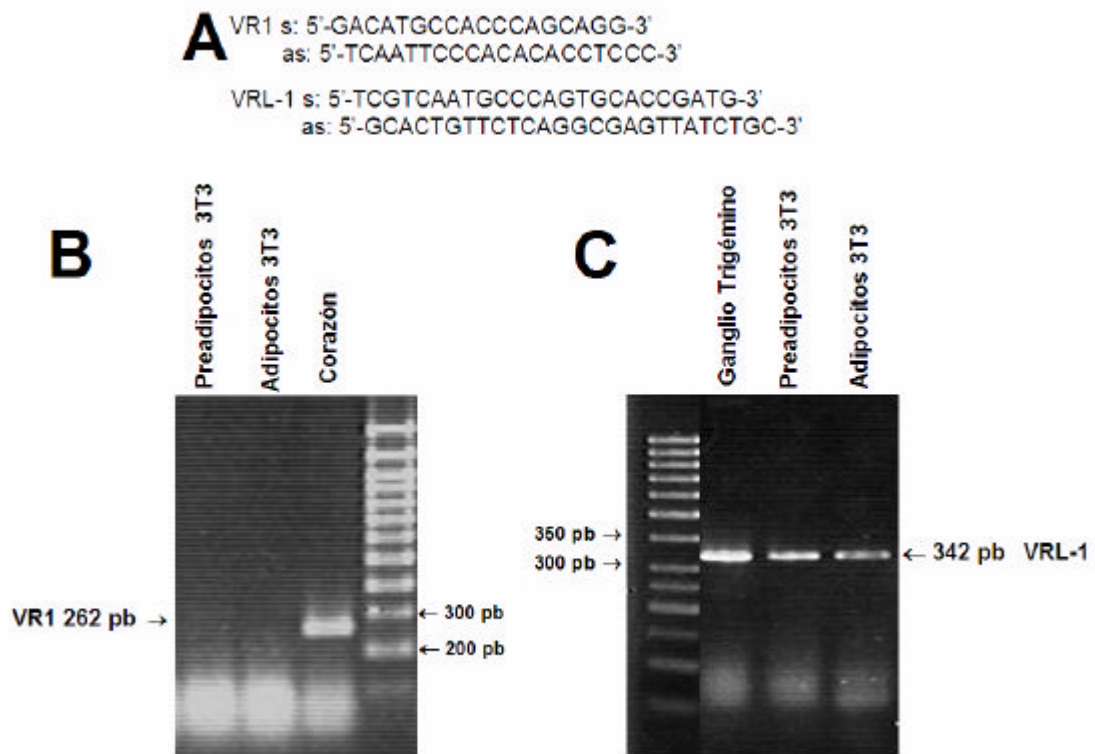


Figura 4. Expresión de mRNAs para los receptores vainilloides VR1 y VRL-1 en células 3T3-F442A. El RNA total de pre-adipocitos y adipocitos 3T3-F442A se aisló por el método del isotiocianato de guanidina. La expresión de los mRNAs para receptores vainilloides VR1 y VRL-1 se analizó mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos para cada receptor (A). Como controles positivos de la expresión de estos mensajeros se utilizó RNA total de corazón de rata para VR1 (B) y RNA total de ganglio trigémينو de rata para VRL-1 (C).

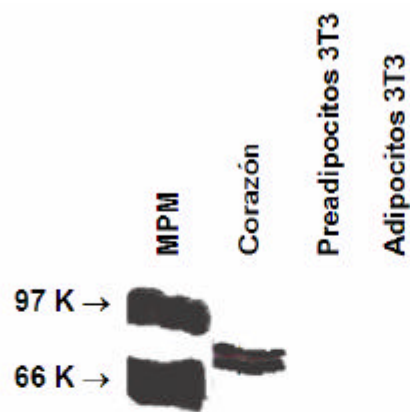


Figura 5. Expresión de la proteína VR1 en corazón de rata. La expresión del receptor VR1 en preadipocitos y adipocitos se realizó mediante Western blot con un anticuerpo policlonal contra VR1. La detección del anticuerpo primario se realizó con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa revelado con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno.