



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**EXPRESIÓN DE LOS CANALES TRPV EN LÍNEAS CELULARES
PREADIPOCÍTICAS 3T3. EL PAPEL DE TRPV1 EN LA
ANTIADIPOGÉNESIS POR CAPSAICINOIDES.**

Tesis que presenta

Raúl Loera Valencia

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis

Dr. Luis Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., Marzo de 2009



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Expresión de los canales TRPV en líneas celulares preadipocíticas 3T3. El papel de TRPV1 en la antiadipogénesis por capsaicinoides**" presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Raúl Loera Valencia** y aprobada el **27 de Marzo de 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Director de la tesis

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro.
Asesor de la tesis

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz.
Asesor de la tesis

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Salazar Olivo. Este trabajo fue financiado parcialmente con recursos del donativo CONACYT 2004-001-45804.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. de registro 204088).



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 060 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 27 días del mes de marzo del año 2009, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Raúl Loera Valencia

sobre la Tesis intitulada:

Expresión de los canales TRPV en líneas celulares preadipocíticas 3T3 y el efecto antiadipogénico de dos nuevos capsaicinoides

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 27 días del mes de marzo de 2009.

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

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



A mis padres Beatriz y Raúl.

A mi esposa Alma.

A mi familia.

Agradezco:

Al Dr. Luis Salazar Olivo por su asesoría en la realización de este trabajo.
A la Dra. Irene Castaño Navarro y a la Dra. Lina Riego Ruiz por sus valiosos comentarios.

Al Dr. José Romo Yáñez por sus enseñanzas en el laboratorio.

Al Dr. Ángel Alpuche Solíz por su apoyo en la realización de este trabajo.

A Rosa Espinoza Luna, Salvador Ambríz Granados y Rosalba Castillo Collazo por su apoyo técnico.

A todos mis compañeros.

ÍNDICE

Hoja de aprobación de la tesis.....	1
Dedicatorias.....	3
Agradecimientos.....	4
Lista de figuras.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Material y Métodos.....	14
Resultados	19
Discusión.....	23
Referencias	38

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Patrones de expresión y activación de los canales TRPV	31
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de RT-PCR para los genes de la familia TRPV	32
Tabla 3. Resumen de resultados	33
Figura 1. Expresión de canales TRPV en células 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4	34
Figura 2. Análisis de la presencia de las proteínas TRPV1, TRPV2 y TRPV4	35
Figura 3. C8 y C9 afectan el compromiso celular de células 3T3-L1	36
Figura 4. C8 y C9 afectan el compromiso celular de células 3T3-F442A	37

RESUMEN

Aunque se ha propuesto que el receptor-canal TRPV1 media la antiadipogénesis por capsaicinoides, los preadipocitos múridos 3T3-F442A, sensibles a capsaicina, no parecen expresar este receptor. Para estudiar el papel de los canales TRPV en células adiposas, analizamos la expresión de los genes *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv4*, *Trpv5* y *Trpv6* en las líneas celulares preadipocíticas 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4. Mediante RT-PCR detectamos los mensajeros de *Trpv1* y *Trpv2* en preadipocitos y adipocitos 3T3-L1 y para *Trpv4* sólo en adipocitos. 3T3-F442A, por su parte, no expresó el mensajero de *Trpv1* pero sí el de *Trpv2* y *Trpv4* en preadipocitos y adipocitos. Las células 3T3-F442A/C4 expresaron los mensajeros de *Trpv1* y de *Trpv4* en los dos estados de diferenciación y el de *Trpv2* sólo en adipocitos. Ninguna de las líneas celulares expresó los mRNAs de *Trpv5* ó *Trpv6*. Por Western blot confirmamos la presencia de TRPV1 y TRPV4 en preadipocitos y adipocitos 3T3-L1 y de TRPV2 en adipocitos de esta línea celular. Asimismo, confirmamos la ausencia de TRPV1 y la presencia de TRPV4 en ambos estados de diferenciación de 3T3-F442A y de TRPV2 en el estado adiposo de esta línea. También detectamos TRPV1 en preadipocitos 3T3-F442A/C4 aunque no logramos confirmar la presencia de la proteína TRPV2 en éstas células, que sí expresaron TRPV4 en ambos estados de diferenciación. Por otro lado, capsaicinoides naturales (capsaicina y resiniferatoxina) y sintéticos (C8 y C9) bloquearon de manera similar la adipogénesis de 3T3-L1 y 3T3-F442A. Nuestros resultados sugieren que TRPV1 es dispensable en la antiadipogénesis por capsaicinoides y que

TRPV2 y TRPV4 pueden jugar un papel en el metabolismo y desarrollo del tejido adiposo.

Palabras clave: capsaicinoides, adipogénesis, células adiposas, TRPV.

ABSTRACT

Although it has been proposed that TRPV1 mediates the antiadipogenesis by capsaicinoids, the capsaicinoid-sensitive 3T3-F442A preadipocytes does not seem to express this receptor-channel. To study the role of TRPV channels in adipose cells, we analyzed the expression of *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv4*, *Trpv5* and *Trpv6* in 3T3-L1, 3T3-F442A and 3T3-F442A/C4 preadipose cell lines. By RT-PCR we detected mRNA from *Trpv1* and *Trpv2* in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes and mRNA from *Trpv4* in the adipose stage. 3T3-F442A did not express *Trpv1*, but it expressed *Trpv2* and *Trpv4* in both differentiation forms. 3T3-F442A/C4 cells expressed *Trpv1* and *Trpv4* in both differentiation stages and *Trpv4* only in the adipose stage. None of these cell lines expressed *Trpv5* or *Trpv6*. By Western blot analyses we confirmed the presence of TRPV1 and TRPV4 in both differentiation forms of 3T3-L1, and TRPV2 only in the adipose stage. 3T3/F442A cells did not express TRPV1 but they expressed TRPV2 in adipocytes and TRPV4 in both differentiation stages. We also detected TRPV1 and TRPV4 proteins in both differentiation forms of 3T3-F442A/C4, but we couldn't confirm the TRPV2 presence in these cells. On the other hand, both natural (capsaicin and resiniferatoxin) or synthetic (C8 and C9) capsaicinoids similarly blocked 3T3-L1 and 3T3-F442A adipogenesis. Our results suggest that TRPV1 is dispensable for the antiadipogenesis by capsaicinoids and that TRPV2 and TRPV4 could play a role in adipose tissue development and metabolism.

Key words: capsaicinoids, adipogenesis, adipose cells, TRPV.

INTRODUCCIÓN.

La capsaicina (8-metil-*N*-vanillil-trans-6-nonenamida; CAP) y sus derivados, llamados genéricamente capsaicinoides, son los principales responsables de la pungencia de los frutos del chile (*Capsicum spp.*) (Holzer, 1991). Estas sustancias se componen de un anillo vainilloide unido a una cadena alifática hidrocarbonada a través de un enlace amida (Toh y cols., 1955). Los capsaicinoides excitan las fibras sensitivas del sistema nervioso periférico, las cuales median la sensación de dolor (Jancsó y cols., 1977).

Los efectos de CAP sobre el sistema nervioso en general están mediados por TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid-1*), un canal catiónico no selectivo con una alta permeabilidad al calcio, activado por capsaicinoides, por calor (>43° C) o por protones (pH 6.3) (Caterina y cols., 1997). TRPV1 forma parte de una familia de receptores-canal conocida como receptores vainilloides de potencial transitorio (TRPV; *Transient Receptor Potencial Vanilloid*) llamados así debido a su homología estructural con los canales TRP, inicialmente descritos en moscas de la fruta (Montell y Rubin, 1989). La familia TRPV debe su última sigla a la capacidad de TRPV1, el primero de sus miembros en ser descrito, de unir compuestos vainilloides como la capsaicina. Estudios adicionales permitieron identificar otros miembros de esta familia de canales: TRPV2 (Kanzaki y cols., 1999), TRPV3 (Peier y cols., 2002), TRPV4 (Strotmann y cols., 2000), TRPV5 (Hoenderop y cols., 1999) y TRPV6 (Peng y cols., 1999). Aunque se agrupan en la familia de receptores vainilloides, se acepta

generalmente que salvo TRPV1, ninguno de los canales restantes responden a capsaicinoides y sí a una gran variedad de estímulos externos como calor inocuo (20-30° C), cambios osmóticos y presencia de alcanfor entre otros estímulos (Tabla 1). Por ello, la ubicación de todos estos canales en la familia de receptores vainilloides responde hasta ahora a criterios meramente estructurales. Por lo demás, la expresión de los canales TRPV, inicialmente descritos en neuronas, se conoce ahora en múltiples tipos celulares no neurales como los hepatocitos (Sanchez y cols., 2001; Miao y cols., 2008), células epiteliales (Stein y cols., 2004), queratinocitos (Denda y cols., 2001) y más recientemente en células adiposas (Zhang y cols., 2007).

Los capsaicinoides también afectan el metabolismo energético y el desarrollo del tejido adiposo en animales de laboratorio (Kawada y cols., 1986; Melnyk y Himms-Hagen, 1995; Kobayashi y cols., 2001; Ohnuki y cols., 2001). En ratas Wistar adultas alimentadas con una dieta alta en grasa (30% p/p), la CAP previno el aumento de depósitos de tejido adiposo y de triglicéridos plasmáticos (Kawada y cols., 1986). Asimismo, la administración subcutánea crónica de CAP a ratas Sprague-Dawley disminuyó la acumulación de tejido adiposo abdominal (Melnyk y Himms-Hagen, 1995). Por otro lado, la evodiamina, un alcaloide con efectos neurales similares a la capsaicina, redujo significativamente la acumulación de grasa perirenal en ratones (Kobayashi y cols., 2001) y el capsiato, un capsaicinoide no pungente, disminuyó igualmente la acumulación de grasa corporal en esta especie (Ohnuki y cols., 2001). También se sabe que la adición de CAP a la dieta humana incrementa la

oxidación metabólica de la grasa (Lejeune y cols., 2003) sin alterar la ingesta de alimentos (Yoshioka y cols., 2004).

Trabajos más recientes realizados con cultivos celulares mostraron que los capsaicinoides afectan el metabolismo lipídico actuando directamente sobre células adiposas como las de la línea preadipocítica murina 3T3-L1 (Hwang y cols., 2005; Hsu y Yen, 2007). Dado que las células 3T3-L1 expresan el mensajero de *Trpv1*, se propuso que éste receptor es el mediador de los efectos antiadipogénicos de los capsaicinoides (Zhang y cols., 2007). La expresión de *Trpv1* en estas células se reduce a medida que avanzan en su diferenciación adiposa. La CAP previno tal disminución e impidió la acumulación de triglicéridos intracitoplásmicos (Zhang y cols., 2007). Estos trabajos sugieren que los capsaicinoides no sólo afectan el metabolismo energético, sino también la diferenciación del tejido adiposo a través de TRPV1.

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la resiniferatoxina (RTX), un capsaicinoide ultrapotente, inhibió la adipogénesis de las células 3T3-F442A en función de la concentración y de manera reversible. Estas células no expresaron TRPV1 pero sí el receptor TRPV2, tanto en preadipocitos como en adipocitos maduros (Silva-Ortega, 2004). Este trabajo sugirió que TRPV1 no es el mediador exclusivo de la antiadipogénesis por capsaicinoides y que otros receptores pudieran estar presentes en el tejido adiposo y participar en su funcionamiento. Diversas investigaciones han mostrado que otros miembros de la familia TRPV pueden auxiliar o incluso sustituir las funciones de TRPV1. Ratones mutados en el gen *Trpv4* son

altamente insensibles a la hiperalgesia e inflamación producida por CAP (Todaka y cols., 2004). Por otro lado, la activación de la señal dolorosa por la sobreexpresión del mRNA de *Trpv3* en respuesta al calor nocivo sugiere funciones compartidas entre TRPV1 y TRPV3 (Huang y cols., 2008). Otro trabajo mostró que la localización de TRPV2 en fibras nociceptoras cutáneas puede mediar la detección de calor nocivo en lugar de TRPV1 (Lawson y cols., 2008). Además existe evidencia de que la CAP induce la apoptosis de células humanas de cáncer gástrico a través de TRPV6 en lugar de TRPV1, ya que la sobreexpresión del primero incrementó la tasa de muerte celular, mientras que su delección abolió dicho efecto (Chow y cols., 2007). Sin embargo, se desconoce la participación de canales TRPV distintos de TRPV1 en el efecto antiadipogénico de los capsaicinoides.

Para caracterizar a mayor detalle el papel de los receptores TRPV en la biología del tejido adiposo, analizamos la expresión de los canales TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPV5 y TRPV6 en las líneas celulares preadipocíticas 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4. Adicionalmente, evaluamos el potencial antiadipogénico de dos nuevos capsaicinoides sintéticos, la N-vainillilamina del ácido octanóico (C8) y la N-vainillilamina del ácido nonanóico (C9) sobre las líneas celulares 3T3-L1 y 3T3-F442A, las cuales difieren en la expresión del mensajero de *Trpv1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR.

3T3-L1.

Indujimos cultivos postconfluentes de preadipocitos 3T3-L1 a la diferenciación con medio de inducción (MI), que consistió en medio L-15 adicionado con 10% de suero fetal bovino (HyClone), insulina 5 µg/ml, isobutilmetil xantina 0.1 mM y dexametasona 1 µM (Herrera-Herrera y cols., 2008). Ensayamos el efecto de los capsaicinoides en este medio empleando una concentración cercana a la dosis efectiva media reportada para estos compuestos (10 µM). Los capsaicinoides sintéticos C8 y C9 fueron una generosa donación del Dr. Agustín López Munguía del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Luego de 48 horas, sustituimos el MI, sólo o adicionado con los capsaicinoides, por medio de mantenimiento (MM), consistente en medio L-15 adicionado con 10% de suero de ternera (HyClone), insulina 5 µg/ml, D-biotina 1 µM y D-glucosa 1 g/l. Mantuvimos los cultivos en estas condiciones por 7 días, con cambio de medio cada tercer día hasta la diferenciación total. Los medios no adipogénico (MNA) y medio basal (MB) consistieron en medio L-15 suplementado con 10% de suero de ternera (Herrera-Herrera y cols., 2008).

3T3-F442A y 3T3-F442A/C4.

Indujimos cultivos preconfluentes de preadipocitos 3T3-F442A y 3T3F442A/C4 a la diferenciación con medio adipogénico (MA) consistente en medio L-15 adicionado con 10% de suero de ternera, insulina 5 µg/ml y D-

glucosa 1 g/l (Herrera-Herrera y cols., 2008). Ensayamos el efecto de los capsaicinoides sobre estas líneas celulares como se describió para las células 3T3-L1. Luego de 72 h de inducción, reemplazamos el MA por MNA, consistente en medio L-15, 2% de suero de gato, 0.2% de suero de ternera, insulina 5 µg/ml, D-biotina 1 µM, transferrina 5 µg/ml, triyodotironina 1 nM, 2-mercaptoetanol 40 µM y factor de crecimiento epidérmico 0.1 ng/ml (Salazar-Olivo y cols, 1995; Herrera-Herrera y cols., 2008). Mantuvimos las células en estas condiciones, con cambio de medio cada tercer día, durante 7 días hasta la completa diferenciación en adipocitos.

CUANTIFICACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN ADIPOSA.

Cuantificamos la diferenciación adiposa de los distintos tratamientos por el método de tinción con rojo oleoso (Ramírez-Zacarías y cols., 1992). Brevemente, fijamos las monocapas celulares con formaldehído al 4% en PBS y teñimos con una solución saturada de rojo oleoso O (Sigma Chem.) durante 4 h a fin de cuantificar la acumulación de triglicéridos. Estimamos el 100% de la diferenciación adiposa restando la absorbencia obtenida en el tratamiento con MNA (acumulación lipídica de fondo) a la absorbencia del tratamiento con MA (máxima acumulación lipídica). Estimamos el porcentaje de diferenciación en los tratamientos restantes mediante la siguiente 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

Extrajimos el RNA total de preadipocitos y adipocitos de las líneas celulares estudiadas, así como de corazón, testículo, riñón y cerebro de ratones macho C57 (Harlan), utilizando Trizol (Invitrogen). Sintetizamos el cDNA a partir de 6 µg de RNA total usando transcriptasa reversa (Promega) en presencia de oligo(dT), u oligonucleótidos de secuencias generadas al azar, durante 1 hora a 42 ° C ó 37° C, respectivamente. Realizamos la PCR en mezclas de reacción (25 µl) con 100 ó 200 ng del cDNA de los tejidos control ó cDNA procedente de las líneas celulares, dNTPs 0.2 µM, MgCl 2.2 µM, una unidad de Taq DNA polimerasa y 35 pmoles de oligonucleótidos específicos para los mensajeros de *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv3*, *Trpv4*, *Trpv5* ó *Trpv6*. Las secuencias de los oligonucleótidos para cada canal TRPV, así como su temperatura de alineamiento se enumeran en la Tabla 2. Verificamos la especificidad los oligonucleótidos diseñados utilizando el programa FastPCR (Primer Digital Ltd.). Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 seg a 94 °C, 30 seg a la temperatura de alineamiento de cada par de oligonucleótidos empleados (Tabla 2), 1 min a 72 °C durante 40 ciclos y extensión final a 72 °C durante 5 min. Analizamos los productos de amplificación

por electroforesis en geles de agarosa al 2.5 % en amortiguador TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml). Obtuvimos las imágenes de los geles con un documentador ChemiDoc EQ (Bio-Rad).

WESTERN BLOT.

Obtuvimos las fracciones membranales de preadipocitos y adipocitos maduros de las diferentes líneas celulares, como se describió previamente (McKeel y Jarett, 1970; Li y cols, 2007). Brevemente, resuspendimos las células en amortiguador Tris-EDTA (Tris base 250 mM, pH 8, EDTA 1 mM, Inhibidor de proteasas Complete® de Roche, de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y sonicamos a 4° C con 3 pulsos de 10 segundos a 60 Hz. Centrifugamos las muestras sonicadas a 3000xg por 15 minutos y recuperamos los sobrenadantes, luego de eliminar la grasa en las preparaciones de adipocitos, para centrifugarlos nuevamente a 12000xg por 25 minutos. Resuspendimos los sedimentos resultantes (la fracción membranal) en Medio I (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM, pH 7.4).

Analizamos las fracciones membranales de las diferentes líneas celulares por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, transferimos las proteínas a una membrana de nitrocelulosa HyBond (Amersham Biosci.). Confirmamos la correcta transferencia tiñendo con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau 0.1% p/v; ácido acético 5%). Luego bloqueamos la membrana desteñida con una solución de leche libre de grasas al 5% en TBS-T (Tris base 100 mM pH 8, NaCl 1.5 M y

Tween 20 al 0.5%) e incubamos durante una noche con anticuerpos policlonales contra TRPV1, TRPV2 ó TRPV4 (IgG generadas en conejo, Alomone Labs) diluidos 1:500. Después lavamos las membranas con TBS-T en tres ocasiones durante cinco minutos cada vez y las incubamos durante 1 hora con una dilución 1:8000 de un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (IgG anti-conejo, Sigma). Lavamos las membranas con TBS-T tres veces durante cinco minutos cada vez. Observamos la actividad de la enzima con el sustrato líquido 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) para TRPV1, y con el sistema de quimioluminiscencia ECL-PLUS (G.E. Healthcare) para TRPV2 y TRPV4. Realizamos el análisis de las imágenes con el fotodocumentador Chemi-Doc EQ (BioRad) y el software Quantity One de la misma compañía. Determinamos el peso de las bandas usando marcadores de peso molecular preteñidos Precision Plus (Bio-Rad) y el software Kodak Digital Science (Kodak).

RESULTADOS.

Las células 3T3 expresan diversos tipos de receptores TRPV.

Generalmente se acepta que el canal TRPV1 media los efectos de los capsaicinoides sobre células animales, aunque otros miembros de la familia TRPV podrían también mediar los efectos de estos compuestos. Dado que la CAP y la RTX bloquean la adipogénesis de líneas celulares que expresan o no el canal TRPV1, y puesto que se desconoce la expresión de los diferentes canales TRPV en el tejido adiposo, analizamos mediante RT-PCR la expresión de los seis canales de la familia TRPV en los estadios preadipocítico o terminalmente diferenciado de las células 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4. Mediante esta estrategia logramos detectar el mRNA de cinco miembros de la familia de receptores: *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv4*, *Trpv5* y *Trpv6*. No logramos estandarizar las condiciones para la detección del mRNA de *Trpv3* mediante RT-PCR.

Los análisis de RT-PCR nos permitieron confirmar que el mensajero de *Trpv1* está presente tanto en la forma preadipocítica como en la de adipocitos maduros de células 3T3-L1, como se describió previamente (Zhang y cols., 2007) (Figura 1). Adicionalmente detectamos la expresión del mensajero de *Trpv2* en ambos estados de diferenciación de estas células y del mRNA de *Trpv4* sólo en el estadio de adipocitos maduros. Las células 3T3-L1 no expresaron mensajeros de *Trpv5* ni de *Trpv6* en ninguno de los estados de diferenciación (Figura 1).

En las células 3T3-F442A encontramos productos de PCR correspondientes al mRNA de *Trpv2* y *Trpv4*. Confirmamos la presencia del mensajero de *Trpv2* en fibroblastos y adipocitos maduros de las células 3T3-F442A, como se había reportado previamente (Silva-Ortega, 2004). Además, encontramos que *Trpv4* se expresa en ambos estados de diferenciación de ésta línea. Bajo las condiciones empleadas, no detectamos la expresión de los mensajeros de *Trpv1*, *Trpv5* ó *Trpv6* en ninguno de los estadios de diferenciación de las células 3T3-F442A (Figura 1).

En la línea celular 3T3-F442A/C4 detectamos la expresión de *Trpv1* en los estadios de preadipocito y adipocito terminal. Encontramos además que estas células expresaron a *Trpv2* sólo en adipocitos maduros. Asimismo, obtuvimos un producto que corresponde a *Trpv4* en ambos estados de diferenciación (Figura 1).

Para verificar si los mensajeros encontrados previamente se traducen en proteínas, analizamos fracciones membranales provenientes de células 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4 por Western blot. Así confirmamos la presencia de TRPV1 en los dos estados de diferenciación de 3T3-L1, ya que obtuvimos una banda de aproximadamente 110 kDa en cada caso. Encontramos a TRPV2 –con un tamaño de banda de 60 kDa- sólo en los adipocitos maduros de esta línea. Hallamos también una banda correspondiente a TRPV4, de aproximadamente 75 kDa, en los dos estados de diferenciación (Figura 2).

En las células 3T3-F442A no observamos bandas correspondientes a TRPV1 en ninguno de los dos estados de diferenciación. Encontramos una

banda correspondiente a TRPV2 en fracciones membranales de adipocitos terminalmente diferenciados, la cual no logramos observar en muestras provenientes de preadipocitos. Detectamos también una banda de 75 kDa para el caso de TRPV4, la cual se presentó en muestras provenientes de ambos estados de diferenciación. Observamos, en el mismo ensayo, una banda adicional de un tamaño aproximado a 63 kDa, la cual se encontró tanto en preadipocitos como en adipocitos maduros de ésta línea celular (Figura 2).

Aunado a lo anterior, hallamos una banda correspondiente a TRPV1 en preadipocitos de células 3T3-F442A/C4, mientras que en adipocitos maduros no la pudimos detectar. La presencia de TRPV2 en estas células no pudo ser confirmada debido a un problema de transferencia o de bloqueo en estas muestras. Por último, encontramos una banda correspondiente a TRPV4 en ambos estados de diferenciación. Observamos también una banda adicional de 63 kDa, por debajo del peso esperado para TRPV4 en ambos estadios de diferenciación (Figura 2). Una síntesis de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 3.

El canal TRPV1 es dispensable para la antiadipogénesis por capsaicinoides.

Nuestros resultados anteriores mostraron que el canal TRPV1, el putativo mediador de la antiadipogénesis de los capsaicinoides, se expresa en las células 3T3-L1 pero no en las células 3T3-F442A. Para constatar la participación de este receptor en la antiadipogénesis por capsaicinoides evaluamos los efectos

de CAP y RTX, dos capsaicinoides naturales probadamente antiadipogénicos, y de C8 y C9, dos nuevos capsaicinoides sintéticos, sobre la diferenciación de estas dos líneas celulares preadipocíticas. Para ello aplicamos los capsaicinoides a los cultivos celulares durante el período del establecimiento del compromiso a la diferenciación (las primeras 48 h de postconfluencia en presencia de medio adipogénico) y evaluamos la acumulación lipídica en los cultivos luego de 7 días de incubación en medio de mantenimiento. Como se aprecia en la figura 3, la RTX inhibió la adipogénesis de las células 3T3-L1 en 64%. Para éstas células la inhibición efectuada por C8 fue de 55.7%, menor estadísticamente que el tratamiento con RTX; mientras que C9 inhibió la acumulación de lípidos en un 44.8% sin ser estadísticamente diferente al tratamiento con RTX. En la línea celular 3T3-F442A, la CAP inhibió la adipogénesis de células 3T3-F442A en 79% (Figura 4). En estas células, la inhibición efectuada por C8 y C9 fue del 82% para los dos compuestos, sin haber diferencias estadísticamente significativas entre C8, C9 y CAP pero sí contra el control positivo.

DISCUSIÓN

Desde la década de 1980 se sabe que los capsaicinoides afectan el metabolismo energético de mamíferos, pero la evidencia de su acción directa sobre los adipocitos es reciente (Silva-Ortega, 2004; Hwang y cols., 2005; Hsu y Yen, 2007; Zhang y cols., 2007) y sus mecanismos de acción aún controversiales. Un trabajo inicial mostró que la capsaicina inhibe la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 a través de la protein-cinasa activada por AMP (Hwang y cols., 2005). Otro reporte señaló que la capsaicina inhibe la adipogénesis de células 3T3-L1 afectando la actividad de la enzima lipogénica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Hsu y Yen, 2007). Un trabajo más mostró que TRPV1, el putativo mediador de los efectos neurales de los capsaicinoides, está presente en células 3T3-L1 y en adipocitos viscerales normales, murinos y humanos, y sugirió que este canal media los efectos antiadipogénicos de los capsaicinoides (Zhang y cols., 2007). No obstante, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la resiniferatoxina bloquea la adipogénesis de la línea celular 3T3-F442A, la cual no expresó el mensajero de *Trpv1* en ninguno de sus estadios de diferenciación pero sí el mensajero y la proteína de *Trpv2* (Silva-Ortega, 2004), un canal altamente similar a TRPV1 (50% de similitud entre las dos secuencias de aminoácidos) pero al parecer insensible a los capsaicinoides (Caterina y cols., 1999).

Para aclarar esta aparente contradicción y profundizar en el conocimiento de los mecanismos que median la acción de los capsaicinoides sobre el tejido adiposo, analizamos la expresión de los miembros de la familia TRPV en tres

líneas de preadipocitos 3T3 en su forma no diferenciada y como adipocitos. Salvo TRPV3, para el cual no pudimos estandarizar las condiciones de detección por RT-PCR, evaluamos mediante ésta técnica la expresión de los genes *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv4*, *Trpv5* y *Trpv6* en las líneas celulares 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4. Asimismo, mediante ensayos de Western blot confirmamos la presencia de TRPV1 en preadipocitos y adipocitos de las líneas 3T3-L1 y 3T3-F442A/C4. Detectamos también a TRPV2 en los adipocitos de las líneas celulares 3T3-L1 y 3T3-F442A, mientras que detectamos a TRPV4 en preadipocitos y adipocitos de las tres líneas celulares estudiadas.

Los análisis de RT-PCR nos permitieron detectar la expresión de *Trpv1* en preadipocitos y adipocitos de la línea 3T3-L1, como reportaron Zhang y cols. (2007), así como su ausencia en la línea celular 3T3-F442A, lo que reafirmó evidencias previas de nuestro grupo (Silva-Ortega, 2004). Adicionalmente, nuestros resultados mostraron que 3T3-F442A/C4, una línea clonal derivada de 3T3-F442A, expresa el mRNA de *Trpv1* en preadipocitos y adipocitos. Estos resultados se confirmaron en ensayos de Western blot, mediante los cuales detectamos a TRPV1 en los dos estadios de la línea 3T3-L1, en ningún estadio de las células 3T3-F442A, y en preadipocitos de 3T3-F442A/C4, concordando con los resultados obtenidos por RT-PCR.

Mediante RT-PCR detectamos también el mensajero para *Trpv2* en ambos estadios de las células 3T3-L1 y 3T3-F442A. La expresión de *Trpv2* fue más intensa en los preadipocitos 3T3-L1 que en los adipocitos de esta línea, mientras que en las células 3T3-F442A la expresión de *Trpv2* fue más intensa

en el estado diferenciado que en la etapa de preadipocito. Por otro lado, las células 3T3-F442A/C4 no expresaron el mRNA de *Trpv2* en la etapa de preadipocito pero si en el estado adiposo.

Los ensayos de Western blot revelaron que el canal TRPV2 se encuentra presente en las formas diferenciadas de las líneas celulares 3T3-L1 y 3T3-F442A. Aunque el mRNA de *Trpv2* se presentó en los dos estados de diferenciación de 3T3-L1 y 3T3-F442A, la proteína TRPV2 no se detectó en los preadipocitos de estas líneas. La ausencia de la proteína TRPV2 en los preadipocitos 3T3-L1 y 3T3-F442A podría deberse a que en los ensayos de Western blot usamos fracciones membranales. En condiciones basales, el canal TRPV2 se localiza principalmente en depósitos intracelulares y se trasloca a la membrana plasmática luego de la estimulación con IGF-1 (Kanzaki y cols., 1999) o insulina (Hisanaga y cols., 2009). Ambas proteínas son importantes moduladores de la adipogénesis (Smith y cols., 1988; Guller y cols., 1988) y se encuentran en concentraciones apreciables en los medios con que se induce la diferenciación adiposa, pero no está en los medios basales donde proliferan los preadipocitos de las diferentes líneas 3T3. La unión del anticuerpo a los carriles correspondientes a células 3T3-F442A/C4 fue inespecífica ya que además de unirse a las bandas con el peso esperado para TRPV2, se diseminó en toda un área de la membrana. Lo anterior es evidencia de un defecto en la transferencia o el bloqueo de esa región, por lo cual no logramos confirmar la presencia de la proteína TRPV2 en ningún estadio de diferenciación de éstas células.

El receptor TRPV2 está presente en el tejido nervioso, principalmente en las neuronas del ganglio dorsal, donde media la sensación de calor nocivo ($>52^{\circ}\text{C}$) (Caterina y cols., 1999). TRPV2 se encuentra también en músculos estriados y cardiacos, los cuales desarrollan distrofia y cardiomiopatía asociadas a la sobreexpresión del gen *Trpv2* (Iwata y cols., 2003). Los trabajos anteriores muestran que TRPV2 se expresa en músculo esquelético, un tejido con origen embrionario común al tejido adiposo (Buranasinsup y cols., 2006). La presencia de TRPV2 en las líneas preadipocíticas 3T3-L1 y 3T3-F442A sugiere que este canal desempeña una función metabólica en el tejido adiposo. La participación de TRPV2 en el metabolismo adiposo parece reforzada por el hallazgo de que *tranilast*, un agente antifibrinógeno que bloquea en forma específica a TRPV2 en células pancreáticas (Hisanaga y cols., 2009), también disminuye el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica (Uno y cols., 2008), una afección cuyo rasgo es el incremento de grasa hepática. En futuros experimentos abordaremos la función de TRPV2 en el tejido adiposo, ya sea mediante el silenciamiento de este canal en células 3T3-F442A o bien empleando compuestos que modulen su funcionamiento. A la fecha se conocen varios activadores para este canal como el cannabidiol (Qin y cols., 2008), y el péptido quimiotáctico fMetLeuPhe, el cual activa la traslocación de TRPV2 hacia la membrana plasmática (Nagasawa y cols., 2007). También se conocen bloqueadores para TRPV2 como el gadolinio $3+$ (Leffler y cols., 2007), el cual también parece bloquear a TRPV4 (Becker y cols., 2005), y el fármaco *tranilast* (Hisanaga y cols., 2009) ya mencionado.

El mRNA de *Trpv4* se presentó también en ambos estadios de las tres líneas celulares excepto en los preadipocitos de 3T3-L1, aunque sí encontramos a TRPV4 en preadipocitos de esta línea por Western blot. Esto sugiere que deberemos mejorar nuestros ensayos para la detección del mensajero de TRPV4 en este estadio de 3T3-L1. En la figura 2 apreciamos dos manchas por debajo de cada una de las bandas que corresponden a TRPV4 en las 3 líneas celulares. La mancha señalada tiene el peso esperado para TRPV4, pero la banda debajo no corresponde a ninguna formación multimérica conocida. Más bien parece pertenecer a una de las 5 variantes de edición conocidas para TRPV4 (Arniges y cols., 2006). El análisis realizado con el software Kodak Digital Science indica que el peso de la banda inferior es de aproximadamente 63 KDa, lo cual está en relación a la variante TRPV4B, que carece del exón seis ($\Delta 384-444$ aa); o a TRPV4E que carece de los exones cinco y siete, perdiendo 107 aa en total. Además, cabe mencionar que ambas formas de edición pierden al menos un sitio de glicosilación en cada caso (Asn^{651}), lo cual puede alterar su patrón de migración en el ensayo SDS-PAGE (Buck y cols., 2007).

La expresión del mensajero de *TRPV4* está documentada en tejido adiposo (Liedtke y cols., 2000), así como en queratinocitos humanos HaCaT (Becker y cols., 2005). En este último tipo celular, TRPV4 colocaliza con filamentos de actina y la desestabilización de éstos suprime tal colocalización (Becker y cols., 2008). El hecho de que la desestabilización del citoesqueleto de actina también estimule la adipogénesis (Meyers y cols., 2005), y su

estabilización la retarde (Castro-Muñozledo y cols., 1987), sugiere que TRPV4 puede desempeñar un papel importante durante la diferenciación adiposa.

Por el contrario, ninguna de las tres líneas celulares expresó los mRNAs para *Trpv5* o *Trpv6*, bajo ninguna de las condiciones de diferenciación. La expresión de estos canales se ha descrito mayormente en células epiteliales sensibles a vitamina D, donde median el influjo de calcio y son, por lo tanto, esenciales para el mantenimiento del balance corporal de este elemento. El canal TRPV5 se localiza en la membrana apical epitelial de los túbulos renales distales, donde juega un papel importante en la regulación de la reabsorción transepitelial de calcio en el riñón (Flockerzi, 2007). Sin embargo, este canal se ha reconocido también en tejidos de origen mesodérmico como el hueso. En éste, *TRPV5* se expresa en osteoclastos y participa en la resorción ósea, aunque es probable que no juegue un papel relevante en la formación misma del hueso, puesto que no parece expresarse en osteoblastos (van der Eerden y cols., 2005). Por su parte el canal TRPV6, inicialmente descrito en células de epitelio intestinal (Peng y cols., 1999), se presenta también en otros tejidos regulados por la vitamina D como riñón (Hoenderop y cols., 1999) y epidermis (Weber y cols., 2001). Con todo, mensajeros de *Trpv6* se han detectado también en tejidos de origen mesodérmico como hueso, corazón y músculo esquelético (Peng y cols., 1999). Nuestros resultados sobre la ausencia de expresión de los canales TRPV5 y TRPV6 en las líneas celulares preadipocíticas 3T3 sugieren que estos canales no juegan un papel fundamental en el metabolismo y el desarrollo del tejido adiposo.

Aunque se ha sugerido que TRPV1 media los efectos antiadipogénicos de los capsaicinoides (Zhang y cols., 2007), resultados previos de nuestro laboratorio desafían tal mecanismo (Silva-Ortega, 2004). Por ello, dado que las líneas celulares 3T3-L1 y 3T3-F442A difieren en la expresión de dicho canal, evaluamos los efectos de la capsaicina, la resiniferatoxina y dos nuevos capsaicinoides sintéticos C8 y C9 (Castillo y cols., 2007), sobre la adipogénesis de estas células. Realizamos dichos experimentos aplicando los capsaicinoides al medio adipogénico durante el establecimiento del compromiso a la diferenciación, para precisar si los compuestos ensayados afectaban dicho establecimiento. Nuestros resultados mostraron que todos los capsaicinoides ensayados bloquearon la adipogénesis de las dos líneas celulares, sugiriendo con ello que el canal TRPV1 es dispensable para la acción antiadipogénica de los capsaicinoides. Dado que se mostró que otros miembros de la familia TRPV pueden mediar los efectos de la CAP además de TRPV1 (Todaka y cols., 2004; Chow y cols., 2007), es posible que TRPV2 ó TRPV4 intervengan en la inhibición de la adipogénesis por capsaicinoides. Nuestros resultados sugieren además que el efecto antiadipogénico de los capsaicinoides actúa durante el compromiso a la diferenciación adiposa. En este sentido los capsaicinoides se asemejan a otros compuestos antiadipogénicos como el ácido retinóico (Kuri-Harcuch, 1982) o el TGF- β (Ignatz y Massagué, 1985). Nuestros resultados mostraron también que los nuevos capsaicinoides sintéticos C8 y C9 tienen una actividad antiadipogénica similar a la de CAP y RTX, por lo que pueden ser usados como herramientas en el estudio de la diferenciación del tejido adiposo.

En conclusión, mostramos por primera vez que las líneas celulares 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4 expresan los receptores TRPV2 y TRPV4, y que no expresan los receptores TRPV5 y TRPV6. Confirmamos resultados previos de nuestro laboratorio que indican que las células 3T3-F442A no expresan el receptor TRPV1 y sin embargo son inhibidas en su diferenciación adiposa por capsaicinoides de manera similar a la línea 3T3-L1 que sí expresa a éste receptor. Finalmente, mostramos que los capsaicinoides sintéticos C8 y C9 tienen una actividad antiadipogénica sobre las líneas 3T3-L1 y 3T3-F442A, similar a la que presentan la CAP y RTX. Estos resultados sugieren que TRPV1 es dispensable para el efecto de los capsaicinoides sobre la adipogénesis, mientras que TRPV2 y TRPV4 pueden cumplir una función metabólica importante sobre este proceso. Investigaciones adicionales que aprovechen el uso de agonistas y antagonistas específicos, modulen la expresión de estos canales y usen nuevos capsaicinoides permitirán aclarar la función de los canales TRPV2 y TRPV4 en el desarrollo y metabolismo del tejido adiposo.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado parcialmente con fondos de CONACYT (Donativo 2004-C01-45804). Agradecemos al Dr. Agustín López-Munguía del Instituto de Biotecnología de la UNAM el donativo de los capsaicinoides sintéticos usados en este trabajo. Este trabajo se realizó con la valiosa participación del Dr. José Romo Yáñez. Adicionalmente agradecemos al CONACYT por la beca académica otorgada para realizar esta investigación (no. de registro 204088).

Tabla 1. Patrones de expresión y activación de los canales TRPV.

Receptor	Estímulo	Activación por capsaicinoides	Expresión en células y tejidos	Referencia
TRPV1	Calor nocivo (>43° C) Protones (pH 6.3)	Sí	Cerebro (neuronas del ganglio dorsal, hipocampo, corteza cerebral, astrocitos), Hígado (hepatocitos), Testículos (órgano completo y células de Sertoli), Piel (queratinocitos) Vejiga (células epiteliales), Grasa visceral	Denda y cols., 2001 Miao y cols., 2002 Stein y cols., 2004 Lee y Caterina, 2005 Kunert-Keil y cols., 2006 Zhang y cols., 2007 Auzanneau y cols., 2008
TRPV2	Calor nocivo (>52° C) Cambios en la tensión membranal por presión osmótica ó estiramiento	No	Cerebro (neuronas del ganglio dorsal, neuronas sensitivas), Músculo (Miocitos vasculares y alveolares), Intestino (Inmunotinción del duodeno), Macrófagos alveolares	Kowase y cols., 2002 Iwata y cols., 2003 Muraki y cols., 2003 Lee y Caterina, 2005
TRPV3	Calor inocuo (>31° C) Alcanfor	No	Cerebro (neuronas del ganglio dorsal) Piel (queratinocitos)	Peier y cols., 2002 Smith y cols., 2002
TRPV4	Calor inocuo (>25° C) Cambios osmóticos Cambios en la tensión membranal por contacto	No	Cerebro (neuronas del ganglio dorsal), Corazón (cardiomocitos), Hígado (colangiocitos), Riñón (epitelio de túbulos distales), Piel (queratinocitos), Músculo (Miocitos de vías respiratorias), Tejido adiposo	Liedtke y cols., 2000 Liedtke y cols., 2003 Lee y Caterina, 2005 Moqrich y cols., 2005 Armiges y cols., 2005 Kunert-Keil y cols., 2006 Gradilone y cols., 2007
TRPV5	Activo constitutivamente	No	Riñón (epitelio de transporte), Pulmones (órgano completo), Páncreas (células beta), Testículos (órgano completo)	Hoenderop y cols., 1999 Müller y cols., 2000 Janssen y cols., 2002 Kunert-Keil y cols., 2006
TRPV6	Activo constitutivamente	Sí (en células de cáncer gástrico)	Riñón (Epitelio de transporte), Intestino delgado y duodeno (Células epiteliales)	Peng y cols., 1999 Chow y cols., 2007

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de RT-PCR para los genes de la familia TRPV.

Gen	Oligonucleótido	Temperatura de alineamiento (°C)	Número de acceso (GenBank)	Producto (bp)
<i>Trpv1</i>	5'-gtaatgctgtctggccctttagt-3' 5'-ctgactgacagcgagttcaaagac-3'	55.5	NM_001001445	190
<i>Trpv2</i>	5'-ttccagtgaggccttctgtgtat-3' 5'-tgaatctcaactaccgaaaggac-3'	55.5	NM_011706	184
<i>Trpv4</i>	5'-cgtgaacaagtcttgatactgg-3' 5'-cttctacatcaacgtggctccta-3'	52.6	NM_022017	193
<i>Trpv5</i>	5'-gggaggcatatgtaatgatgatga-3' 5'-caggaagcatatgtgacttaccag-3'	56.6	NM_001007572	184
<i>Trpv6</i>	5'-ggacaaagggtgctctccatagta-3' 5'-aactgggccgtgctctgcttg-3'	58	NM_022413	114
<i>Actina</i>	5'-ttgtaaccaactgggacgatatgg-3' 5'-gatcttgatcttcatgggctagg-3'	60	NM_007393	1 kb

Tabla 3. Síntesis de los resultados obtenidos para los canales TRPV.

RT-PCR	3T3-L1		3T3-F442A		3T3-F442A/C4	
	PA	A	PA	A	PA	A
<i>Trpv1</i>	+	+	-	-	+	+
<i>Trpv2</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Trpv4</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Trpv5</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Trpv6</i>	-	-	-	-	-	-

Western Blot

TRPV1	+	+	-	-	+	-
TRPV2	-	+	-	+	ND*	ND*
TRPV4	+	+	+	+	+	+

* ND. Hace referencia a los resultados que no fueron concluyentes.

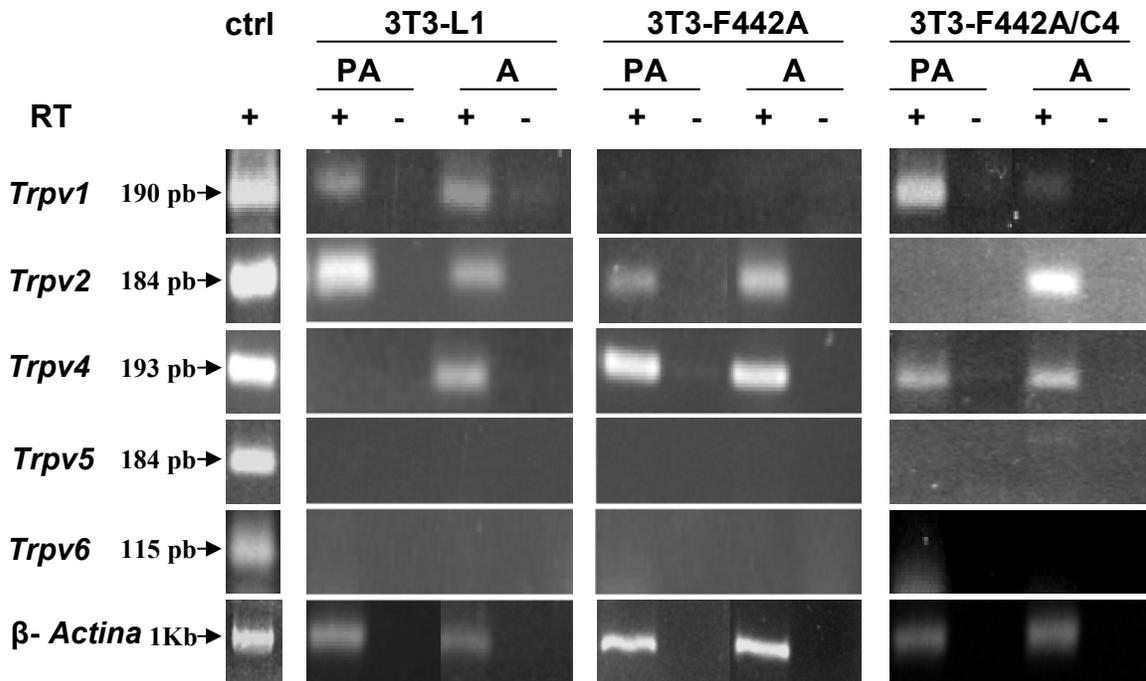


Figura 1. Expresión de canales TRPV en células 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4. Analizamos por RT-PCR muestras de RNA total obtenidas de preadipocitos (PA) o adipocitos maduros (A), de las líneas celulares 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3F442A/C4 empleando oligonucleótidos específicos para los genes *Trpv1*, *Trpv2*, *Trpv4*, *Trpv5* y *Trpv6*. El control positivo tuvo como molde cDNA proveniente de testículo (*Trpv1* y *Trpv6*), cerebro (*Trpv2*), corazón (*Trpv4*) y riñón (*Trpv5*) de ratón. Cada análisis incluyó un control negativo carente de transcriptasa reversa (RT-).

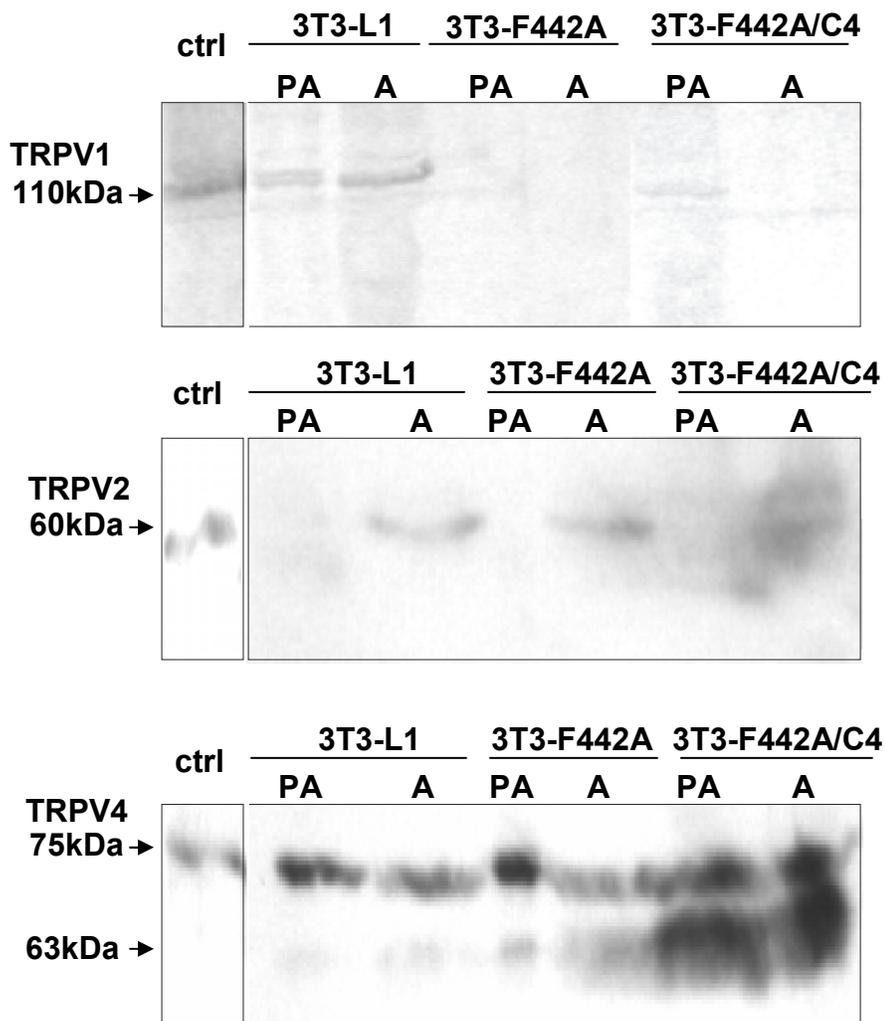


Figura 2. Análisis de la presencia de las proteínas TRPV1, TRPV2 y TRPV4.

Analizamos la presencia de los receptores TRPV1, TRPV2 y TRPV4 por Western blot utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra cada uno de los canales. Para detectar el anticuerpo primario usamos un anticuerpo de cabra anti-conejo, acoplado a peroxidasa y revelamos, para TRPV1, con el sustrato líquido TMB; para TRPV2 y TRPV4 la detección se llevó a cabo por quimioluminiscencia. Las imágenes muestran las fracciones membranales de preadipocitos (PA) y adipocitos maduros (A) de las líneas celulares 3T3-L1, 3T3-F442A y 3T3-F442A/C4. Los controles positivos (ctrl) consistieron en proteína total de cerebro de ratón.

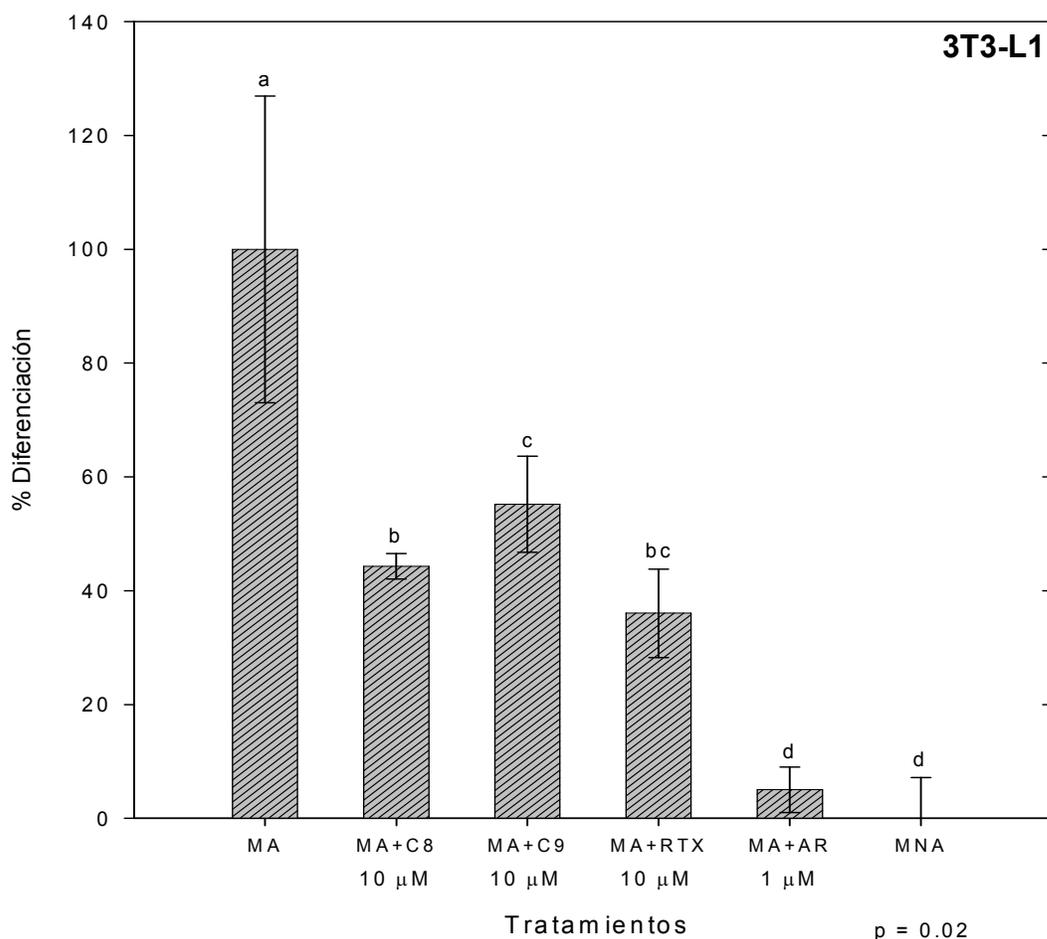


Figura 3. C8 y C9 afectan el compromiso a la diferenciación adiposa de células

3T3-L1. Inoculamos células 3T3-L1 a una densidad de 6×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos hasta llegar a 1 día de confluencia en medio basal y posteriormente las indujimos a diferenciación, donde se agregaron los diferentes capsaicinoides por 48h. Luego lavamos las células y las alimentamos con medio de mantenimiento por 7 días con cambio de medio cada tercer día. Fijamos las muestras con formaldehído al 4% y cuantificamos la adipogénesis por el método de rojo oleoso O. Los valores mostrados hacen referencia al porcentaje de diferenciación, tomando como 100% al tratamiento con medio adipogénico y con el tratamiento con ácido retinóico como control negativo.

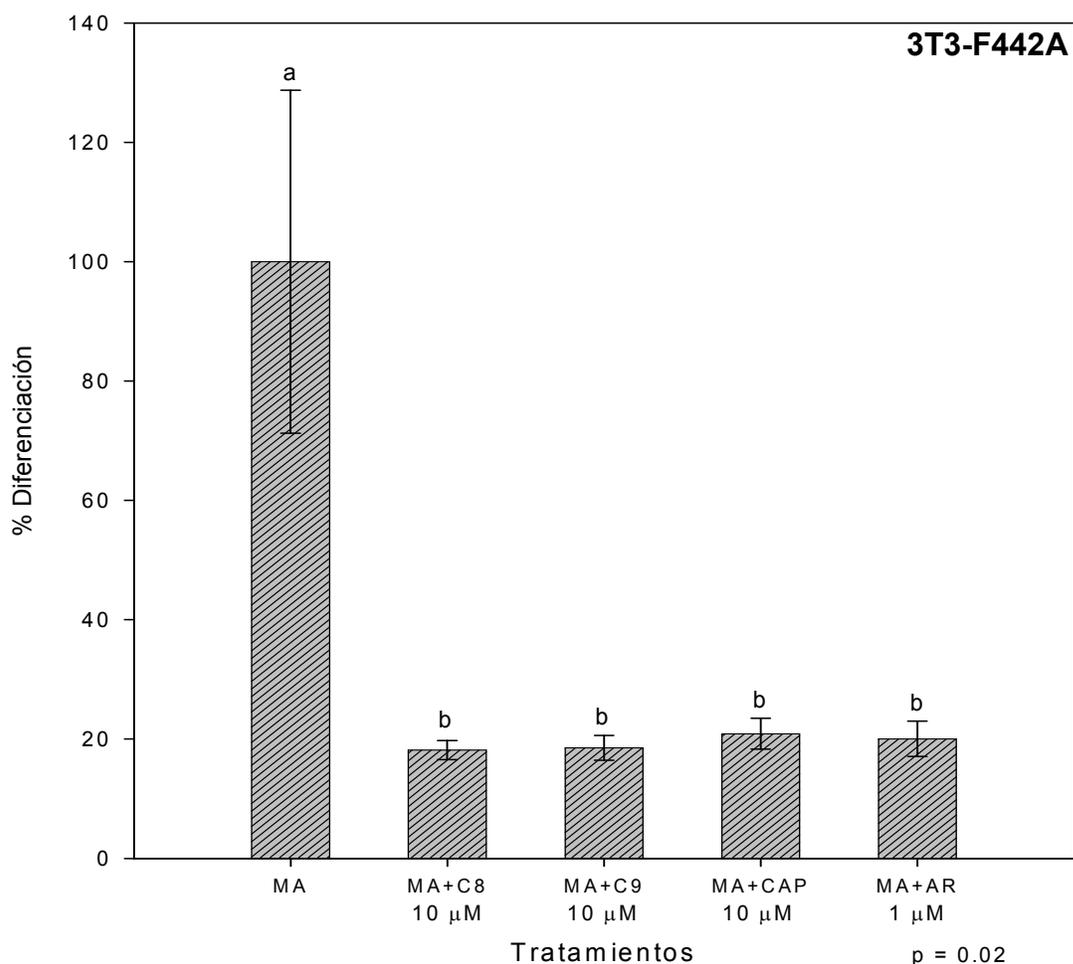


Figura 4. C8 y C9 afectan el compromiso a la diferenciación adiposa de células

3T3-F442A. Inoculamos células 3T3-F442A a una densidad de 6×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos hasta 1 día de confluencia en medio basal y posteriormente aplicamos un tratamiento adipogénico donde agregamos los diferentes capsaicinoides por 72h. Después lavamos y alimentamos con medio no adipogénico por 6 días con cambio de medio cada tercer día. Fijamos las muestras con formaldehído al 4% y cuantificamos la acumulación lipídica por el método de rojo oleoso O. Los valores mostrados hacen referencia al porcentaje de diferenciación, tomando como 100% al tratamiento con medio adipogénico y con el tratamiento con ácido retinóico como control negativo.

REFERENCIAS.

- Arniges M, Fernández-Fernández JM, Albrecht N, Schaefer M, Valverde MA. 2006. Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem.* 281:1580-6.
- Auzanneau C, Norez C, Antigny F, Thoreau V, Jouglu C, Cantereau A, Becq F, Vandebrouck C. 2008. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in cultured rat Sertoli cells regulate an acid sensing chloride channel. *Biochem Pharmacol.* 75:476-83.
- Becker D, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. 2008. Functional interaction of the cation channel transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and actin in volume regulation. *Eur J Cell Biol.* doi: 10.1016/j.ejcb.2008.10.002.
- Becker D, Blase C, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. 2005. TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J Cell Sci.* 118:2435-40.
- Buck TM, Wagner J, Grund S, Skach WR. 2007. A novel tripartite motif involved in aquaporin topogenesis, monomer folding and tetramerization. *Nat Struct Mol Biol.* 14:762-9.
- Buranasinsup S, Sila-Asna M, Bunyaratvej N, Bunyaratvej A. 2006. In vitro osteogenesis from human skin-derived precursor cells. *Dev Growth Differ.* 48:263-9.
- Castro-Muñozledo F, Marsch-Moreno M, Beltrán-Langarica A, Kuri-Harcuch W. 1987. Commitment of adipocyte differentiation in 3T3 cells is inhibited by retinoic acid, and the expression of lipogenic enzymes is modulated through cytoskeleton stabilization. *Differentiation.* 36:211-9.

Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. 1999. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*. 398:436-41.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389:816-24.

Chow J, Norng M, Zhang J, Chai J. 2007. TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells—Mechanisms behind a possible new "hot" cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*. 1773:565-76.

Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K. 2001. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 285:1250–52.

Flockerzi V. 2007. An Introduction to TRP channels. En: Flockerzi V, Nilius B (eds). *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. Springer. Nueva York. pp. 1-23.

Gradilone SA, Masyuk AI, Splinter PL, Banales JM, Huang BQ, Tietz PS, Masyuk TV, Larusso NF. 2007. Cholangiocyte cilia express TRPV4 and detect changes in luminal tonicity inducing bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 104:19138-43.

Guller S, Corin RE, Mynarcik DC, London BM, Sonenberg M. 1988. Role of insulin in growth hormone-stimulated 3T3 cell adipogenesis. *Endocrinology*. 122:2084-9.

- Herrera-Herrera M, Zapata-Bustos R, Salazar-Olivo L. 2008. Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human pre-adipocytes for translational applications. *Cytotherapy*. doi:10.1080/14653240802495963.
- Hisanaga E, Nagasawa M, Ueki K, Kulkarni RN, Mori M, Kojima I. 2009. Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 58:174-84.
- Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ. 1999. Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia. *J Biol Chem*. 274:8375-8.
- Holzer P. 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev*. 43:143-201.
- Hsu CL, Yen GC. 2007. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Agric Food Chem*. 55:1730-6.
- Huang SM, Lee H, Chung MK, Park U, Yu YY, Bradshaw HB, Coulombe PA, Walker JM, Caterina MJ. 2008. Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E₂. *J Neurosci*. 28:13727-37.
- Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha J, Park OJ. 2005. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 338:694-9.

- Ignatz RA, Massagué J. 1985. Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA. 82:8530-4.
- Iwata Y, Katanosaka Y, Arai Y, Komamura K, Miyatake K, Shigekawa M. 2003. A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. J Cell Biol. 161:957-67.
- Jancsó, G., Kiraly, E. & Jancsó-Gabor, A. 1977. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. Nature. 270:741-743.
- Janssen SW, Hoenderop JG, Hermus AR, Sweep FC, Martens GJ, Bindels RJ. 2002. Expression of the novel epithelial Ca²⁺ channel ECaC1 in rat pancreatic islets. J Histochem Cytochem. 50:789-98.
- Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H, Kojima I. 1999. Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. Nat Cell Biol. 1:165-70.
- Kawada T, Hagihara K, Iwai K. 1986. Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. J Nutr. 116:1272-8.
- 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 67:628-33.
- Kowase T, Nakazato Y, Yoko-O H, Morikawa A, Kojima I. 2002. Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues. Endocrinol J. 49:349-55.

- Kunert-Keil C, Bisping F, Krüger J, Brinkmeier H. 2006. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics*. 7:159-73.
- Kuri-Harcuch W. 1982. Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation*. 23:164-9.
- Lawson JJ, McIlwrath SL, Woodbury CJ, Davis BM, Koerber HR. 2008. TRPV1 unlike TRPV2 is restricted to a subset of mechanically insensitive cutaneous nociceptors responding to heat. *J Pain*. 9:298-308.
- Lee H, Caterina MJ. 2005. TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Eur J Physiol*. 451:160-7.
- Leffler A, Linte RM, Nau C, Reeh P, Babes A. 2007. A high-threshold heat-activated channel in cultured rat dorsal root ganglion neurons resembles TRPV2 and is blocked by gadolinium. *Eur J Neurosci*. 26:12-22.
- Lejeune MP, Kovacs EM, Westerterp-Plantenga MS. 2003. Effect of capsaicin on substrate oxidation and weight maintenance after modest body-weight loss in human subjects. *Br J Nutr*. 90:651-9.
- Li W, Dai RJ, Yu YH, Li L, Wu CM, Luan WW, Meng WW, Zhang XS, Deng YL. 2007. Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT-4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. *Biol Pharm Bull*. 30:1123-9.
- Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*. 103:525-35.

- Liedtke W, Tobin DM, Bargmann CI, Friedman JM. 2003. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci USA. 100:14531-6.
- McKeel DW, Jarett L. 1970. Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells. J Cell Biol. 44:417-32.
- Melnyk A, Himms-Hagen J. 1995. Resistance to aging-associated obesity in capsaicin-desensitized rats one year after treatment. Obes Res. 3:337-44.
- Meyers VE, Zayzafoon M, Douglas JT, McDonald JM. 2005 RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. J Bone Miner Res. 20:1858-66.
- Miao X, Liu G, Xu X, Xie C, Sun F, Yang Y, Zhang T, Hua S, Fan W, Li Q, Huang S, Wang Q, Liu G, Zhong D. 2008. High expression of vanilloid receptor-1 is associated with better prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Genet Cytogenet. 186:25-32.
- Montell C, Rubin GM. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. Neuron. 2:1313-23.
- Mogrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A. 2005. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. Science. 307:1468-72.

- Müller D, Hoenderop JG, Meij IC, van den Heuvel LP, Knoers NV, den Hollander AI, Eggert P, García-Nieto V, Claverie-Martín F, Bindels RJ. 2000. Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca²⁺ channel (ECAC1). *Genomics*. 67:48-53.
- Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y. 2003. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res*. 93:829-38.
- Nagasawa M, Nakagawa Y, Tanaka S, Kojima I. 2007. Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *J Cell Physiol*. 210:692-702.
- Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T. 2001. Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65:2735-40.
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. 2002. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*. 296:2046-9.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem*. 274:22739-46.

- Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. 2008. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 28:6231-8.
- Ramírez-Zacarías JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. 1992. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry.* 97:493-7.
- Salazar-Olivo LA, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. 1995. A preadipose 3T3 cell variant highly sensitive to adipogenic factors and to human growth hormone. *J Cell Sci.* 108:2101-7.
- Sanchez JF, Krause JE, Cortright DN. 2001. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience.* 107:373-81.
- Silva-Ortega CO. 2004. La resiniferatoxina inhibe la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-F442A. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. 30 pp.
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB. 2002. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature.* 418:186-90.
- Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C, Rubin CS. 1988. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 263:9402-8.

- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, Xavier M, Patel AS, Nelson JB, Futrell WJ, Yoshimura N, Chancellor MB, De Miguel F. 2004. Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol.* 172:1175-8.
- Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. 2000. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol.* 2:695-702.
- Toh CC, Lee TS, Kiang AK. 1955. The pharmacological actions of capsaicin and analogues. *Br J Pharmacol Chemother.* 10:175-82.
- Todaka H, Taniguchi J, Satoh J, Mizuno A, Suzuki M. 2004. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem.* 279:35133-8.
- Uno M, Kurita S, Misu H, Ando H, Ota T, Matsuzawa-Nagata N, Kita Y, Nabemoto S, Akahori H, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S, Takamura T. 2008. Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 48:109-18.
- Van der Eerden BC, Hoenderop JG, de Vries TJ, Schoenmaker T, Buurman CJ, Uitterlinden AG, Pols HA, Bindels RJ, van Leeuwen JP. 2005. The epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:17507-12.
- Weber K, Erben RG, Rump A, Adamski J. 2001. Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 289:1287-94.

Yoshioka M, Imanaga M, Ueyama H, Yamane M, Kubo Y, Boivin A, St-Amand J, Tanaka H, Kiyonaga A. 2004. Maximum tolerable dose of red pepper decreases fat intake independently of spicy sensation in the mouth. *Br J Nutr.* 91:991-5.

Zhang LL, Yan Liu D, Ma LQ, Luo ZD, Cao TB, Zhong J, Yan ZC, Wang LJ, Zhao ZG, Zhu SJ, Schrader M, Thilo F, Zhu ZM, Tepel M. 2007. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res.* 100:1063-70.