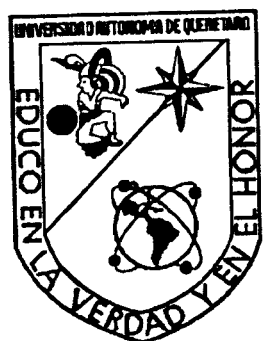


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA



**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPUBLICA (PROPAC)

**EFFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE LA ADIPOGÉNESIS
IN VITRO DE FIBROBLASTOS FETALES DE POLLO Y
PREADIPOCITOS 3T3-F442A DE RATÓN.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

ADRIANA GONZÁLEZ GALLARDO

Santiago de Querétaro, Qro. Agosto de 1999.

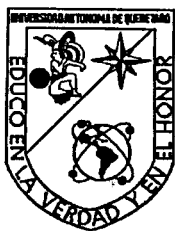
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
LIBRO

No. Adq. H 61168

No. Título _____

Clas. 633.84

G 643a



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS
(PROPAC)

EFFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE LA ADIPOGÉNESIS *IN VITRO* DE FIBROBLASTOS
FETALES DE POLLO Y PREADIPOCITOS 3T3-F442A DE RATÓN

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

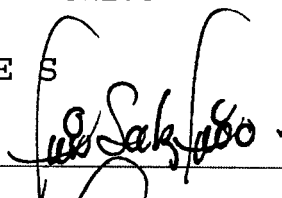
ADRIANA GONZÁLEZ GALLARDO

DIRIGIDA POR:

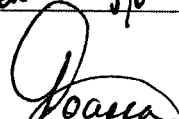
DR. LUIS ANTONIO SALAZAR OLIVO

S I N O D A L E S

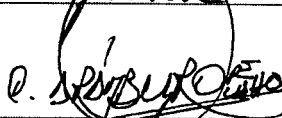
DR. LUIS ANTONIO SALAZAR OLIVO
PRESIDENTE



DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA
SECRETARIO



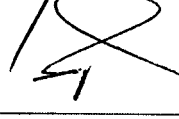
DR. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ
VOCAL



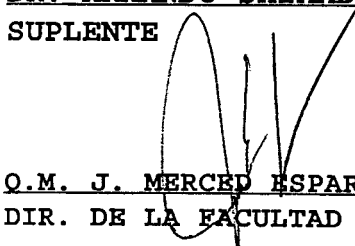
M. EN C. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
SUPLENTE



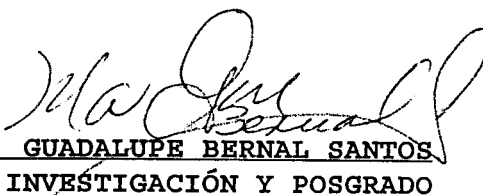
DR. ARMANDO SHIMADA MIYASAKA
SUPLENTE



Q.M. J. MERCED ESPARZA GARCÍA
DIR. DE LA FACULTAD DE QUÍMICA



DRA. MA. GUADALUPE BERNAL SANTOS
DIR. DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



CENTRO UNIVERSITARIO
SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., MÉXICO

El Presente Trabajo se Realizó en el Laboratorio de Toxicología *in vitro* del Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la Dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo.

AGRADECIMIENTOS.

Desèo agradecer al Dr. Luis A. Salazar Olivo el haber compartido con migo sus conocimientos y su tiempo. Asimismo, le agradezco la confianza que depositó en mi persona para la realización del presente trabajo

A la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña por su colaboración en la revisión de la tesis, por sus muestras de apoyo, confianza y amistad. Gracias por la motivación que me brindo para poder culminar el trabajo. También le agradezco las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones y equipos del laboratorio del Bioquímica Toxicológica.

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por su oportuna intervención durante la revisión de la tesis.

A la M. en C. Rosalía Reynoso Camacho por su colaboración para la revisión de la tesis y por su amistad.

Al Dr. Armando Shimada Miyasaka por sus acertados comentarios que ayudaron al enriquecimiento de este trabajo.

Manifiesto mi más profundo agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, por haberme permitido seguir con mi formación profesional. Le agradezco la ayuda económica que me brindo durante los últimos meses del desarrollo experimental del trabajo.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca para efectuar mis estudios de Maestría.

A la empresa Pilgrim's Pride de México por la donación de los fetos de pollo que se utilizaron durante el desarrollo del trabajo.

De forma muy especial, agradezco a las amistades que cultive durante mi estancia en el Posgrado : Luz, Carla, Chacha, Nuria, Arisbe, Yola, Jheny, Marco Vinicio, Ofelia, Rosalía y Minerva. Mil gracias por su amistad y cariño.

A mis comadres Luz, Carla y Nuria por todos los momentos que compartimos y seguimos compartiendo.

A chacha con gratitud y cariño, por su ejemplo, su amistad, su confianza y sobre todo por brindarme la oportunidad de seguir en el Posgrado ¡Gracias!

A todos mis compañeros de generación: Luz, Luz María, Estela, Zanella, Lupita, Laura, Ofelia, Arnoldo, Rafael, Cerna y Javier por los desvelos y ratos agradables que compartimos durante los cursos de la maestría.

Con cariño a Merce por su ejemplo de superación
y por brindarme lo mejor de su amistad.

Muy sinceramente al maestro Jorge,
Marigel, Laura, Carmelita, y Silvia por su
amistad y apoyo en todas las cuestiones
administrativas.

Agradezco a todos los que de alguna manera,
me ayudaron durante de mis estudios de maestría.

Dedico este trabajo con todo mi amor y cariño a toda mi familia pero en especial a:

MIS PADRES:

Daniel y Concepción, por su amor, comprensión, ejemplo y sobre todo por haberme permitido ser yo misma
¡Mil Gracias!.

MI ESPOSO:

Angel por estar siempre a mi lado compartiendo mis triunfos y fracasos, por tus palabras de aliento, por estar siempre que te he necesitado pero sobre todo por tu amor ¡Gracias!.

A MIS HERMANOS:

Daniel, Juan Manuel, Juan Carlos Paty y Toño.

Por demostrarme su cariño y estar siempre dispuestos a apoyarme
¡Gracias!.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|--------|
| Índice General | i |
| Índice de Cuadros | iii |
| Índice de Figuras | iv |
| Resumen | v |
| Summary | vi |
| 1.- Introducción | 1 |
| 2.- Antecedentes | 3 |
| 2.1.- El Tejido Adiposo | |
| 2.1.1.- Distribución, Desarrollo y Elementos que Componen el Tejido Adiposo | 3 |
| 2.1.2.- Tipos de Tejido Adiposo | 4 |
| 2.1.3.- Funciones y Características Bioquímicas del Tejido Adiposo Blanco | 5 |
| 2.1.4.- Importancia del Estudio del Tejido Adiposo | 7 |
| 2.1.5.- Estudio del Tejido Adiposo <i>in vitro</i> | 7 |
| 2.1.6.- Adipogénesis <i>in vitro</i> | 9 |
| 2.2.- La Capsaicina | |
| 2.2.1.- Metabolismo y Efectos Fisiológicos de la Capsaicina | 12 |
| 2.2.2.- Efecto de la Capsaicina sobre el Tejido Adiposo | 13 |
| 3.- Objetivos | |
| 3.1.- General | 21 |
| 3.2.- Específicos | 21 |
| 4.- Materiales y Métodos | |
| 4.1.- Material | 22 |
| 4.2.- Métodos | 22 |
| 5.- Resultados y Discusión | |
| 5.1.- Establecimiento de Subcultivos Seriales de Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo (FFP) | 29 |
| 5.2.- Evaluación de la Capacidad Adipogénica de los FFP | 36 |
| 5.3.- Efecto de la Capsaicina (Cap) y la Dihidrocapsaicina (dhCap) sobre la Acumulación Intracitoplásmica de Triglicéridos de los FFP | 39 |

| | |
|---|----|
| 5.4.- Efecto de la Capsaicina sobre la Adipogénesis de Preadipocitos | |
| 3T3-F442A de Ratón. | 40 |
| 6.- Conclusiones | 48 |
| 7.- Perspectivas | 50 |
| 8.- Bibliografía | 51 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Página |
|--|---------------|
| 1. - Diseño experimental para la evaluación de la capacidad adipogénica y el efecto de la capsaicina sobre la acumulación de lípidos en los fibroblastos fetales de tejido adiposo de pollo. | 27 |
| 2.- Diseño experimental para la evaluación del efecto de la capsaicina sobre la adipogénesis de los predipocitos 3T3-F442A de ratón. | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| 1.- Microfotografías de cultivos primarios de FFP | 31 |
| 2.- Efecto de la densidad de inóculo sobre la proliferación <i>in vitro</i> de FFP | 32 |
| 3.- Efecto de la edad del feto sobre el subcultivo serial de FFP | 34 |
| 4.- Efecto del número de subcultivos sobre el tiempo de duplicación de la población de FFP | 35 |
| 5.- Efecto del suero sobre la acumulación lipídica de FFP | 38 |
| 6.- Efecto de la capsaicina sobre la acumulación lipídica de FFP | 41 |
| 7.- Efecto de la dihidrocapsaicina sobre la acumulación lipídica de FFP | 42 |
| 8.- Efecto de diferentes concentraciones de la capsaicina sobre la diferenciación adiposa de preadipocitos 3T3-F442A de ratón | 44 |
| 9.- Efecto de la capsaicina sobre la actividad de la deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato (EC 1.1.1.8) en los preadipocitos 3T3-F442A | 45 |
| 10.- Eficiencia de clonación de preadipocitos 3T3-F442A en presencia de diferentes concentraciones de capsaicina | 47 |

RESUMEN

El tejido adiposo es el sitio principal de almacenamiento, y en muchos casos de síntesis, de las reservas energéticas en los vertebrados. Recientemente, el estudio del tejido adiposo ha cobrado gran interés debido a sus implicaciones en problemas de salud humana, así como por la sobreproducción de grasa corporal en animales destinados a la alimentación humana. Muchos de los conocimientos que hoy poseemos sobre la biología del tejido adiposo se obtuvieron de modelos experimentales *in vitro*, principalmente derivados de roedores. Sin embargo, el uso de estos modelos experimentales tiene restricciones para el estudio del tejido adiposo de aves, dadas las diferencias metabólicas que existen en el tejido adiposo de distintas especies. Numerosos estudios han reportado que la capsaicina, el principio pungente del chile (*Capsicum annuum*) afecta negativamente el desarrollo de algunos depósitos de tejido adiposo en animales de laboratorio. Sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales la capsaicina ejerce tal efecto antiadipogénico se desconocen. Además se desconoce si la capsaicina afecta de manera similar el tejido adiposo de otras especies de vertebrados. Para estudiar los mecanismos de la actividad antiadipogénica de la capsaicina, se evaluó el efecto *in vitro* de este compuesto sobre el tejido adiposo de aves y de mamíferos. Puesto que hasta ahora no existe una línea celular establecida de preadipocitos de ave, en este trabajo se desarrolló un protocolo de subcultivos seriales de fibroblastos de tejido adiposo subcutáneo de fetos de pollo. Estas células pueden acumular grasa en su citoplasma bajo condiciones de cultivo definidas. La capsaicina y la dihidrocapsaicina (otro capsaicinoide importante) no afectaron la acumulación de grasa en los fibroblastos fetales de pollo. Por el contrario, la capsaicina inhibió la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-F442A, disminuyendo tanto la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos como la actividad de la enzima lipogénica, deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato (EC 1.1.1.8). La inhibición de la adipogénesis en las células 3T3 fue dependiente de la dosis y no el resultado de un efecto de citotoxicidad. Estos resultados muestran la primera evidencia de que el tejido adiposo de mamíferos es un blanco directo de los efectos de la capsaicina y sugieren que tales efectos son dependientes del grupo animal estudiado. Estos resultados también sugieren que los efectos de la capsaicina sobre el desarrollo del tejido adiposo pueden ser independientes de los efectos de la capsaicina en el sistema nervioso.

PALABRAS CLAVE: Fibroblastos fetales de pollo, preadipocitos 3T3-F442A, adipogénesis *in vitro*, capsaicina.

SUMMARY

Adipose tissue is the main place for storage and, in some cases, for the synthesis of the lipids that constitutes the energy reserves in vertebrates. Recently, the study of adipose tissue has attracted a growing attention due to their relevance on human obesity, as well as on the overproduction of fat in meat animals. Much of the knowledge that we possess on the biology of adipose tissue was obtained from *in vitro* experimental systems, mainly derived from rodents. However, the use of such model systems has important restraints to the study of poultry adipose tissue. It has been reported that capsaicin, the pungent principle of hot pepper (*Capsicum annuum*) affects negatively the development of some adipose depots in laboratory animals. The mechanisms by which capsaicin exerts such antiadipogenic effects are unknown. Moreover, it is unknown whether capsaicin affects similarly the adipose tissue in other vertebrate species. To study the mechanism of capsaicin antiadipogenic activity, we evaluated the *in vitro* effects of this compound on both avian and mammalian adipose tissue. Since at present there is not established cell lines of avian preadipocytes, we developed a successful protocol for subculturing normal fibroblast derived from chicken fetal subcutaneous adipose tissue. These cells can accumulate intracytoplasmic fat depots under defined culture conditions. Neither capsaicin nor dihydrocapsaicin, another important capsaicinoid, affected fat accumulation in chicken fetal fibroblasts. However, capsaicin inhibited the adipogenesis of 3T3-F442A murine preadipocytes, diminishing both the triacylglyceride intracytoplasmic accumulation and the activity of the lipogenic enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC1.1.1.8). The inhibition of 3T3 adipogenesis by capsaicin was dose-dependent and not the result of cytotoxicity. Our results provide the first evidence that mammalian adipose tissue is a direct target for capsaicin effects and suggest that such effects are dependent on the animal group studied. Our results also suggest that the effects of capsaicin on adipose tissue development could be independent from the effects of capsaicin on nervous system.

KEY WORDS: Chicken fetal fibroblasts, 3T3-F442A preadipocytes, adipogenesis *in vitro*, capsaicin.

I.- INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo provee a los vertebrados de una reserva energética que puede usarse en tiempos de ayuno, además de desempeñar algunas otras funciones endocrinas y autocrinas. Este tejido está formado principalmente por células grasas conocidas como adipocitos, las cuales se originan en pequeños grupos en el tejido conectivo laxo. Hoy en día, el uso de modelos *in vitro* en combinación con la manipulación de animales (modelos *in vivo*) ha permitido establecer los mecanismos de acción de muchos xenobióticos. Muchos de los conocimientos que hoy tenemos sobre el funcionamiento del tejido adiposo se derivaron de estudios *in vitro* empleando células en cultivo. El sistema de cultivo celular consiste en mantener viables fuera del organismo células provenientes de algún órgano o tejido, alimentándolas con un medio nutritivo total o parcialmente definido. El cultivo de células puede realizarse a partir de cultivos primarios, constituidos por células aisladas directamente de un órgano o tejido por métodos mecánicos o enzimáticos (Mc Keehan, et al., 1990). Aunque las células de tales cultivos muestran *in vitro* muchos de los rasgos del linaje original, generalmente forman poblaciones celulares heterogéneas que sobreviven a un número limitado de subcultivos (Ramsay, et al., 1992). El cultivo de células puede realizarse también empleando líneas celulares establecidas (McFarland, 1992). Éstas son poblaciones celulares que han sufrido cambios genéticos que les permiten ser mantenidas en cultivo indefinidamente, aunque no necesariamente retengan todos los rasgos del linaje original (Ramsay, et al., 1992). Sin embargo, aún cuando existen muchas líneas celulares derivadas de diferentes especies y tejidos, hasta la fecha no ha sido posible el establecimiento de líneas continuas normales de preadipocitos de aves (Butterwith, 1997). Debido a ello, todos los estudios sobre el tejido adiposo en aves se han limitado al empleo de cultivos primarios. Esto ha acotado el estudio de los mecanismos de acción de componentes de la dieta que afectan el funcionamiento y/o el desarrollo del tejido adiposo en esta especie.

En los últimos años ha crecido el interés por el conocimiento del origen y desarrollo del tejido adiposo, en particular debido al problema de la obesidad humana y a sus patologías asociadas (hipertensión arterial, cardiopatías, diabetes, etc.).

Asimismo, no menos importante es el problema de la sobreproducción de grasa en animales de importancia económica.

En la presente década la industria avícola ha cobrado una gran importancia en la economía mundial debido a la tecnificación de las granjas y al aumento en la demanda del producto. México ocupa uno de los primeros diez lugares a nivel mundial en cuanto al consumo de pollo per capita. El estado de Querétaro ocupa el tercer lugar en la producción nacional de carne de pollo en pie y en canal (Anónimo, 1996). Aunque la sobreproducción de grasa en los pollos de engorda genera fuertes mermas a la industria avícola, no sólo en nuestro país sino en el ámbito mundial, se desconocen aún muchos de los aspectos básicos del funcionamiento y el desarrollo del tejido adiposo en esta especie. Estos aspectos podrían abordarse de manera exitosa con un adecuado modelo *in vitro*. Sin embargo, no se cuenta con un modelo experimental apropiado, ya que los modelos *in vitro* que existen para el estudio del tejido adiposo han sido derivados de mamíferos, particularmente de roedores. Dadas las diferencias metabólicas reportadas en el tejido adiposo de distintas especies, estos modelos podrían no ser los óptimos para estudiar el tejido adiposo de aves.

Por otro lado, numerosos reportes muestran que la capsaicina, el compuesto pungente del chile, afecta de manera negativa el desarrollo del tejido adiposo. Sin embargo, se desconoce cuales son los mecanismos de acción de este compuesto y sí afecta de igual manera el desarrollo del tejido adiposo de diferentes especies animales.

Para estudiar los mecanismos de acción a través de los cuales la capsaicina afecta el desarrollo del tejido adiposo, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la capsaicina sobre la adipogénesis *in vitro* de fibroblastos fetales de tejido adiposo de pollo y sobre preadipocitos 3T3-F442A de ratón.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- EL TEJIDO ADIPOSEO

2.1.1.- DISTRIBUCIÓN, DESARROLLO Y ELEMENTOS QUE COMPONEN AL TEJIDO ADIPOSEO.

El tejido adiposo (TA) está distribuido en todo el organismo. La densidad celular del TA está asociada con la densidad capilar debido a que los depósitos de TA de mayor tamaño en el organismo se localizan en los puntos de mayor irrigación sanguínea (Ailhaud et al., 1992). El TA está formado por diferentes tipos celulares, de los cuales las células de grasa conocidas como adipocitos representan entre una y dos terceras partes del número total de las células de este tejido (Ailhaud et al., 1992; Cornelius et al., 1994). El resto del tejido está formado por células sanguíneas, células endoteliales, preadipocitos en diferentes grados de diferenciación y fibroblastos (Ailhaud et al., 1992). Los adipocitos derivan de células embrionarias multipotenciales de origen mesodérmico las cuales, dependiendo de las señales presentes en su entorno, tienen la capacidad de originar adipocitos, condrocitos o miocitos (Cornelius et al., 1994). Aunque existen diferencias interespecíficas en los patrones de funcionamiento y de desarrollo del TA, los adipocitos maduros de todas las especies parecen originarse de células precursoras de naturaleza fibroblástica denominadas preadipocitos (Ailhaud et al., 1992; Cornelius et al., 1994; MacDougald y Lane, 1995). La existencia de tales células preadiposas ha sido probada en ratas (Van y Roncari, 1977), ratones (Negrel et al., 1978), ovejas (Broad y Ham, 1983), humanos (Van et al., 1976) y, más recientemente, en pollos (Cryer et al., 1987).

El crecimiento del tejido adiposo puede ocurrir por aumento en el volumen de las células (hipertrofia), por incremento en el número de estas (hiperplasia), o bien por ambos mecanismos (Hood, 1982). En mamíferos, el tamaño del tejido adiposo aumenta con la edad del embrión pero el número de adipocitos no cambia significativamente antes del nacimiento (Ailhaud et al., 1992). En las etapas finales del desarrollo fetal el crecimiento del tejido adiposo se debe principalmente a un incremento hipertrófico de los adipocitos. No obstante, aparentemente algunos mamíferos adultos tienen la capacidad de aumentar el tamaño del tejido adiposo por

un crecimiento hiperplásico (Cherry et al., 1984). Por el contrario, en las aves el crecimiento hiperplásico del tejido adiposo parece cesar entre las 12^o y 15^o semanas de edad (Cherry et al., 1984).

2.1.2.-TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO

En mamíferos se presentan dos tipos de TA, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo café (TAC) localizados en diversas áreas anatómicas (Guyton, 1989). El tejido adiposo café (TAC) es diferente al tejido adiposo blanco (TAB). El TAC es exclusivo de los mamíferos, se desarrolla durante la etapa fetal y puede ser identificado plenamente al nacimiento (Klaus, 1996). En bovinos y ovinos los depósitos de TA perirrenal, subcapular y retroperitoneal pueden considerarse depósitos de TAC; no así al TA subcutáneo ya que éste se considera TAB (Ailhaud et al., 1992). El TAC presenta una alta capacidad respiratoria debido a la abundancia de mitocondrias que junto con una alta vascularización le dan la apariencia parda que lo caracteriza (Klaus, 1996). La disposición de las gotas de lípidos en las células del TAC es multilocular, lo que significa que los lípidos se almacenan siempre en forma de gotas múltiples y no como una gran gota central (Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984). Este tejido participa en la termogénesis manteniendo la temperatura corporal y restaura el estado hipotérmico en los animales que hibernan (Klaus et al., 1995; Klaus, 1996).

Por otro lado, el TAB se puede localizar en todos los vertebrados (Klaus, 1996); el TAB en algunos roedores (rata y ratón) no puede ser detectado microscópicamente durante el periodo embrionario ni en recién nacidos. Sin embargo, en otras especies como cerdos, conejos, cobayos e incluso en el humano es posible detectarlo a partir del nacimiento (Ailhaud et al., 1992). En los mamíferos el TAB aparece en un período tardío del desarrollo embrionario (MacDougald y Lane, 1995). El tamaño de los cúmulos de adipocitos se incrementa de manera proporcional al desarrollo fetal, sin cambiar significativamente el número de estos cúmulos antes del nacimiento (Ailhaud et al., 1992). El mayor crecimiento de la población de adipocitos ocurre después del nacimiento (MacDougald y Lane, 1995).

Los adipocitos diferenciados muestran una abundante acumulación de lípidos en su citoplasma (Ailhaud et al., 1992; Butterwith, 1994). Estas inclusiones citoplásmicas de grasa entran en coalescencia hasta formar finalmente una vesícula que desplaza al núcleo hacia la periferia; de esta manera las células adquieren la forma típica de un adipocito terminalmente diferenciado. (Ailhaud et al., 1992; Butterwith, 1994; MacDougald y Lane, 1995). El fenotipo que adquieren los adipocitos maduros permite distinguirlos morfológicamente de las células precursoras (MacDougald y Lane, 1995).

2.1.3.- FUNCIONES Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El TA tiene una función importante en la economía energética de los vertebrados, ya que provee de una reserva de lípidos que puede usarse en tiempos de ayuno. Recientemente se mostró que el TA secreta algunos factores que participan en la respuesta inmune, las enfermedades vasculares y la regulación del apetito (Gregoire et al., 1998). Se dice que el TA tiene una gran plasticidad, debido a que los adipocitos generados en situaciones de exceso energético pueden ser eliminados por apoptosis cuando tales situaciones son superadas (Butterwith, 1994). Los adipocitos cuentan con enzimas y proteínas reguladoras necesarias para la lipólisis y la lipogénesis; por ello la principal característica de un adipocito funcional es su capacidad lipogénica y lipolítica (Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984; Butterwith, 1994). La biosíntesis de triglicéridos se puede llevar a cabo por la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir de sus precursores, o por la esterificación de los ácidos grasos exógenos (Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984). Existen inductores de la lipogénesis como la insulina, la cual estimula el transporte de glucosa en el tejido adiposo de mamíferos, y con ello la síntesis de lípidos y la acumulación intracelular de triglicéridos (Green y Kehinde, 1975). Sin embargo, en preadipocitos del tejido adiposo de pollos adultos la insulina no estimula la acumulación lipídica (Cryer et al., 1987). Asimismo, también existen factores lipolíticos como el AMP-cíclico, la cafeína, el isoproterenol y la teofilina, los cuales

modulan negativamente la conversión adipogénica y el metabolismo de los adipocitos (Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984). En humanos, algunas hormonas como la adrenalina y la noradrenalina activan en forma directa la lipasa sensible a hormonas, causando una rápida degradación de los triglicéridos del tejido adiposo y por ende la liberación de ácidos grasos (Guyton, 1989). La hormona tiroidea, el glucagon y los glucocorticoides promueven la degradación de los triglicéridos almacenados en los adipocitos (Guyton, 1989). La somatotropina u hormona de crecimiento participa en el metabolismo del tejido adiposo específicamente en la lipólisis, provocando la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo y estimulando en los demás tejidos la conversión de los ácidos grasos en acetil CoA (Houseknecht y Bauman, 1997; Guyton, 1989).

El TA en aves tiene una capacidad limitada para la síntesis de ácidos grasos. Una de las principales diferencias en el metabolismo de lípidos entre las aves y los mamíferos es que en las aves la síntesis de lipoproteínas se realiza en el epitelio intestinal y son transportadas a través de vía porta. Asimismo, el hígado es el principal sitio de síntesis de ácidos grasos y no el TA, como en los mamíferos (Akiba et al., 1995). Debido a ello, la grasa acumulada durante el crecimiento de las aves deriva principalmente de la dieta o de la síntesis hepática (Griffin et al., 1991). En las aves, a diferencia de los mamíferos, existe una correlación entre el crecimiento de los depósitos de TA y la proliferación celular. Lo que sugiere que en aves la proliferación celular es la mayor contribución para el crecimiento de estos depósitos (Butterwith, 1997). Se ha reportado que en pollos de engorda alimentados *ad libitum* el crecimiento hiperplásico del TA parece cesar a las 12-15 semanas de edad (Cherry et al., 1984). De igual forma, se sabe que cuando se realiza una restricción del alimento en las primeras etapas del desarrollo (7-12 semanas) los pollos de engorda presentan una mejor asimilación del alimento y una reducción en la grasa abdominal. Esta disminución puede ser atribuida a una reducción en el volumen de los adipocitos originado por un decremento en la lipogénesis hepática (Zhong et al., 1995). Asimismo, se ha reportado que cuando pollos de engorda de una línea genéticamente seleccionada son alimentados con dietas altas en energía existe un exceso de grasa en la región abdominal y visceral de éstos. Este exceso de grasa

repercute económicamente en los productores ya que este tejido tiene un valor comercial menor que el de la carne magra (Hood, 1982).

2.1.4.- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL TEJIDO ADIPOSO

En los últimos años ha crecido el interés por conocer el origen y el desarrollo del TA, en particular debido al problema de la obesidad humana. La obesidad es consecuencia de un aporte de energía mayor que el gasto de ésta (Guyton, 1989). La obesidad es una condición que se asocia con otras patologías como la hipertensión arterial, algunas cardiopatías y algunos tipos de diabetes (Van Itallie y Abraham, 1983). Por otro lado, no menos importante es la sobreproducción de grasa en animales destinados para el consumo humano (Anónimo, 1996). La sobreproducción de grasa en pollos de engorda genera problemas para su comercialización no solo en México sino en el ámbito mundial debido a que la carne magra tiene mayor aceptación que la carne grasosa (Anónimo, 1996). Hasta ahora el desarrollo y función del tejido adiposo han sido abordados por diferentes grupos de investigadores, sin embargo, aún quedan muchas interrogantes en lo referente a los efectos y mecanismos de acción de los compuestos que afectan el desarrollo y la funcionalidad de este tejido.

2.1.5.- ESTUDIO DEL TEJIDO ADIPOSO *IN VITRO*

Muchos de los conocimientos que se tienen actualmente sobre el funcionamiento y el desarrollo del TA se derivaron de estudios *in vitro* mediante el uso de cultivos de células. El uso de modelos *in vitro* para el estudio del TA y el de muchos otros tejidos presenta ventajas sobre los modelos *in vivo*. Por ejemplo, los sistemas *in vitro* permiten estudiar la regulación de actividades celulares en un tipo de células particular excluyendo los efectos que pudieran tener otras poblaciones celulares del mismo tejido o de otros tejidos. Por otro lado, puesto que la gran mayoría de los linajes celulares son capaces de proliferar en cultivo, las poblaciones celulares aisladas pueden expandirse y almacenarse en condiciones adecuadas que

permiten su uso por un tiempo prolongado (años). Esto hace a los sistemas *in vitro* sensiblemente más económicos que los sistemas *in vivo* que demandan un alto número de animales experimentales de costoso mantenimiento (Ramsay et al., 1992). Finalmente, aunque los resultados obtenidos de estudios *in vitro* no necesariamente sean un reflejo puntual de lo que acontece en un organismo completo, son una herramienta útil para elucidar los posibles mecanismos de acción (Mc Keehan et al., 1990). El cultivo de adipocitos, o de sus células precursoras, se ha empleado por más de 20 años, bien como cultivos primarios o por medio de líneas celulares establecidas. Los cultivos primarios se establecen con células aisladas directamente de un órgano o tejido por métodos enzimáticos o mecánicos. Las células de estos cultivos son esencialmente normales y se comportan en cultivo básicamente como lo harían en el organismo. Desafortunadamente muchas de las veces se trata de poblaciones heterogéneas (diferentes tipos celulares o un mismo tipo celular en diferentes estadios de desarrollo), con un tiempo limitado de sobrevivencia *in vitro* (Ramsay et al., 1992 ; Butterwith, 1997). Las líneas celulares establecidas están formadas por células provenientes de cultivos primarios que por reiterados subcultivos *in vitro* o por métodos de transformación genética han sufrido cambios cromosómicos que les permite ser propagadas indefinidamente en cultivos seriales. Aunque estas líneas celulares representan poblaciones muy homogéneas no necesariamente exhiben *in vitro* todos los atributos típicos del linaje celular normal (Ramsay et al., 1992; McFarland, 1992; Butterwith, 1997).

En los últimos años han sido desarrollados una gran variedad de modelos *in vitro* para el estudio del TA (Ramsay et al., 1992). El uso de modelos *in vitro* en combinación con la manipulación de animales (modelos *in vivo*) ha permitido establecer los mecanismos de acción de muchos xenobióticos (Ramsay et al., 1992). Hasta el momento existe un gran número de líneas celulares inmortales de preadipocitos derivadas de diferentes especies (Hoogenboom y Kuiper. 1997). Las líneas de preadipocitos 3T3 derivadas de embriones de ratón son las más empleadas para estudios de diferenciación adiposa o adipogénesis (Green y Kehinde, 1975; Salazar-Olivo et al., 1995). Sin embargo, aún cuando existen muchas líneas inmortales derivadas de diferentes especies y tejidos, hasta la fecha no ha sido

posible el establecimiento de una línea celular de preadipocitos de aves (Butterwith, 1997). Todos los estudios en aves que emplean estrategias *in vitro* se han limitado al empleo de cultivos primarios tanto para tejido adiposo como para cualquier otro tejido. Las células de aves de cualquier linaje celular solo han podido ser subcultivadas o transferidas un máximo de 20 veces al cabo de lo cual las células senescen y mueren (Kuwana et al., 1996; Rattan y Buchanan, 1982). Es por ello que el uso de modelos experimentales *in vitro* para el estudio del metabolismo y desarrollo de TA en aves se ha limitado hasta ahora a cultivos primarios de adipocitos o de preadipocitos susceptibles a un número restringido de subcultivos. Esto ha acotado el estudio de los mecanismos de acción de componentes de la dieta que afectan el funcionamiento y/o el desarrollo del TA en esta especie (Butterwith, 1997).

2.1.6.- ADIPOGENESIS IN VITRO

Los modelos experimentales más usados para el estudio *in vitro* del desarrollo del tejido adiposo implican tanto cultivos primarios de preadipocitos como células transformadas de naturaleza fibroblástica con capacidad adipogénica. En condiciones *in vitro* los adipocitos del tejido adiposo se originan de células precursoras de naturaleza fibroblástica denominadas preadipocitos (McDougald y Lane, 1995). En cultivos de células normales el inicio del proceso de diferenciación celular requiere el cese de la proliferación celular. La proliferación es inhibida por contacto, es decir, cuando las células topan entre sí y saturan la superficie de cultivo (Cornelius et al., 1994; Butterwith 1994). Cuando los cultivos alcanzan tal estado confluyente, en presencia de inductores de diferenciación apropiados (*factores adipogénicos* presentes en el suero que se adiciona al medio de cultivo) las células sufren un reajuste en su programa genético al que se denomina "compromiso". Esto las lleva a expresar nuevas actividades enzimáticas y, en general, proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos, como la lipoproteína lipasa y la proteína pOb24 (Cornelius et al., 1994; Ramsay et al., 1992). Simultáneamente, las células entran en un ciclo de replicación selectiva denominado expansión clonal el cual se ve

favorecido por la presencia de insulina (Green y Kehinde, 1975), factor de crecimiento tipo insulina tipo I (Hembree et al., 1996; Chen et al., 1996), y triiodotironina (Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984). Cuando este ciclo termina las células exhiben el fenotipo característico de los adipocitos terminales y concluyen lo que se conoce como proceso de diferenciación terminal. Esta programación es irreversible y en este momento los marcadores tardíos de diferenciación celular alcanzan su máxima expresión. Estos marcadores incluyen la proteína de adipocitos que une lípidos conocida como aP2 ó 442 y la adipsina, una serin-proteasa homóloga al factor del complemento D (Cornelius et al., 1994; Butterwith 1994; Klaus, 1996; Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984). El proceso de diferenciación adiposa está caracterizado por cambios dramáticos en la forma celular; durante el proceso de diferenciación celular, los preadipocitos de apariencia fibroblástica se redondean y acumulan pequeñas gotas de grasa, principalmente triglicéridos, en su citoplasma. Estas inclusiones citoplásmicas de grasa entran en colescencia hasta formar finalmente una vesícula que desplaza al núcleo hacia la periferia (Butterwith, 1994; Ailhaud et al., 1992; McDougald y Lane, 1995). De esta manera las células adquieren la forma típica de un adipocito terminalmente diferenciado. También en estudios *in vitro* se observó que durante el proceso de conversión adipocítica la acumulación intracelular de lípidos se debe a un aumento en la actividad de las enzimas lipogénicas como la acetil CoA carboxilasa, la ATP citrato liasa y la sintetasa de los ácidos grasos (Mackall et al., 1976). Kuri-Harcuch y Green (1978) mencionan que no solo existe un incremento en las enzimas de la síntesis de los ácidos grasos, sino que también se incrementa la actividad de las enzimas de la acilación del glicerol fosfato, la lipoproteín lipasa y otras enzimas que participan en la síntesis de triglicéridos. La enzima glicerol-fosfato-deshidrogenasa, que a partir del fosfato de dihidroxiacetona sintetiza el 3-glicerolfosfato necesario para la síntesis de los triglicéridos, incrementa su actividad de 500 a 50,000 veces durante éste proceso (Pairault y Green, 1979). El cambio morfológico de los preadipocitos requiere la reconstrucción del citoesqueleto, originando cambios en la expresión de más de 100 proteínas diferentes (McDougald y Lane, 1995).

Así como existen factores que estimulan el proceso de diferenciación adiposa,

existen también compuestos que inhiben este proceso. Los más estudiados son el factor de crecimiento transformante tipo β , y el ácido retinoico (Kuri-Harcuch, 1982; Klaus, 1996). El factor de crecimiento transformante tipo- β (TGF- β ; por sus siglas en inglés) ha resultado ser un potente inhibidor del proceso de diferenciación en diferentes líneas celulares establecidas y cultivos primarios de preadipocitos. Esta inhibición se debe a que este factor actúa como un agente mitogénico en los cultivos celulares (Butterwith, 1994; Butterwith y Goddard, 1991). El factor de crecimiento transformante tipo α (TGF- α), es un regulador del desarrollo de los adipocitos y actúa de manera autócrino-parácrina y endocrina. Se ha mostrado que TGF α estimula la proliferación de preadipocitos de pollo y ratón y al igual que TGF- β inhibe la diferenciación (Butterwith, 1997).

Por otro lado, desde años atrás se conoce que la vitamina A y sus análogos pueden modular la diferenciación en diversos tipos celulares. El ácido retinoico (AR), un análogo de la vitamina A, es capaz de inhibir la diferenciación celular de preadipocitos de ratón. Kuri-Harcuch (1982) mostró en condiciones *in vitro* que el AR en concentraciones de 10^{-5} M y 10^{-6} M inhibe la diferenciación de las células de la línea 3T3-F442A. Estas células son una subpoblación de la línea celular 3T3 derivadas de embriones de ratón (Todaro y Green, 1963; Green y Kehinde, 1976). Las células 3T3-F442A tienen una alta capacidad para diferenciarse en adipocitos cuando en el medio existen los factores adipogénicos adecuados (Kuri-Harcuch y Green, 1978). El AR inhibe la diferenciación adiposa de estas células bloqueando algunos de los eventos tempranos de su reprogramación genética, específicamente la etapa del compromiso. Esta inhibición es reversible ya que cuando el ácido retinoico es retirado del medio y las células son puestas en condiciones adipogénicas, éstas son capaces de iniciar el proceso de diferenciación (Kuri-Harcuch, 1982).

La capsaicina es otro de los compuestos que afectan de manera negativa el desarrollo del TA. Contrariamente a los inhibidores de la adipogénesis antes señalados, todas las evidencias con que se cuenta sobre los efectos negativos de la capsaicina sobre la adipogénesis se han obtenido de estudios *in vivo* con animales de laboratorio. Esto ha dificultado aún más que en los casos anteriores el

esclarecimiento de sus mecanismos de acción.

A continuación se detalla con mayor precisión la acción fisiológica de los capsaicinoides sobre este tejido.

2.2.- LA CAPSAICINA

2.2.1.- METABOLISMO Y EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA CAPSAICINA.

Los frutos de las diferentes variedades del chile (*Capsicum spp*) son ampliamente consumidos como parte de la dieta en un gran número países, particularmente en el sureste de Asia y en Latinoamérica (Surh y Lee, 1995). La capsaicina (Cap) es el principal compuesto pungente del género *Capsicum*, que junto con la dihidrocapsaicina (dhCap) proporcionan el 90% o más del total de la pungencia del chile (Surh y Lee, 1995; Kawada et al., 1984).

Luego de ingeridas la Cap y la dhCap se absorben en duodeno y yeyuno por un mecanismo no activo y se transportan por vena porta. Los capsaicinoides absorbidos se excretan como metabolitos por la vía urinaria (Kawada et al., 1986a). No obstante, otros autores reportan que el metabolismo de la Cap y sus análogos se realiza en el hígado, donde participa el sistema oxidasa de la fracción microsomal formando un intermediario electrofílico el cual se une irreversiblemente a moléculas nucleofílicas en el tejido blanco (Surh y Lee, 1995)

La Cap produce diferentes efectos fisiológicos y farmacológicos. Su mayor efecto farmacológico lo ejerce sobre la parte periférica de los nervios sensitivos del sistema nervioso, particularmente en las neuronas aferentes primarias de tipo C (Surh y Lee, 1996). Se sabe que la Cap disminuye los neurotransmisores que impulsan el dolor, conocidos como sustancia P, de las terminaciones nerviosas sensoriales (Surh y Lee, 1996). Debido a sus propiedades la Cap se ha utilizado ampliamente como una herramienta en el estudio del mecanismo del dolor, así como en el manejo de pacientes con dolor artrítico y algunas otras afecciones (Surh y Lee, 1995; Surh y Lee, 1996). Algunos reportes indican que la Cap y sus análogos son capaces de producir toxicidad en animales ocasionando necrosis renal y hepática. Se

ha reportado que el consumo de grandes cantidades de la Cap causa daños histopatológicos y cambios bioquímicos incluyendo erosión de la mucosa gástrica y necrosis hepática (Kawada et al., 1984, Surh y Lee, 1996). Por otro lado existen reportes que muestran que la Cap puede producir carcinogénesis y mutagénesis (Surh y Lee, 1996, Anónimo, 1986, Surh y Lee, 1995) debido tal vez a que interactúa con el DNA de manera irreversible (Surh y Lee, 1996). Otros trabajos han sugerido que la Cap tiene propiedades anticarcinogénicas (Miller et al., 1993), o que inhibe actividades enzimáticas de una oxidasa dependiente de NADH de la membrana plasmática de células transformadas, pero no de células normales (Morré et al., 1996). Sin embargo, las propiedades carcinogénicas o anticarcinogénicas de la Cap siguen siendo aún tema de debate.

2.2.2.- EFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO.

Numerosos trabajos señalan que la Cap afecta el funcionamiento y el desarrollo del TA en animales de laboratorio. A continuación se describirán algunos de ellos

Nopanitaya (1973) investigó los efectos crónicos de la Cap sobre animales de laboratorio utilizando dietas con diferentes concentraciones de proteína. El autor reporta que la velocidad de crecimiento de las ratas fue lenta independientemente de la concentración de proteína cuando se adicionó la Cap, esta misma disminución es observada en los animales tratados con dietas bajas en proteína y con ausencia de la Cap. De igual manera, Kawada et al., (1986 a) en trabajos donde suplementaron la Cap a una dieta alta en grasa (10 %) y la administraron a ratas, observaron que el peso de los depósitos del TA epididimal se redujeron, pero fue más significativa la reducción de los depósitos perirrenales. Sin embargo, los autores no señalan qué ocurrió con los otros depósitos de TA presentes en el organismo. Ellos muestran que el peso de las células de este tejido y la velocidad de absorción no fueron afectados. Observaron una correlación inversa entre el peso del TA perirrenal y la dosis de la Cap. No obstante, no existió una diferencia significativa en el peso corporal de los animales sometidos a los diferentes tratamientos. Los autores sugieren que las

células existentes en el tejido perirrenal son llenadas con lípidos antes de que se produzcan más células debido a que el peso de este tejido fue diferente en los tres grupos, pero no así el peso de las células.

Por el contrario, Srinivasan y Satyanarayana (1986) al realizar estudios utilizando dosis de la Cap cercanas a la de la ingesta en humanos, mostraron que el consumo de alimento, el peso corporal, la masa magra y el TA no fueron afectados en las ratas tratadas con la Cap.

Cui y Himms-Hagen (1992 b) utilizando ratas desensibilizadas por inyecciones intramusculares de Cap (Des-Cap), midieron el metabolismo basal de los animales con el fin de evaluar si existía una relación entre la disminución de la velocidad de crecimiento con el incremento del gasto energético. Ellos encontraron que las ratas Des-Cap pesaron menos que el control y que el consumo de oxígeno expresado en términos del peso corporal, superficie corporal (cm²) y masa metabólica fueron significativamente diferentes en ambos grupos. Por lo que los autores concluyen que el metabolismo basal parece ser normal para el tamaño del cuerpo en las ratas Des-Cap. Semanas después del tratamiento, Cui y Himms-Hagen (1992 b) valoraron el efecto a largo plazo de la Cap sobre el TA. En sus resultados muestran que el peso de las ratas Des-Cap disminuyó notablemente con respecto al control a las 14 y 32 semanas de tratamiento; asociada esta reducción de peso con un bajo contenido de grasa corporal. Los peso de los depósitos grasos retroperitoneal, epididimal, así como el contenido de grasa corporal total y el TAC se vieron más afectados a mayor tiempo de tratamiento. El contenido de proteína fue menor en comparación al control en todos los tratamientos. Asimismo, el contenido de proteína total no acomplejada, citocromo oxidasa y DNA fueron significativamente menores a las 12 y 32 semanas del tratamiento. El peso del hígado y el contenido de DNA en ratas Des-Cap se redujeron a las 32 semanas, pero en términos del tamaño del cuerpo fueron normales. En cambio los pesos del corazón y los riñones fueron normales a las 32 semanas pero grandes cuando se expresó en términos del tamaño del cuerpo del animal. Los resultados encontrados por estos autores indican que existe un marcado retraso en la ganancia de peso en las ratas Des-Cap (alrededor del 19 %). La pérdida de peso se debió en parte a la disminución del grado de adiposidad ya que

las ratas tratadas contenían sólo 14.2 % de grasa corporal comparada con un 19.2 % en las ratas control. En estudios posteriores este mismo grupo de investigadores estudiaron la resistencia a la obesidad por la edad en ratas Des-Cap. Ellos reportan que las ratas Des-Cap después de un año de ser tratadas siguen teniendo menor cantidad de TA y más masa magra que las ratas control, lo que sugiere que la acción de la Cap es irreversible. Asimismo, reportan que existió una baja proporción de adipocitos maduros en la población total del TA epididimal, pero, la disminución fue más marcada en el TA retroperitoneal. Además, el número de adipocitos maduros del TA epididimal no se vio incrementado con la edad del animal como ocurrió con los animales control. Por lo anterior, los autores concluyen que la obesidad hiperplásica asociada con la edad de las ratas es inhibida por la Cap. Además, que el efecto a largo término de la Des-Cap es promotor de la delgadez así como de alguna reducción en el crecimiento total del cuerpo, los cuales son asociados en parte con un menor grado de adiposidad (Melnik y Himms-Hagen, 1995). En estudios anteriores ellos sugirieron que los neuropéptidos de los nervios sensoriales del TAC pueden ejercer una influencia trófica en este tejido o inhibir el proceso degradativo involucrado normalmente con la atrofia del TAC. La Des-Cap remueve la influencia de nervios sensoriales en algunos órganos del cuerpo, además es posible que la alteración del balance de energía se deba a alteraciones en uno o más de otros sistemas involucrados en la regulación y composición del peso corporal. Ahora, si los neuropéptidos de fibras sensoriales ejercen un efecto trófico en el TAC es probable que también ejerzan el mismo efecto sobre otros órganos incluyendo el tejido adiposo blanco. Por lo tanto, el retardo del incremento de los depósitos de TA blanco en la cavidad retroperitoneal en las ratas Des-Cap ha sido asociado con un retardo en la proliferación celular, secundaria a la falta de influencia de los neuropéptidos de los nervios sensoriales.

Cui y Himms-Hagen (1992a) mostraron que el TAC se atrofia marcadamente al primer día posterior a la inyección de la Cap, manifestándose con una disminución en la proteína total, pocas mitocondrias (disminución de la citocromo oxidasa total, proteína total no acomplejada), así como menor cantidad de células (DNA). También existió una notoria reducción en la ganancia de peso corporal y en el peso del TA

epididimal. Los autores sugieren que la rápida atrofia del TAC después de la administración de la Cap es secundaria a la disminución de los neuropéptidos de los nervios sensoriales, debido a que estos neuropéptidos ejercen un efecto trófico sobre la actividad mitocondrial o bien una influencia inhibitoria en el proceso que promueve la degradación de las mitocondrias. Ellos también mencionan que el retardo del incremento en el contenido de DNA del TAC asociado con la edad sugiere que los neuropéptidos sensoriales también modulan la proliferación celular.

Por otro lado, Furuse et al (1994) mostraron que los pesos relativos del hígado y de la grasa abdominal no son afectados cuando se administra pimiento rojo (0.2 y 0.1%) en la dieta de gallinas ponedoras. De igual forma la producción de huevo no se vio afectada por el consumo de este chile. Ellos indican que no existe información sobre el efecto de la Cap en el metabolismo de lípidos en gallinas ponedoras, pero que es claro que una dieta con pimiento rojo no disminuye el peso del TA abdominal. Los autores no mencionan si el tratamiento con chile afectó otros depósitos grasos de los animales estudiados.

La disminución del desarrollo y del peso corporal de los animales tratados con la Cap pudiera atribuirse a una disminución del consumo de alimento. Al respecto, Nopanitaya (1973) reportó un aumento en el consumo de alimento en ratas tratadas con la Cap por vía oral, lo que lo llevó a asegurar que los efectos de la Cap sobre el desarrollo de TA pueden deberse a la estimulación de la ingesta alimentaria. No obstante, Cui y Himms-Hagen (1992 a) y Melnyk y Himms-Hagen (1995) muestran que el consumo de alimento de ratas a las que se les administró la Cap por vía intramuscular no se vio afectado en las primeras etapas del tratamiento; sin embargo, la ingesta con respecto al control disminuyó significativamente a las 14 y 32 semanas. La calidad irritante del compuesto no parece ser una variable importante en los efectos de la Cap sobre la ingesta puesto que Furuse et al., (1994) no encontraron evidencia de que la pungencia de la Cap disminuya la ingesta de alimento en pollos.

Otro posible mecanismo de los efectos de la Cap sobre el desarrollo de TA y el peso corporal pudiera deberse a problemas de absorción de los lípidos. Nopanitaya (1973) muestra que los efectos agudos causados en ratas por el

consumo de la Cap (0.014 %) se manifiestan por cambios ultraestructurales en las células absortivas del duodeno así como una destrucción de sus organelos. En sus resultados muestra que la grasa es pobremente absorbida por la mucosa en ratas tratadas con la Cap, y que las gotas de grasa fueron reducidas en las células epiteliales del duodeno, independientemente de la concentración de proteína. Los animales alimentados con una dieta baja en proteína sin la Cap también mostraron poca cantidad de gotas de grasa. El autor sugiere que hay una reducción en la habilidad absortiva de las células epiteliales del intestino. Por tanto, concluye que una dieta baja en proteína causa la reducción de la habilidad absortiva de las células epiteliales del intestino y que la Cap intensifica los efectos, debido a que ejerce un efecto citotóxico en estas células.

Sin embargo, Kawada et al (1986a) reportaron que la absorción gastrointestinal de los lípidos no es inhibida por la Cap (0.014 %). En sus trabajos mostraron una disminución en la acumulación de lípidos en el TA, pero esta disminución no es atribuida a una falta de absorción gastrointestinal.

Otro aspecto que puede ser considerado, es la posible alteración del metabolismo de lípidos. Referente a ésto, Srinivasan y Satyanarayana (1986) indican que la Cap (15 mg % del pimiento rojo) reduce en un 20-30 % los lípidos en el hígado y la grasa corporal en ratas alimentadas con una dieta al 10 % de grasa. En su trabajo reportan que los animales alimentados con una dieta, que tenía una concentración de 1.58 % de mezcla de especies (ME), mostraron un incremento en el tamaño del hígado. Pero su composición con respecto al contenido de agua, lípidos totales, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres y fosfolípidos fueron los mismos. Asimismo, los triglicéridos presentes en suero total y los unidos a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), en todos los grupos fueron bajos, no así cuando la concentración de pimiento rojo (PR) fue del 0.06 %. Los triglicéridos unidos a lipoproteínas de alta densidad (HLD) incrementaron con 0.19 % PR y disminuyeron con 1.58 % de ME. Por otro lado, el colesterol presente en suero total así como el unido a las VLDL y las LDL incrementaron a una concentración de 0.19 % PR. Los fosfolípidos y ácidos grasos libres en suero aumentaron con 0.32 % de PR y ME respectivamente. Con base en

estos resultados, ellos concluyen que el pimiento rojo a niveles bajos (63-316 mg %) no disminuye los lípidos en hígado ni la grasa corporal. El beneficio sólo se observa con una disminución de los triglicéridos en el suero y de los unidos a las VLDL y LDL.

Por otro lado, Kawada et al (1986 a) encuentran que en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa y adicionadas con la Cap (0.014%) la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) fue significativamente menor con respecto al control. La concentración de triglicéridos en suero fue menor en presencia de la Cap, esta concentración de triglicéridos en suero se relaciona inversamente al consumo de la Cap, lo que indica que este compuesto facilita el metabolismo de lípidos en ratas con dietas altas en grasa. Ellos concluyen que es posible que la estimulación del metabolismo de lípidos por la Cap se debe a la movilización del TA, pero esta estimulación no está acompañada por la inducción de lipasa ya que la actividad de lipasa sensible a hormonas (HLS por sus siglas en ingles) no fue diferente en dietas altas en grasa con o sin la Cap.

De igual forma, Salimath y Satyanarayana (1987) refieren que la administración a ratas de un análogo de la Cap (N-Vanillyl nonamide) a una concentración de 0.2 mg % en combinación con una dieta que contenía el 30 % de grasas disminuyó la concentración de los triglicéridos del suero (TG) de estos animales. Asimismo, existió una elevación de la HSL del TA así como de los ácidos grasos libres (FFA), lo que indica una estimulación de la actividad lipolítica. Al utilizar la Cap en lugar del análogo se observaron efectos tales como la estimulación de TG del hígado al suero, disminución de la actividad de la enzima lipoproteín lipasa (LPL) del TA y la elevación de la actividad de la LPL del músculo esquelético. En estos mismos trabajos muestran que la Cap y el pimiento rojo inhiben la actividad enzimática de la enzima fosfodiesterasa dependiente de Ca^{++} y calmodulina, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Además estimulan la secreción de epinefrina de la médula suprarrenal con activación de la adenilato ciclasa, tal vez incrementando la concentración de AMPc y la actividad lipolítica en TA.

Kawada et al., (1986 b) realizan otros estudios con el fin de investigar el modo de acción de la Cap en el metabolismo energético de ratas. En sus resultados muestran que existe un incremento en el consumo de oxígeno y del coeficiente

respiratorio inmediatamente después de que se inyectó la Cap. El glucógeno en hígado disminuyó, la glucosa, los ácidos grasos libres y la insulina séricos se incrementaron después de la administración de la Cap. Estas alteraciones no se presentaban sí a los animales antes de aplicarles las dosis de la Cap eran pretratados con bloqueadores β -adrenérgicos. El incremento en el consumo de oxígeno sugiere que la Cap conduce a una producción de calor o termogénesis en ratas. El incremento de la concentración de glucosa en suero fue derivado del hígado. Los autores concluyen que el incremento en la termogénesis inducido por la Cap se basa en una acción β -adrenérgica y proponen dos modelos y sitios de acción de la Cap: (1) la molécula de la Cap es un agonista β -adrenérgico y/o (2) la Cap libera catecolaminas del sistema nervioso simpático.

La presencia de la Cap en la dieta al parecer no altera la ingesta de alimentos así como tampoco la absorción de lípidos; pero es evidente que a mayor tiempo de exposición a la Cap mayor es el daño producido sobre el TA.

Sin embargo, aún cuando es evidente que la Cap afecta de manera negativa el desarrollo del tejido adiposo, se desconocen los mecanismos de acción de este compuesto. Además, las evidencias mostradas parecen indicar que este efecto varía según la especie animal a la que se administre la Cap. Por otro lado, los frutos de diferentes variedades de chile son una buena fuente de pigmentos carotenoides (Mínguez-Mosqueda y Fernández-Díez, 1981) y son ampliamente usados como colorantes naturales de alimentos, como extractos concentrados o en polvo (Mínguez-Mosqueda y Hornero-Méndez, 1993). Para obtener el grado de pigmentación que exige el mercado en los productos avícolas, es necesario utilizar otras fuentes adicionales de pigmentos como lo es la harina de chile (Romo, 1990). La adición de carotenoides obtenidos de chile, en el alimento de las aves, siempre va acompañado de capsaicinoides. Además, la ruta metabólica de la Cap es muy parecida a la de los carotenoides (Govindarajan y Satyanarayana, 1991).

Por otro lado, se sabe que el estado de Querétaro ocupa el tercer lugar en la producción nacional de carne de pollo en pie y en canal. Sin embargo, el exceso de grasa en los pollos de engorda genera problemas a los productores para su comercialización ya que en el mercado se paga mejor el tejido magro que la grasa

(Anónimo, 1996). No obstante, hasta ahora se desconoce si el TA de aves, o el de cualquier otro vertebrado, es un blanco directo de los efectos antiadipogénicos de la Cap.

Por todo lo antes mencionado, se planteó la conveniencia de evaluar el efecto de la Cap sobre la adipogénesis de fibroblastos fetales de pollo y de preadipocitos de ratón de la línea celular 3T3-F442A.

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la capsaicina sobre la adipogénesis de fibroblastos fetales de pollo y preadipocitos 3T3-F442A de ratón.

3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo de subcultivos seriales para fibroblastos de tejido adiposo de fetos de pollo.
- Determinar la capacidad adipogénica de las poblaciones de fibroblastos de tejido adiposo de fetos de pollo mantenidas en cultivo.
- Evaluar el efecto de la capsaicina sobre la adipogénesis *in vitro* de los fibroblastos de tejido adiposo de fetos de pollo y sobre preadipocitos 3T3-F442A de ratón.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.I.- MATERIAL

4.I.I.- REACTIVOS

Se obtuvieron en Sigma Chemical Co (St Louis, MO) la capsaicina (Cap), la dihidrocapsaicina (dhCap), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido-transretinoico (AR), la tripsina, la colagenasa, la insulina, la biotina, el rojo oleoso O, la estreptomina, la penicilina y el suero de pollo. El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) se adquirió de GIBCO BRL (Grand Island, NY). El suero de ternera y el suero fetal de bovino (SFB) fueron de HyClone (Logan, UT). En algunos experimentos se utilizó suero de pollo adquirido en rastros de la localidad. El resto de los reactivos fueron de grado analítico.

4.I.2.- MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon fibroblastos de tejido adiposo subcutáneo de fetos de pollo (Avian Peterson) de 13, 16, y 19 días de incubación donados por Pilgrim's Pride de México. También se empleó la línea celular de preadipocitos 3T3-F442A de ratón, donada por el Dr. Walid Kuri-Harcuch del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (México, D.F.)

4.2.- MÉTODOS

4.2.I.- ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS FETALES DE POLLO (FFP)

El tejido adiposo subcutáneo de fetos de pollo de 13, 16 y 19 días de incubación se obtuvo en condiciones asépticas. Las muestras obtenidas se lavaron con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y antibióticos (estreptomina 100 µg/mL, penicilina 100 U/mL), y se cortaron en pequeños fragmentos. Los fragmentos se disgregaron en una solución de digestión que contenía HEPES 50 mM, NaCl 0.12 M, CaCl₂ 5 mM, glucosa 5 mM, 2 % de albúmina de suero de bovino y 3 mg de colagenasa tipo II por gramo de tejido. La mezcla de digestión se incubó a 37 °C durante una hora para obtener células

aisladas (Cryer et al., 1987; Butterwith y Griffin, 1989). Entonces, la suspensión celular se filtró a través de gasas estériles y se centrifugó durante 5 minutos a 1100 rpm en una centrífuga clínica para retirar la colagenasa. El número de células se determinó en un hematímetro. Las células aisladas se resuspendieron en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino, 5 µg/mL de insulina, 50 µg/mL de estreptomycin y 50 U/mL de penicilina (medio basal) y se inocularon en cajas de cultivo. Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 95% O₂ y 5% de CO₂ y se les cambio el medio cada tercer día.

4.2.2.- CULTIVOS SERIALES DE FFP

Cuando los cultivos alcanzaron preconfluencia (5 días después de ser inoculados) las células se cosecharon con tripsina al 0.15 % luego de un lavado con EDTA al 0.02 % en PBS, y se reinocularon en una o dos cajas de cultivo a una densidad de inóculo de 1.2×10^4 células/cm² en medio basal. Las células restantes de algunas transferencias o subcultivos se congelaron en el mismo medio con 10 % de glicerol como crioprotector, a fin de contar con células para posteriores experimentos.

4.2.3.- CONDICIONES DE CULTIVO PARA LAS CÉLULAS 3T3 F442A

Las células 3T3-F442A se resuspendieron en DMEM suplementado con 5 % de suero de ternera, 50 µg/mL de estreptomycin y 50 U/mL de penicilina y se inocularon en cajas de cultivo a una densidad de 1×10^3 células /cm². Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95 % O₂ y 5 % CO₂ y se les cambió el medio cada tercer día. Las células de cultivos preconfluentes se cosecharon con tripsina 0.15 % luego de un lavado con EDTA 0.02 % en PBS y se reinocularon en cajas de cultivo a la densidad de inóculo inicial en DMEM suplementado con 5 % de suero de ternera, 50 µg/mL de estreptomycin y 50 U/mL de penicilina. Las células restantes de algunos subcultivos se congelaron en el mismo medio con 10 % de glicerol como crioprotector y otras se emplearon para experimentos posteriores.

4.2.4.- ROJO OLEOSO O

Se preparó una solución de trabajo con rojo oleoso O para teñir los cultivos celulares y poder cuantificar la conversión adiposa alcanzada por las células. La solución se preparó disolviendo 4.2 g de rojo oleoso O en 1200 mL de isopropanol absoluto. La mezcla se dejó en reposo toda la noche a temperatura ambiente sin agitación y se filtró en papel Whatman No. 1. Una vez filtrada, se le adicionaron 900 mL de agua tridestilada y se volvió a dejar en reposo toda la noche a 4 °C sin agitación. Posteriormente la solución se filtró dos veces más y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso (Ramírez-Zacarias et al., 1992).

4.2.5.- EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ADIPOGÉNICA DE LOS FFP

FFP provenientes de cultivos prefluorescentes fueron inoculados en DMEM con 5 µg/mL de insulina, biotina 1 µM, estreptomina 50 µg/mL y 50 U/mL de penicilina (Kuri-Harcuch y Green, 1978) y diferentes concentraciones de suero de pollo (Cryer et al., 1987; Butterwith y Griffin, 1989) o bien 10 % de suero de ternera ó 10 % de suero fetal de bovino. Al cabo de 5 ó 9 días los cultivos fueron fijados con formalina al 10 % en PBS durante 30 minutos. Posteriormente los cultivos se tiñeron por inmersión en la solución de rojo oleoso O durante 12 h. Al cabo de ese tiempo, se lavaron exhaustivamente con agua y el exceso se evaporó colocando las placas teñidas a una temperatura de 37 °C. El colorante fijado en el estrato celular se extrajo aplicando 1 mL de isopropanol por placa de cultivo y removiendo con pipeta. El colorante extraído se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm (Ramírez-Zacarias et al., 1992).

4.2.6.- EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CAPSAICINA SOBRE LOS FFP

FFP provenientes de cultivos prefluorescentes se inocularon en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 1×10^3 células/cm² en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino, 5 µg/mL de insulina y antibióticos. Cuando los cultivos alcanzaron prefluorescencia se alimentaron con DMEM suplementado con suero de pollo o de ternera, insulina 5 µg/mL, biotina 1 µM y diferentes concentraciones de Cap. Al cabo de 7 días los cultivos se fijaron

y se determinó el grado de acumulación lipídica por el método de tinción con rojo oleoso O (Cuadro 1).

4.2.7.- EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS 3T3-F442A

Para evaluar el efecto de la Cap sobre las células 3T3-F442A se utilizaron cultivos inoculados a una densidad de 1×10^3 células/cm² en DMEM suplementado con 5 % de suero de ternera y antibióticos. Cuando los cultivos alcanzaron preconfluencia se inocularon con 5 % de suero de ternera, insulina 5 µg/mL y biotina 1 µM y diferentes concentraciones de la Cap. Al cabo de 7 días los cultivos se fijaron con formalina y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la conversión adiposa alcanzada por las células bajo los diferentes tratamientos (Cuadro 2).

4.2.8.- EFICIENCIA DE CLONACIÓN DE LAS CÉLULAS 3T3-F442A EN PRESENCIA DE CAPSAICINA

Para comprobar que las concentraciones a usar de la Cap no eran tóxicas para las células se realizaron eficiencias de clonación de las células 3T3-F442A en presencia de este compuesto. Se inocularon 100 células/caja en placas de 60 mm de diámetro en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal y antibióticos. Tres días después de haber sido inoculadas se les agregaron, al medio de cultivo, diferentes concentraciones de la Cap. Al cabo de 10 días las células se fijaron, se tiñeron con hematoxilina y se contó el número de colonias formadas.

4.2.9.- DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA DESHIDROGENASA DEL GLICEROL-3-FOSFATO (EC 1.1.1.8) EN LOS PREADIPOCITOS 3T3-F442A

Para determinar el efecto de Cap sobre la actividad de la deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato en las células 3T3-F442A, se extrajeron los estratos citosólicos de monocapas de adipocitos de ratón mantenidos en medio adipogénico adicionado con diferentes concentraciones de Cap. Las monocapas de los cultivos

postconfluentes se lavaron con PBS y se extrajeron con 200 μ L de 50 mM de Tris pH 7.5, 1.0 mM de EDTA, 1mM de 2-mercaptoetanol y 0.5% de Triton X-100 (Kuri-Harcuch, W., resultados no publicados). A los extractos citosólicos se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976). El ensayo enzimático se realizó colocando de 0 a 695 μ L de amortiguador Tris/EDTA, adicionando 200 μ L de NADH 1.2 mM. Posteriormente, se adicionó de 1 a 20 μ g de proteína citosólica (según el grado de diferenciación adiposa de las monocapas) y se mezcló perfectamente. Para iniciar la reacción se agregaron 100 μ L de fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) 2.0 mM y se incubó; la reacción se detuvo agregando 100 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20 %. El tiempo de reacción 0 estuvo dado por una mezcla de incubación a la que se le agregó SDS al 20 % antes de iniciar la reacción con el sustrato de la enzima (DHAP 2.0 mM). También se incluyó un control en el que el sustrato de la enzima se sustituyó por agua tridestilada. Posteriormente se determinó la absorbencia de las mezclas de incubación en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm y la actividad enzimática se determinó con la siguiente formula:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{Abs}_{t_0} - \text{Abs}_{t_n}}{\text{Tiempo}} \times \frac{1}{\text{long (cm)}} \times \frac{\text{Volumen (mL)}}{\text{mg proteína}}$$

$\alpha M_{340} \text{ nm NADH}$

Abs_{t_0} = Absorbencia tiempo cero

Abs_{t_n} = Absorbencia final

$\alpha M^{340} \text{ nm NADH}$ = Coeficiente de extinción molar del NADH a 350 nm.

Las concentraciones finales de la mezcla de incubación fueron: Trietanolamina 100 mM pH 5, EDTA 2.5 mM, NADH 12 mM, DHAP 2 mM (Kozak y Jensen, 1974; Wise y Green, 1978).

| INICIO | PC | 7°DIA |
|-----------|--------------|---------------------------------------|
| 10% SF, I | 10% ST, I, B | TINCIÓN, EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN |
| | 10% SF, I, B | " |
| | 10% SP, I, B | " |
| | 15% SP, I, B | " |
| | 20% SP, I, B | " |
| | 25% SP, I, B | " |

| INICIO | PC | 7°DIA |
|-----------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 10% SF, I | 25% SP, I, B | TINCIÓN, EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN |
| | 25% SP, I, B + CAP ⁻⁷ M | " |
| | 25% SP, I, B + CAP ⁻⁶ M | " |
| | 25% SP, I, B + CAP ⁻⁵ M | " |
| | 25% SP, I, B + CAP ⁻⁴ M | " |

CUADRO 1.- Diseño experimental para la evaluación de la capacidad adipogénica y el efecto de la capsaicina sobre la acumulación de lípidos en los fibroblastos fetales de tejido adiposo de pollo. (SP, suero pollo; SF, suero fetal; ST, suero ternera; I, insulina 5µg/mL; B, biotina 1µM; PC, preconfluencia; CAP, capsaicina)

INICIO

PC

7°DIA

| 5% ST | 5% ST, I, B | TINCIÓN, EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN |
|-------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| | 5% ST, I, B + AR ⁻⁶ M | " |
| | 5% ST, I, B + CAP ⁻⁷ M | " |
| | 5% ST, I, B + CAP ⁻⁶ M | " |
| | 5% ST, I, B + CAP ⁻⁵ M | " |
| | 5% ST, I, B + CAP ⁻⁴ M | " |

CUADRO 2.- Diseño experimental para la evaluación del efecto de la capsaicina sobre la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-F442A de ratón. (ST, suero ternera; I, insulina 5µg/mL; B, biotina 1µM; PC, preconfluencia; CAP, capsaicina; AR, ácido retinoico)

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Establecimiento de Subcultivos Seriales de Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo

Hasta ahora no existen líneas celulares establecidas de preadipocitos de aves (Butterwith, 1997). Por ello, todo estudio *in vitro* sobre la adipogénesis en aves requiere el establecimiento de cultivos primarios de preadipocitos que posean la capacidad de diferenciarse *in vitro* en adipocitos maduros. Trabajos previos reportaron el establecimiento de cultivos primarios de preadipocitos de pollo a partir de tejido adiposo de animales de 3 a 6 semanas de vida (Butterwith y Goddard, 1991; Cryer et al., 1987). No obstante, estos cultivos soportan un número limitado de subcultivos seriales o transferencias y obligan a un constante sacrificio de animales para la obtención de nuevos cultivos primarios. Esto hace altamente deseable un sistema de cultivo de preadipocitos de aves que además de poseer alta capacidad para diferenciarse *in vitro* pueda soportar múltiples transferencias y así optimizar el uso de los animales sacrificados. Por lo anterior, a fin de contar con un sistema óptimo para el estudio de la adipogénesis del tejido adiposo en aves y de su modulación por diferentes agentes dietéticos o farmacológicos, se desarrolló un protocolo de subcultivos seriales de células de tejido adiposo con una alta capacidad de proliferar *in vitro* y con la facultad de desarrollar algunas de las características de un adipocito maduro.

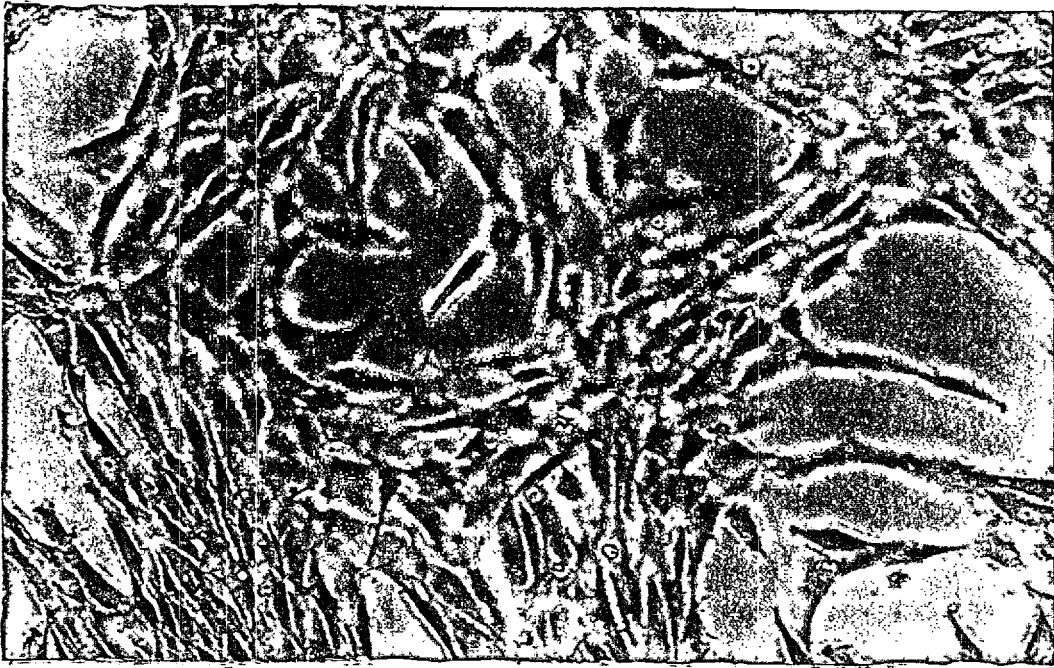
Con el propósito de lograr el mayor número de subcultivos posibles, se analizó el potencial proliferativo de fibroblastos derivados de tejido adiposo de fetos de pollo de tres diferentes días de incubación. Se utilizó tejido fetal por su facilidad a disgregarse y porque se obtienen más células viables y con mayor capacidad de proliferación que los tejidos adultos (Freshney, 1994). Para el establecimiento de los cultivos primarios se utilizaron fetos de pollos de 13, 16, y 19 días de desarrollo de las líneas comerciales de la industria avícola local. El tejido adiposo subcutáneo de los fetos se extrajo en condiciones asépticas y se disgregó con colagenasa tipo II para obtener células aisladas (Cryer et al., 1987). Las células obtenidas se inocularon en cajas de cultivo en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 5 µg/mL de insulina y antibióticos (medio basal). En todos los casos, la disgregación enzimática de las muestras de tejido adiposo condujo al establecimiento de cultivos primarios de células con apariencia fibroblástica. Los fibroblastos que se obtuvieron fueron mononucleados y sin inclusiones lipídicas en su citoplasma. (Figura 1 a)

En condiciones *in vitro* las células normales inician el proceso de diferenciación cuando cesan su proliferación, o sea, cuando ya han saturado la superficie de cultivo (Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984). Esta situación indica que la proliferación celular y la diferenciación son procesos antagónicos. Por ello fue importante encontrar una densidad celular adecuada que permitiera lograr subcultivos preconfluentes evitando que las células se comprometieran a diferenciación y por consiguiente iniciaran el programa de diferenciación. De igual forma, cultivos con baja densidad no son convenientes ya que impiden que las células logren una proliferación adecuada, debido a que cuando existen pocas células los factores de crecimiento que ellas mismas sintetizan y liberan al medio de cultivo son escasos.

Para asegurar un óptimo protocolo de transferencias seriales de las células de los cultivos primarios fue necesario determinar la densidad de inóculo adecuada; es decir, aquella densidad de inóculo que asegure la proliferación celular y que a la vez permita un oportuno subcultivo periódico de poblaciones celulares subconfluentes (Todaro y Green, 1963). Para ello, se inocularon células provenientes de cultivos primarios a diferentes densidades y luego de cinco días los cultivos se cosecharon con tripsina y se cuantificó el número de células por tratamiento. La figura 2 muestra el efecto de la densidad de inóculo sobre el número de duplicaciones de la población de fibroblastos fetales de 13 días. Para esta población celular, así como para las de fetos de 16 y 19 días (resultados no mostrados), una densidad de 1.2×10^4 células/cm² permitió obtener cultivos preconfluentes al quinto día de cultivo. Densidades mayores a la señalada produjeron cultivos casi totalmente confluentes, en tanto que densidades menores dieron lugar a bajos niveles de proliferación celular. Para subcultivos sucesivos de las tres poblaciones se utilizó la densidad de inóculo de 1.2×10^4 células/cm².

a



b

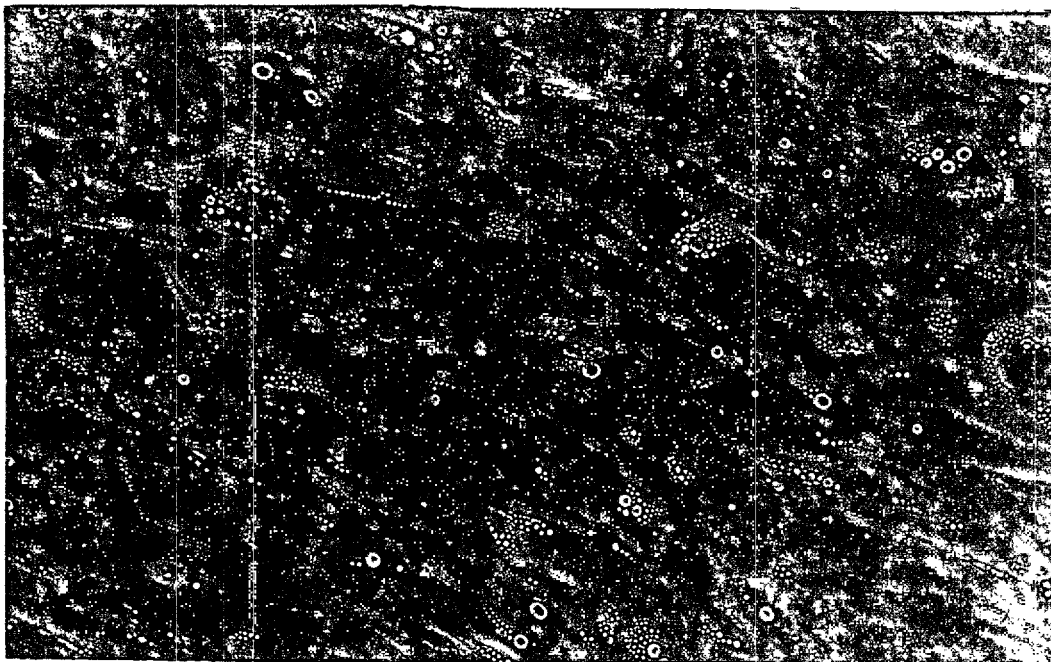


Figura 1.- Microfotografías de Cultivos Primarios de Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo. Se obtuvo tejido adiposo subcutáneo de fetos de pollo de 13, 16 y 19 días de incubación. Los fragmentos de tejido adiposo se disgregaron con colagenasa tipo II. Las células aisladas se inocularon en cajas de cultivo en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina. (a) Cultivos preconfluentes, (b) Cultivos confluentes mantenidos en 20 % de suero de pollo.

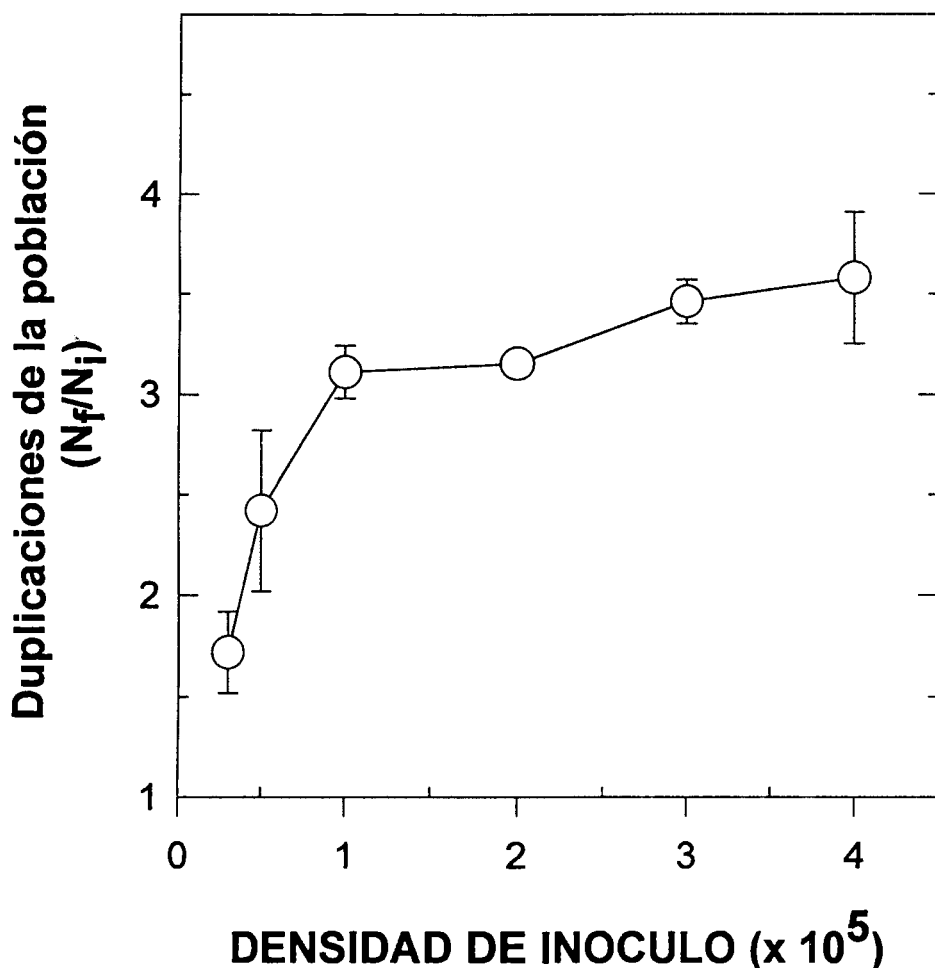


Figura 2.- Efecto de la Densidad de Inóculo sobre la Proliferación *in vitro* de Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo. Fibroblastos fetales de pollo (FFP) de 13 días de incubación se inocularon a las densidades señaladas en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina, en placas de cultivo de 60 mm de diámetro y se les cambió el medio cada tercer día. Al quinto día de cultivo las células se cosecharon con tripsina y se determinó el número de células por tratamiento. La proliferación celular se reporta como el número de veces que se duplicó la población celular inicial. N_f , número de células al final del experimento; N_i , número de células inoculadas.

Un sistema de cultivo exitoso debe permitir un alto número de subcultivos seriales, los cuales en algunos casos pueden dar lugar al surgimiento de líneas celulares establecidas o continuas. En todo caso, las poblaciones celulares provenientes de cultivos primarios deben someterse a un rígido esquema de transferencias sucesivas, regulares y oportunas (Todaro y Green, 1963). Tal esquema debe evitar que las células confluyan entre sí y cesen su proliferación, pues esto podría llevarlas a un estado de diferenciación terminal que cancelaría ulteriores subcultivos. Inoculando las poblaciones obtenidas a una densidad de 1.2×10^4 células/cm² y transfiriendo los cultivos en estado preconfluyente (esto es, antes de que las células cesaran su proliferación por falta de espacio para proliferar), se logró mantener una tasa de sobrevivencia alta de las distintas poblaciones celulares durante un número variable de subcultivos. Los fibroblastos derivados del tejido adiposo subcutáneo de fetos de 13 días de incubación se mantuvieron viables durante 25 transferencias y alcanzaron un número de duplicaciones acumulativas de la población de 68 (Figura 3). A su vez, las células derivadas de fetos de 16 días de incubación soportaron 19 subcultivos seriales y lograron aproximadamente 64 duplicaciones acumulativas de la población. Por otro lado, los fibroblastos derivados de tejido adiposo de fetos de 19 días sobrevivieron sólo a 9 subcultivos y su población se duplicó tan sólo 18 veces (Figura 3). En las tres poblaciones estudiadas, los tiempos de duplicación de la población (T_D) fueron mayores a medida que avanzó el número de subcultivos (Figura 4), lo cual indicó la senescencia de las poblaciones. No obstante el alto número de subcultivos y el prolongado tiempo de cultivo *in vitro* logrado con algunas poblaciones celulares, eventualmente todas mostraron signos de senescencia y perdieron su capacidad de proliferar *in vitro*. La viabilidad de las poblaciones celulares mostró ser inversa a los días de incubación del embrión de procedencia (Figura 3). Aunque el protocolo de cultivo desarrollado no dio lugar al establecimiento de una línea celular de preadipocitos de pollo, sí resultó exitoso por cuanto permitió un número de subcultivos mayor a los reportados hasta ahora para cualquier tipo de células normales de ave (Rattan y Buchanan, 1982; Kuwana et al., 1996).

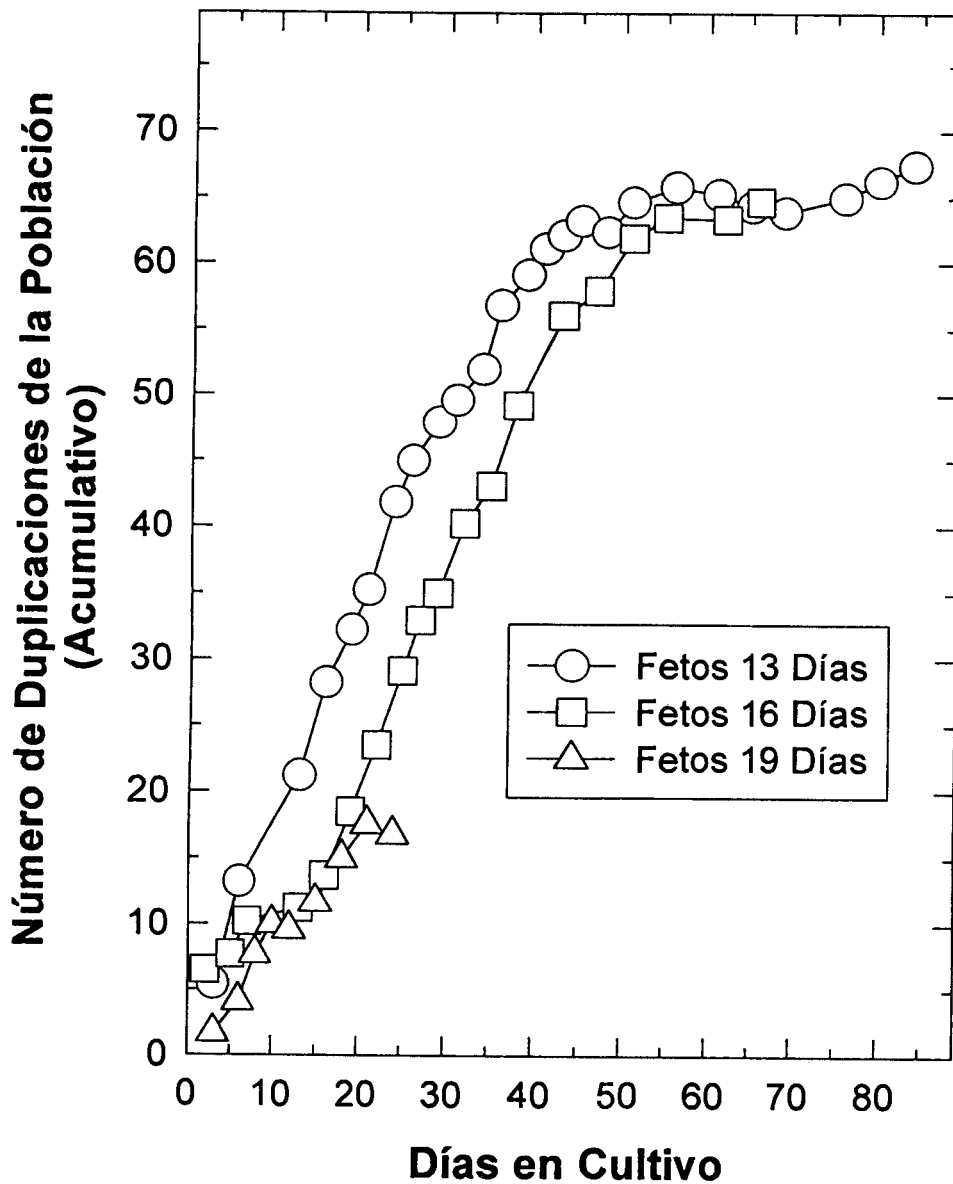


Figura 3.- Efecto de la Edad del Feto sobre el Subcultivo Serial de Fibroblastos Fetales de Pollo. FFP provenientes de fetos de 13, 16 y 19 días de incubación se inocularon a una densidad de 1.2×10^4 células/cm² en DMEM con 10 % de suero fetal bovino y 5 µg/mL de insulina, y se les cambió el medio cada tercer día. Cuando los cultivos alcanzaron preconfluencia las células se cosecharon con tripsina y se reinocularon en placas de cultivo a la densidad de inóculo inicial y bajo las mismas condiciones.

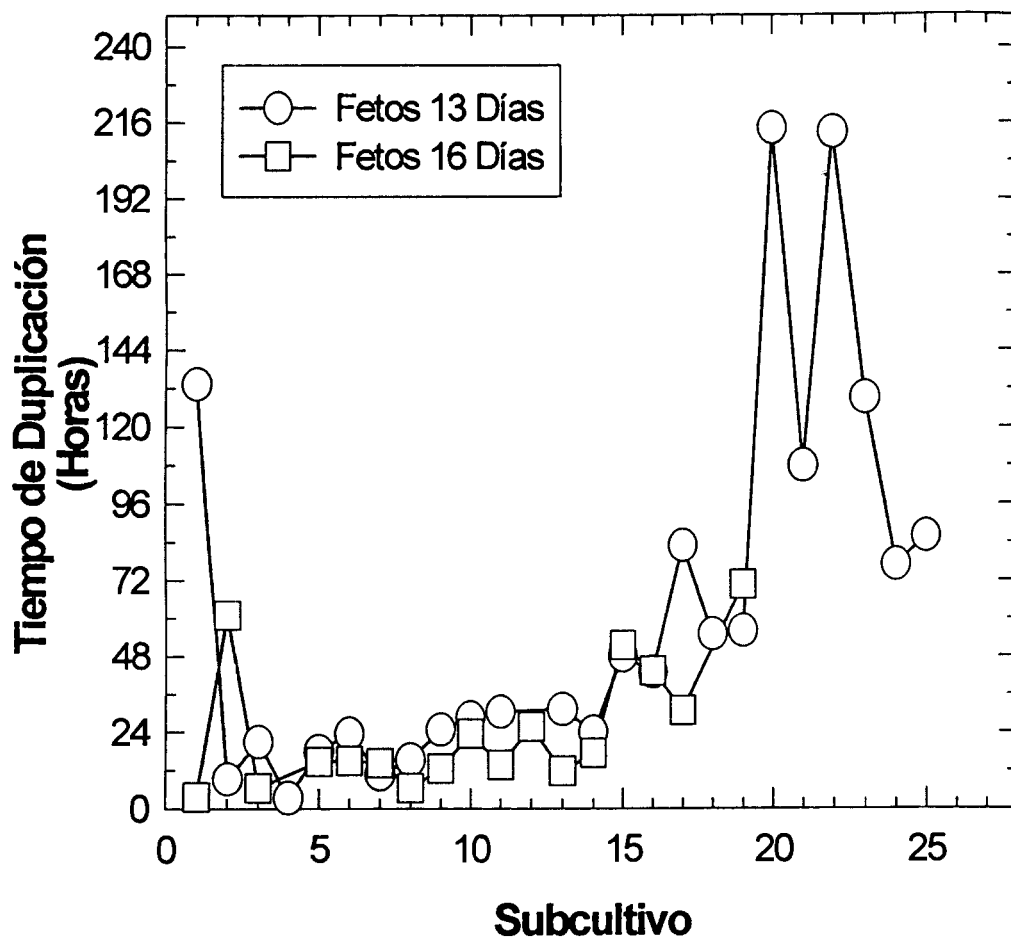


Figura 4.- Efecto del Número de Subcultivo sobre el Tiempo de Duplicación de la Población de Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo. FFP de 13 y 16 días de incubación fueron inoculados a una densidad de 1.2×10^4 células/cm² en DMEM con 10 % de suero fetal bovino y 5 µg/mL de insulina, y realimentados cada tercer día. Cuando los cultivos alcanzaron preconfluencia (5 días después de ser inoculados) las células se cosecharon con tripsina 0.15 % luego de un lavado con EDTA 0.02 % en PBS. El tiempo de duplicación se reportó como los días en cultivo sobre el número de duplicaciones logradas.

Las condiciones de cultivo empleadas en el presente trabajo fueron las usuales en el cultivo de células de mamífero: un medio de cultivo basal con un pH de 7.4, suplementado con suero fetal de bovino, una temperatura de 37 °C y una atmósfera con un porcentaje de 5-10 % CO₂ . Otros trabajos han explorado condiciones de cultivo más acordes a la fisiología de las aves: temperatura de incubación de 40 °C (Rattan y Buchanan, 1982), medios de cultivo enriquecidos (Butterwinth y Goddard, 1991) y suplementados con suero de pollo (Cryer et al., 1987) a un pH de 8 (Kuwana et al., 1996). Sin embargo, ninguno de estos trabajos logró mantener células viables por más de 20 subcultivos. Con todo, aunque nuestras condiciones de cultivo permitieron un sistema de subcultivo exitoso, la senescencia y la eventual muerte de las poblaciones celulares sugieren que dichas condiciones de cultivo son todavía sujetos de mejoras.

5.2.- Evaluación de la Capacidad Adipogénica de los Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo.

Aunque los adipocitos maduros que forman el tejido adiposo de cualquier vertebrado parecen derivar de células precursoras de naturaleza fibroblástica (Van y Roncari, 1977; Negrel et al., 1978; Broad y Ham, 1983; Van et al., 1976; Cryer et al., 1987), su proceso de diferenciación puede presentar modalidades propias de cada especie o grupo animal. Reportes previos mostraron que los preadipocitos de ratón se diferenciaron en adipocitos terminales por la acción de factores adipogénicos presentes en el suero con el que se suplementa el medio de cultivo (Kuri-Harcuch y Green, 1978). Aunque la naturaleza de tales factores adipogénicos apenas empieza a ser conocida (Zaitzu y Serrero, 1990; Bachmeier y Löffler, 1994), se sabe que sueros de diferente origen varían en su contenido de actividades adipogénicas. El suero fetal de bovino y el suero de ternera exhiben altas concentraciones de estas actividades, en tanto que el suero de gato adulto carece total o casi totalmente de ellos (Kuri-Harcuch y Green, 1978; Salazar-Olivo et al., 1995).

Algunos investigadores han mostrado que los preadipocitos de pollo no se diferencian en presencia de los sueros señalados, sino solo cuando al medio se le adiciona suero de pollo (Cryer et al., 1987; Butterwith, 1994). Para poder determinar la capacidad adipogénica de las células obtenidas se evaluó el efecto de diferentes tipos de suero sobre la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos. Para ello, se alimentaron cultivos preconfluentes de fibroblastos de tejido adiposo de fetos de pollo de 13 días de incubación con medio basal adicionado de 10, 15, 20 ó 25 % de suero de pollo, o bien, con 10 % de suero de ternera o 10 % de suero fetal bovino. En todos los casos el medio de cultivo incluyó 5 $\mu\text{g/mL}$ de insulina y 1 μM de biotina. Al cabo de 9 días los cultivos se fijaron con formalina al 10 % y se tiñeron con una solución saturada de rojo oleoso O, un colorante específico para triglicéridos (Ramírez-Zacarias et al., 1992). La cuantificación espectrofotométrica del colorante retenido en las monocapas celulares mostró que los FFP acumularon triglicéridos en su citoplasma en presencia de suero de pollo. La acumulación intracitoplásmica de triglicéridos fue proporcional a la concentración de suero de pollo e independiente del origen del mismo (Figura 5 y Figura 1b). Por otro lado, estas células fueron incapaces de acumular grasa intracitoplásmica cuando se cultivaron con suero de ternera o suero fetal bovino, dos reconocidas fuentes de factores adipogénicos para adipocitos de mamífero (Figura 5). Estos resultados sugieren que existen diferencias interespecíficas en cuanto a los factores de diferenciación presentes en el suero de cada especie. Por ejemplo, mientras que para lograr la diferenciación en preadipocitos de mamíferos se requieren los factores adipogénicos del suero fetal de bovino o del suero de ternera (Kuri-Harcuch y Green, 1978), los fibroblastos embrionarios de tejido adiposo de pollo requieren la presencia de suero de pollo para lograr una acumulación intracitoplásmica de lípidos (Cryer et al., 1987). En este trabajo siempre se adicionó insulina al medio de cultivo puesto que esta hormona estimula el transporte y metabolismo de la glucosa así como su incorporación a grasa intracitoplásmica en células de mamíferos (Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984). Se tomó como base lo reportado para roedores porque el papel de la insulina en el proceso de diferenciación y en la proliferación de células de ave no es claro.

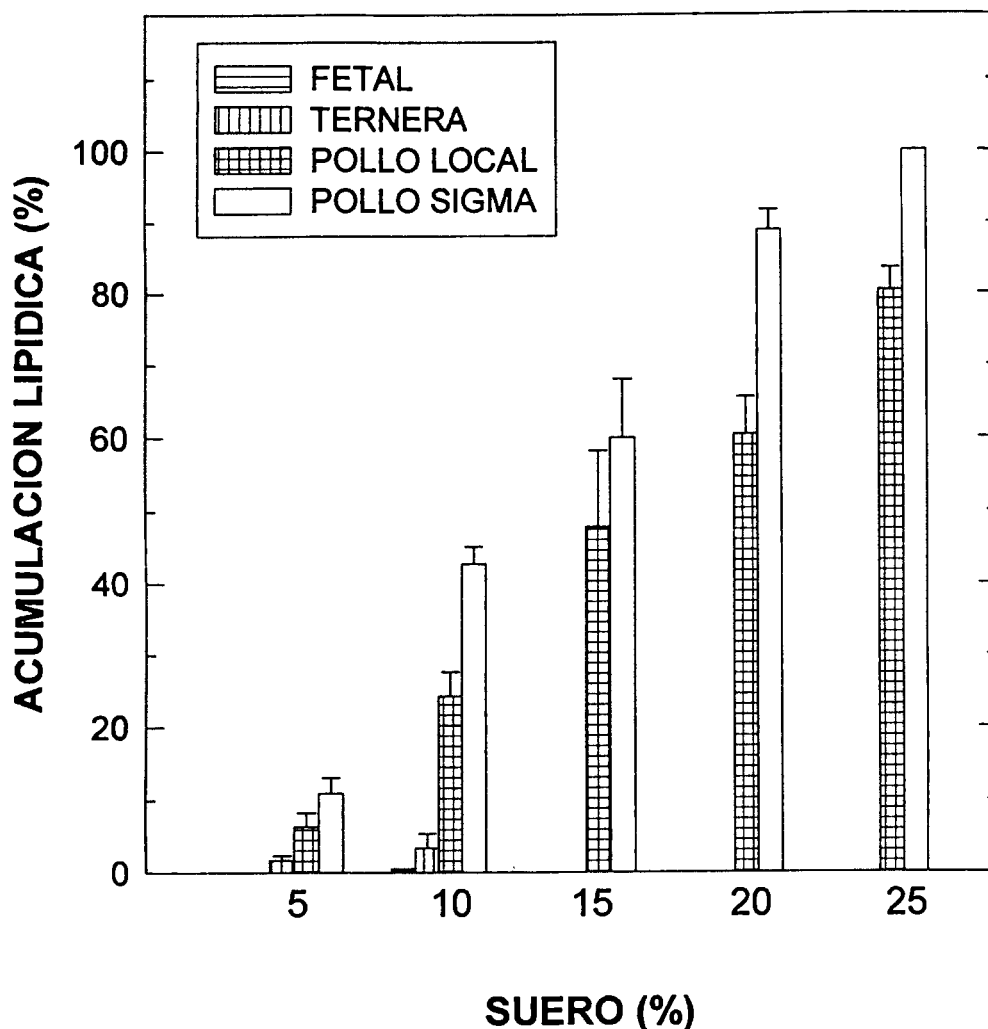


Figura 5.- Efecto del Suero sobre la Acumulación Lipídica en Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo. FFP de 13 días de incubación se sembraron a una densidad de 1.2×10^4 células/cm² en DMEM con 10 % de suero fetal bovino y 5 µg/mL de insulina y se realimentaron cada tercer día. Cuando los cultivos alcanzaron preconfluencia se les agregaron diferentes concentraciones y distintas fuentes de suero. Al cabo de 5 ó 9 días de tratamiento, las células se fijaron con formalina y se tiñeron con rojo oleoso O. El colorante fue extraído y se cuantificó la acumulación lipídica para cada tratamiento.

Esta situación deja la puerta abierta para la realización de nuevas investigaciones en torno a éste tema. La biotina se adicionó por ser un cofactor necesario para algunas enzimas lipogénicas importantes en la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos (Kuri-Harcuch y Castro-Muñozledo, 1984).

No obstante la abundante acumulación de grasa mostrada por los fibroblastos fetales de pollo, éstas conservaron siempre la apariencia fibroblástica y no mostraron la forma redondeada típica de un adipocito terminal. Esto pudo deberse a que el tiempo de cultivo fuera insuficiente para los cambios morfológicos que son parte del proceso de diferenciación adiposa. Otra explicación es que la abundante fibronectina que los fibroblastos fetales de pollo segregan en el cultivo (Yamada et al., 1975) estabilizó el citoesqueleto de actina de estas células y obstaculizó con ello los cambios morfológicos típicos de la adipogénesis (Spiegelman y Ginty, 1983). Estas explicaciones podrían probarse mejorando las condiciones de cultivo de forma que permitan el mantenimiento de un cultivo por mayor tiempo (15 a 30 días), o bien, neutralizando el efecto que la fibronectina ejerce sobre el citoesqueleto de actina. En todo caso, las pocas microfotografías publicadas sobre el proceso de conversión adiposa de fibroblastos de pollo muestran solamente células de apariencia fibroblástica con numerosas inclusiones lipídicas (Hood et al., 1979), como las reportadas en el presente trabajo.

5.3.- Efecto de la Capsaicina (Cap) y la Dihidrocapsaicina (dhCap) sobre la Acumulación Intracitoplásmica de Triglicéridos de los Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo.

Una vez definidas las condiciones de cultivo que permitieron la acumulación de lípidos en los fibroblastos fetales de pollo, se evaluó el efecto de la Cap sobre la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos en estas células. Para ello, se inocularon fibroblastos fetales de pollo en medio de cultivo basal y 24 horas después se alimentaron con medio adicionado con 25 % de suero de pollo, 5 µg/mL de insulina y 1 µM de biotina (medio adipogénico), en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de Cap. Luego de 9 días de incubación bajo estas condiciones las células se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para determinar la

acumulación lipídica alcanzada con cada tratamiento. Los resultados obtenidos mostraron que la Cap no afectó mayormente la acumulación intracitoplásmica de triglicéridos en los fibroblastos fetales de pollo salvo a la más alta concentración (100 μ M Cap) en la cual la Cap ocasionó solamente una disminución marginal de la acumulación lipídica (Figura 6). Para descartar la posibilidad de que un capsaicinoide distinto a la Cap fuera el responsable de los efectos sobre el tejido adiposo, se repitieron estos experimentos con dihidrocapsaicina (dhCap), otro importante capsaicinoide presente en los frutos de chile (Surh y Lee, 1996). Los resultados obtenidos con la dhCap (Figura 7) no difirieron de los obtenidos con la Cap (Figura 6). Ninguno de los compuestos inhibió significativamente la acumulación lipídica ocasionada en las células FFP por el suero de pollo.

5.4.- Efecto de Capsaicina Sobre la Adipogénesis de Preadipocitos 3T3-F442A de Ratón.

La ausencia de efectos de la Cap y de la dhCap sobre la acumulación lipídica en los fibroblastos fetales de pollo contradecían los antecedentes publicados en torno al efecto de la Cap sobre el tejido adiposo. Toda vez que los resultados previos se obtuvieron en estudios *in vivo* con roedores (Nopanitaya, 1973; Kawada et al., 1986 a; Srinivasan y Satyanarayana, 1986; Cui y Himms-Hagen, 1992 a; 1992 b; Melnyk y Himms-Hagen, 1995), tal discrepancia podría explicarse por al menos tres hipótesis:

- a) los efectos de la Cap varían de un grupo animal a otro,
- b) la Cap requiere de activación metabólica, de tal forma que es un metabolito de ésta el que actúa sobre el tejido adiposo,
- c) la Cap no afecta directamente al tejido adiposo. Su efecto sobre éste es mediado por alguna molécula inducida por la Cap en otro tejido, un neurotransmisor por ejemplo, la cual entonces afectaría el desarrollo del tejido adiposo.

Para probar la primera hipótesis, se evaluó el efecto de la Cap sobre la diferenciación de preadipocitos de ratón de la línea celular 3T3-F442A. Estas células son de naturaleza fibroblástica y muestran una alta capacidad de diferenciarse en

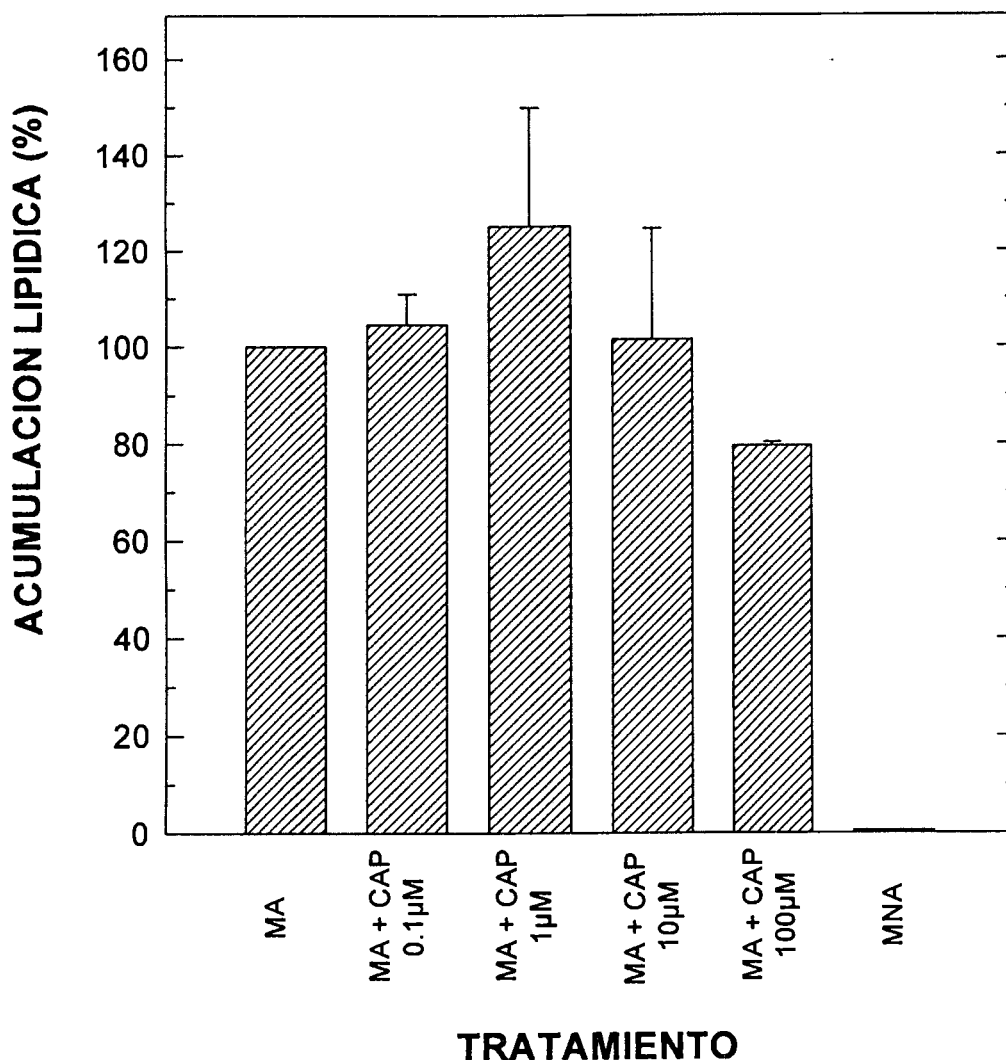


Figura 6.- Efecto de la Capsaicina sobre la Acumulación Lipídica de Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo. FFP de 13 días de incubación provenientes de cultivos preconfluentes se inocularon en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 1.2×10^4 células/cm² en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 5 μg/mL de insulina. Cuando las células alcanzaron preconfluencia los cultivos se alimentaron con medio adipogénico (MA; DMEM suplementado con 25 % de suero de pollo, 5μg/mL de insulina y 1μM de biotina) y las adiciones de Cap señaladas, o en medio no adipogénico (MNA; DMEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino, 5 μg/mL de insulina y 1 μM de biotina). Los cultivos se mantuvieron en tales condiciones 11 días; al cabo se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica por tratamiento.

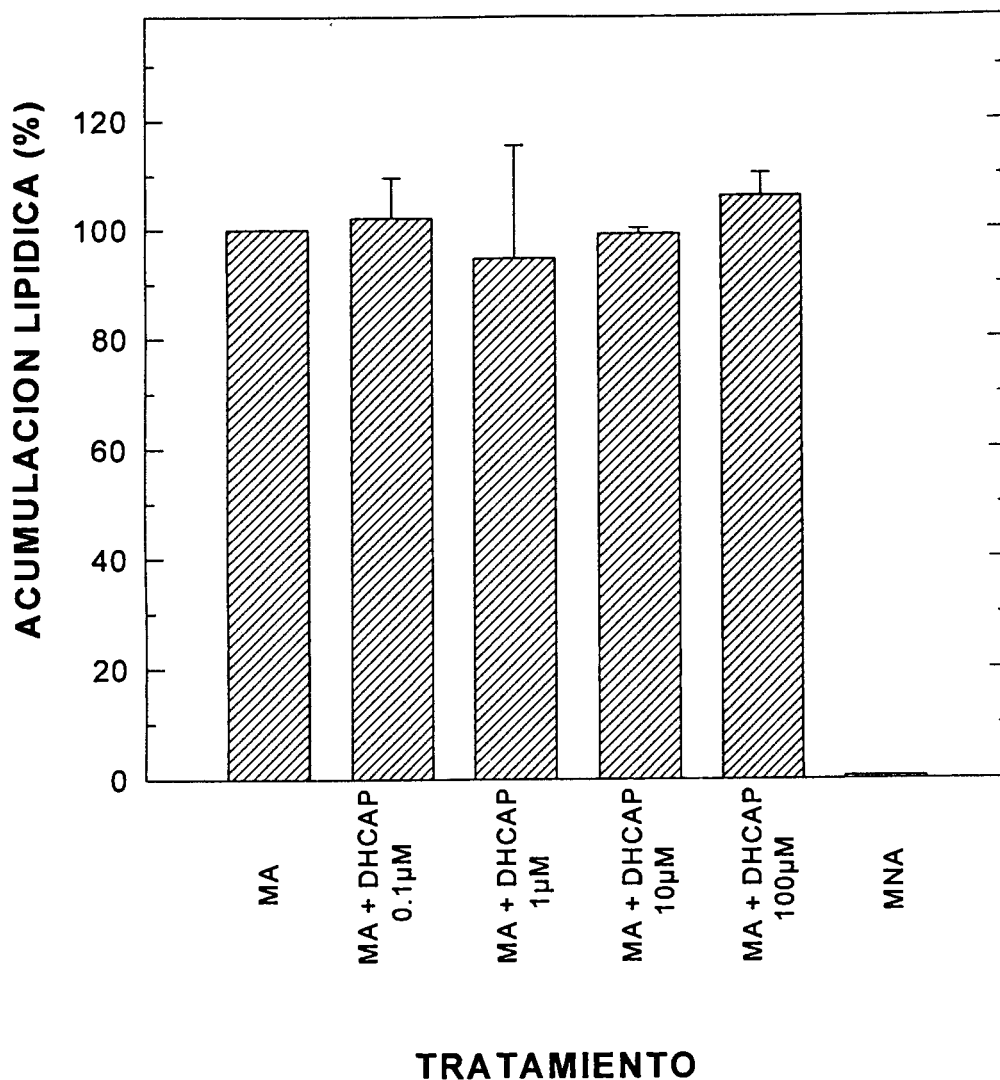


Figura 7.- Efecto de la Dihidrocapsaicina sobre la Acumulación Lipídica de Fibroblastos Fetales de Tejido Adiposo de Pollo. FFP de 13 días de incubación provenientes de cultivos preconfluentes se inocularon en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 1.2×10^4 células/cm² en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 5 µg/mL de insulina. Cuando las células alcanzaron preconfluencia los cultivos se alimentaron con medio adipogénico (MA; DMEM suplementado con 25 % de suero de pollo, 5 µg/mL de insulina y 1 µM de biotina) y las adiciones de dhCap señaladas, o en medio no adipogénico (MNA; DMEM suplementado con 10 % de suero fetal de bovino, 5 µg/mL de insulina y 1 µM de biotina). Los cultivos se mantuvieron en tales condiciones durante 11 días. Al cabo se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica por tratamiento.

adipocitos maduros cuando cesan su proliferación en presencia de factores adipogénicos presentes en el suero que se adiciona al medio de cultivo, usualmente suero fetal de bovino o suero de ternera (Kuri-Harcuch y Green, 1978).

La diferenciación adiposa de estas células puede ser bloqueada por algunos compuestos como el ácido retinoico, la forma ácida de la vitamina A, (Kuri-Harcuch, 1982; Salazar-Olivo et al., 1994). Se ensayó el efecto de la Cap sobre las células 3T3-F442A alimentando cultivos preconfluentes con medio de cultivo suplementado con 5 % de suero de ternera, 5 µg/ mL de insulina y 1 µM de biotina. Tal condición de cultivo estimula la diferenciación adiposa de estas células (Kuri-Harcuch y Green, 1978). Se alimentaron cultivos paralelos con este medio adicionado con 0.1, 1, 10 ó 100 µM de la Cap, o bien adicionado con 1 µM de ácido retinoico, una condición que inhibe la adipogénesis de estas células (Kuri-Harcuch, 1982). Al cabo de 11 días de tratamiento, algunos de los cultivos se fijaron y se tiñeron con rojo oleoso O para cuantificar la acumulación lipídica, en tanto que otros se procesaron como se indica en Materiales y Métodos para cuantificar la actividad de algunas enzimas relacionadas con la síntesis de lípidos. A diferencia de los resultados obtenidos con los FFP, la Cap inhibió la acumulación de lípidos de las células 3T3-F442A y tal inhibición fue dependiente de la concentración del compuesto (Figura 8). Aunque una concentración de 1 µM de Cap ocasionó una inhibición significativa, una concentración de 100 µM del compuesto no abatió la acumulación de lípidos de estas células, a diferencia del ácido retinoico (Figura 8). Con el fin de lograr una mayor comprensión del mecanismo mediante el cual la Cap afecta la adipogénesis, se evaluó el efecto de la Cap sobre la actividad de la deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato, (EC 1.1.1.8) una importante enzima en la síntesis de triglicéridos. Los resultados del análisis enzimático corroboraron los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la Cap sobre la acumulación lipídica. La actividad de la enzima deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato fue inhibida por la presencia de Cap en el medio de cultivo que promueve la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-F442A. Al igual que en el análisis de acumulación lipídica, el efecto de la Cap sobre la deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato fue dependiente de la concentración: 1 µM de Cap indujo la disminución de la actividad enzimática de tan solo el 10 % (Figura 9),

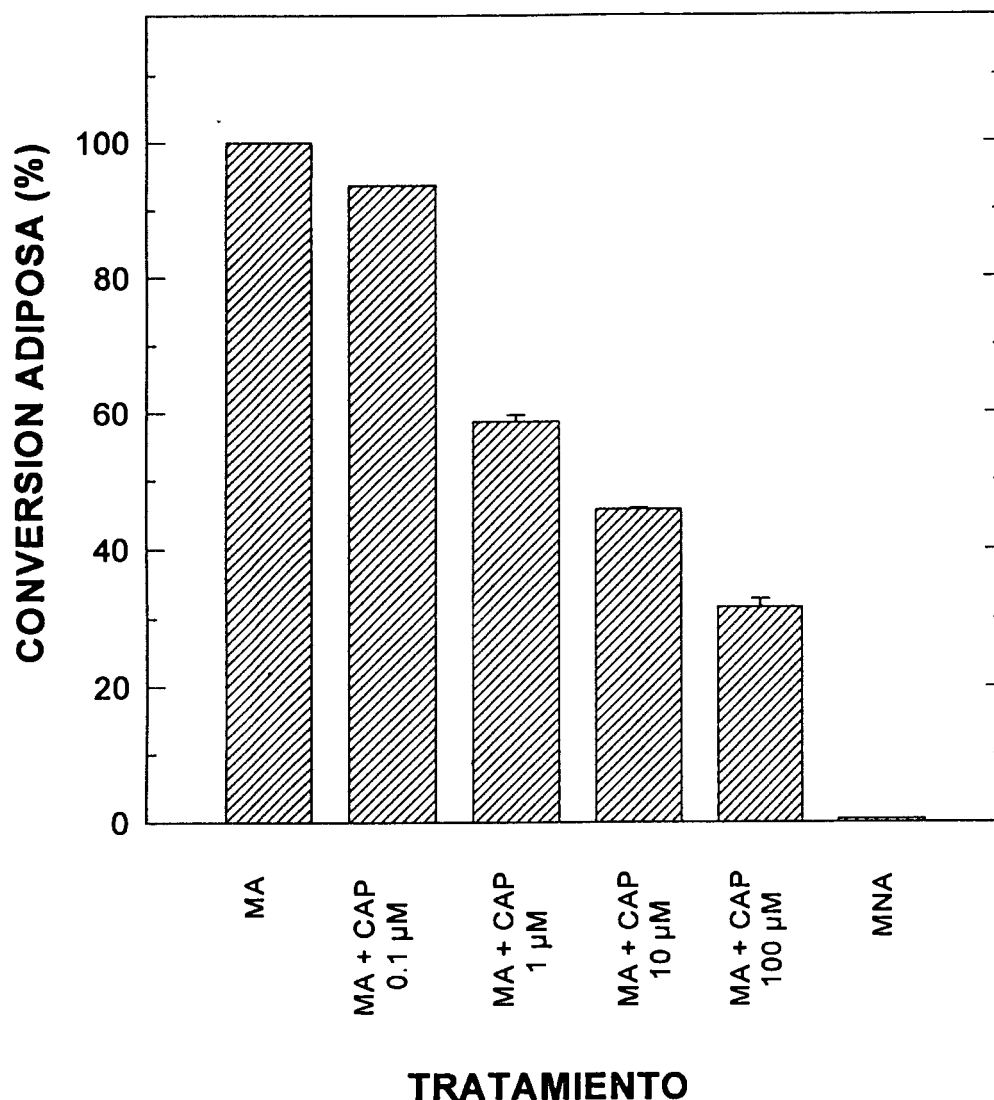


Figura 8.- Efecto de la Capsaicina sobre la Diferenciación Adiposa de Preadipocitos 3T3-F442A de Ratón. Preadipocitos 3T3-F442A se inocularon a una densidad de 1×10^3 células/cm² en DMEM suplementado con 5 % de suero de ternera y 5 μg/mL de insulina (medio basal). Cuando los cultivos alcanzaron preconfluencia se agregó al medio 1 μM de biotina y diferentes concentraciones de capsaicina. Al cabo de 11 días de tratamiento las células se fijaron con formalina 10 %, se tiñeron con rojo oleoso O y se cuantificó la conversión adiposa en un espectrofotómetro. El medio adipogénico (MA) contenía 5 % de suero de ternera, 5 μg/mL de insulina y 1 μM de biotina. El medio no adipogénico (MNA) contenía además de lo mencionado en el MA, 1 μM de ácido retinoico, el cual es un inhibidor de la adipogénesis.

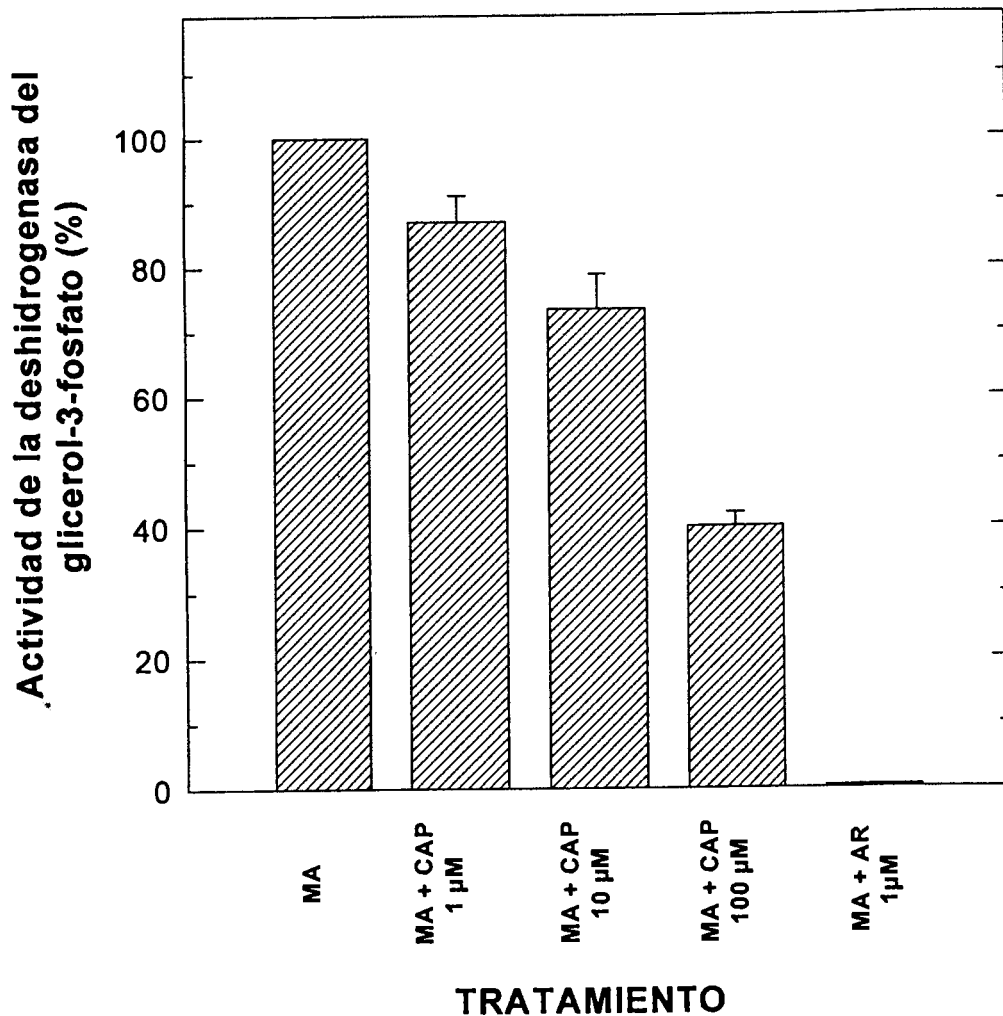


Figura 9.- Efecto de la Capsaicina sobre la Actividad de la Deshidrogenasa del Glicerol-3-Fosfato (EC 1.1.1.8) en los Preadipocitos 3T3-F442A de Ratón.

Preadipocitos 3T3-F442A se inocularon a una densidad de 1×10^3 células/cm² en DMEM suplementado con 5 % de suero de ternera y 5 μg/mL de insulina (medio basal). Cuando los cultivos alcanzaron preconfluencia se agregó al medio 1 μM de biotina y diferentes concentraciones de capsaicina. Al cabo de 11 días de postconfluencia en tales condiciones de cultivo, se les retiró el medio, se lavaron las monocapas celulares y se extrajeron con amortiguador conteniendo Tritón X-100. Los extractos obtenidos se emplearon para cuantificar la actividad enzimática como se describe en materiales y métodos. El medio adipogénico (MA) contenía 5 % de suero de ternera, 5 μg/mL de insulina y 1 μM de biotina. El medio no adipogénico (MNA) contenía además de lo mencionado en el MA, 1 μM de ácido retinoico, el cual es un inhibidor de la adipogénesis.

en tanto que 100 μM del compuesto ocasionó una disminución de 60 % en la actividad de la enzima. Al igual que con el parámetro anterior, la acumulación lipídica, la Cap fue incapaz de abatir completamente la actividad de la enzima deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato, bajo ninguna de las concentraciones ensayadas. Por el contrario, la actividad de la enzima fue totalmente inhibida por 1 μM de ácido retinoico (Figura 9), como ha sido reportado previamente (Kuri-Harcuch, 1982, Salazar-Olivo et al., 1994). Por otro lado, ninguna de las concentraciones de Cap ensayadas sobre las células 3T3-F442A, ni las concentraciones del vehículo empleado (etanol absoluto), tuvieron un efecto significativo en la sobrevivencia o la proliferación de estas células. La capacidad de formación de colonias de los preadipocitos 3T3-F442A no fue afectada por ninguna de las concentraciones de la Cap o del vehículo empleado (Figura 10). Estos resultados descartan la posibilidad de que los efectos de la Cap sobre la acumulación lipídica o la actividad enzimática de la deshidrogenasa del glicerol-3-fosfato puedan deberse a efectos citotóxicos del compuesto sobre las células 3T3-F442A, y sugieren que la Cap actúa en forma específica sobre el programa de diferenciación adiposa de estas células. El hecho de que la Cap afectara la diferenciación celular de los preadipocitos 3T3-F442A y no la acumulación de lípidos de los fibroblastos de tejido adiposo de pollo comprueba la primera hipótesis propuesta: " Los efectos de Cap sobre el tejido adiposo varían de un grupo animal a otro". Estos resultados concuerdan perfectamente con los de muchos otros grupos de investigadores (Nopanitaya, 1973; Kawada et al., 1986 a; Srinivasan y Satyanarayana, 1986; Cui y Himms-Hagen, 1992 a ;1992 b; Melnyk y Himms-Hagen, 1995) que muestran que la Cap es capaz de inhibir el desarrollo del tejido adiposo disminuyendo su celularidad. Asimismo, estos resultados son la primera evidencia experimental que muestra que la Cap afecta el desarrollo del tejido adiposo actuando directamente sobre las células precursoras de adipocitos, y no a través de las células nerviosas como sugieren algunos trabajos previos (Himms-Hagen et al.,1990) o recientemente publicados (Giordano et al., 1998). Además, el mecanismo de acción de la Cap parece ser diferente al del ácido retinoico puesto que la Cap no es capaz de inhibir totalmente la diferenciación celular aún usando concentraciones de 100 μM .

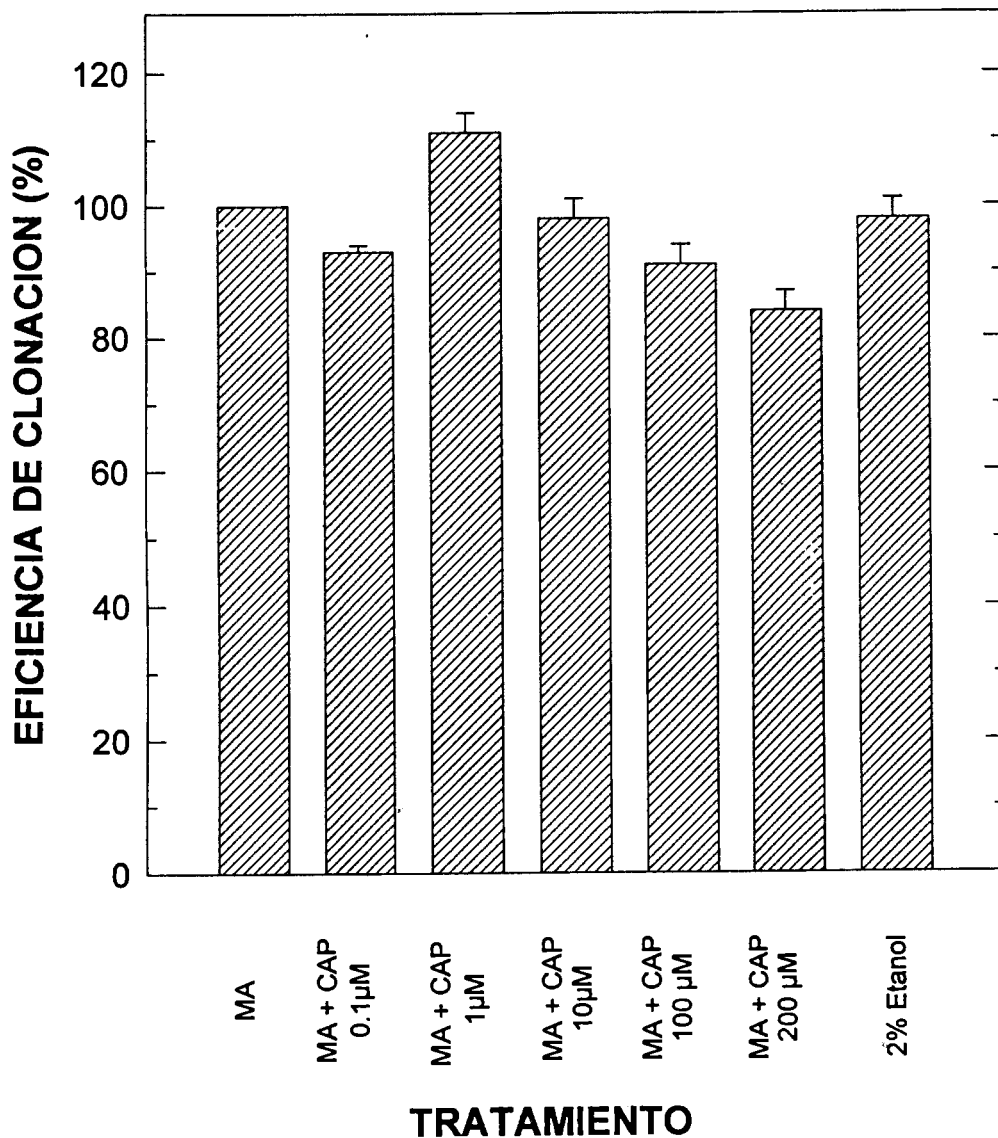


Figura 10.- Eficiencia de Clonación de Preadipocitos 3T3-F442A en Presencia de Diferentes Concentraciones de Capsaicina. En DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera se inocularon 100 células de preadipocitos 3T3-F442A en placas de cultivo de 60 mm de diámetro. Dos días después de haber sido inoculados se les cambió el medio de cultivo, al cual le fueron agregadas las cantidades arriba especificadas de capsaicina. Al cabo de 10 días de tratamiento las colonias se fijaron, se tiñeron con hematoxilina y se contaron.

6.- CONCLUSIONES

No obstante lo reportado por otros autores, los resultados de este estudio muestran que el subcultivo serial de células de aves pudo lograrse empleando condiciones de cultivo convencionales para células de mamífero. Empleando un medio de cultivo basal (DMEM) con un pH de 7.4, suplementado con suero fetal de bovino e insulina, y temperatura de incubación de 37 °C, se logró mantener viable una población de fibroblastos fetales de pollo durante más de 20 transferencias consecutivas. Este prolongado tiempo de cultivo para células esencialmente normales permitirá una disminución en el número de animales sacrificados para fines de investigación así como un mejor aprovechamiento de los mismos.

La capacidad adipogénica de los fibroblastos de tejido adiposo fetal de pollo dependió de la presencia de suero de pollo en el medio de cultivo y no se manifestó en cultivos mantenidos con suero fetal de bovino. Estos resultados contradicen la probada capacidad adipogénica del suero fetal de bovino en sistemas *in vitro* de preadipocitos de mamífero. Tal contradicción podría explicarse asumiendo que el o los factores responsables de la adipogénesis en aves fueran específicos del grupo biológico. De esa forma, los factores adipogénicos del suero de mamíferos no actuarían sobre los preadipocitos de pollo; estas células serían sensibles solo a los efectos de factores presentes en el suero de pollo o de otras aves. Estudios en curso en nuestro laboratorio buscan caracterizar el o los factores adipogénicos presentes en el suero de pollo.

La Cap inhibió la diferenciación adiposa de los preadipocitos 3T3-F442A de ratón, pero no la acumulación lipídica de los fibroblastos de tejido adiposo fetal de pollo. Esta diferencia de efectos de la Cap sobre ambos procesos adipogénicos sugiere que los efectos del compuesto varían con el grupo biológico estudiado. Esta explicación concuerda con los resultados obtenidos por otros investigadores que muestran que la Cap afectó flujos iónicos en neuronas de ratón en cultivo pero no en neuronas de pollo (Wood et al., 1988), o que la Cap no afectó el comportamiento alimentario y el contenido de grasa abdominal en gallinas ponedoras (Furuse et al., 1994). Por otro lado, el efecto inhibitorio de la Cap sobre la adipogénesis de los

preadipocitos 3T3-F442A fue dependiente de la concentración del compuesto y afectó funciones específicas del proceso de diferenciación sin afectar la viabilidad celular. Este es el primer reporte que muestra que el tejido adiposo es un blanco directo del efecto de la Cap. Los resultados de este estudio sugieren que los efectos de la Cap sobre el tejido adiposo de animales de laboratorio podrían ser independientes de los efectos de este compuesto sobre el sistema nervioso.

7.-PERSPECTIVAS

El presente trabajo estableció un exitoso protocolo de cultivo para fibroblastos fetales de tejido adiposo de pollo que permitió mantener viables a estas células por un número de subcultivos mayor al hasta hoy reportado para cualquier linaje celular de aves. Con todo el subcultivo reiterado de estas células no condujo a su desarrollo en una línea celular establecida o continua. Las innegables ventajas que una línea celular reportaría al estudio de la fisiología y el desarrollo del tejido adiposo de aves, y a otros campos como la elaboración de vacunas, hace atractivo profundizar en el estudio de las condiciones de cultivo *in vitro* de estas células.

Así mismo se logró estandarizar las condiciones que se requerían para que estas células exhibieran una acumulación de lípidos en su citoplasma, la cual presumiblemente se debió a un proceso de diferenciación. No obstante, queda la interrogante de saber si esta acumulación de lípidos se debió realmente a un proceso de diferenciación o fue solo una modulación fenotípica de las células en respuesta a la gran cantidad de lípidos presentes en el medio de cultivo. Aun faltan estudios que muestren si el proceso de diferenciación adiposa en aves depende de los factores de diferenciación presentes en el suero de esta especie o bien sea dependiente la cantidad de lípidos. Este aspecto podría abordarse probando el efecto de algunos factores adipogénicos ya conocidos como la insulina y la hormona de crecimiento.

Por otro lado, nuestros resultados muestran por vez primera que las células adiposas son un blanco directo de la Cap, y sugieren que los efectos de este compuesto sobre el tejido adiposo podrían ser independientes de los efectos que la Cap ejerce sobre el sistema nervioso. Para precisar el mecanismo de acción por el que la Cap afecta el tejido adiposo deberá analizarse la presencia de receptores, membranales, citoplásmicos o nucleares, para la Cap en preadipocitos y en adipocitos. De probarse la presencia de algún tipo de receptor para la Cap en cualquiera de estas células podría entonces estudiarse el mecanismo molecular del efecto de este compuesto.

8.- BIBLIOGRAFIA

Ailhaud, G., Grimaldi, P. and Négrel, R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12:207-33.

Akiba, Y., Murakami, H., Park, J-H., Senkoylu, N., Kusanagi, M., Takahashi, K. and Sato, K. 1995. The effects of dietary lipid on poultry performance and composition. *Proc Aust Poult Sci Symp* 7:1-8.

Anónimo. 1986. Metabolism and toxicity of capsaicin. *Nutr Rev* 44:20-2.

Anónimo. 1996. La producción de pollo en México. *Claridades Agropecuarias*. (México) 40: 7-9.

Bachmeier, M. and Löffler, G. 1994. Adipogenic activities in commercial preparations of fetuin. *Horm Metab Res* 26:92-6.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.

Broad, T. E. and Ham, R. G. 1983. Growth and adipose differentiation of sheep pre-adipocyte fibroblast in serum free medium. *Eur J Biochem* 135:33-9.

Butterwith, S. C. 1997. Regulators of adipocyte precursor cells. *Poult Sci* 76:118-23.

Butterwith, S. C. and Goddard, C. 1991. Regulation of DNA synthesis in chicken adipocytes precursor cells by insulin-like growth factors, platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β . *J Endocrinol* 131:203-9.

Butterwith, S. C. and Griffin, H. D. 1989. The effects of macrophage-derived cytokines on lipid metabolism in chicken (*Gallus domesticus*) hepatocytes and adipocytes. *Comp Biochem Physiol* 94A:721-74.

Butterwith, S. C. 1994. Molecular events in adipocyte development. *Pharmac Ther* 61:399-411.

Chen, N. X., Hausman, G. J. and Wright, J. T. 1996. Hormonal regulation of insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factor I (IGF-I) secretion in porcine stromal-vascular cultures. *J Anim Sci* 74:2369-75.

Cherry, J. A., Swartworth, W. J. and Siegel, P. B. 1984. Adipose cellularity studies in commercial broiler chicks. *Poult Sci* 63:97-108.

Cornelius, P., MacDugal, O. A. and Lane, M. D. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14:99-129.

Cryer, J., Woodhead, B. G. and Cryer, A. 1987. The isolation and characterisation of a putative adipocyte precursor cell type from the white adipose tissue of the chicken (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol* 86A:515-21.

Cui, J. and Himms-Hagen, J. 1992a. Long-term decrease in body fat and in brown adipose tissue in capsaicin-desensitized rats. *Am J Physiol* 262:R568-73.

Cui, J. and Himms-Hagen, J. 1992b. Rapid but transient atrophy of brown adipose tissue in capsaicin-desensitized rats. *Am J Physiol* 262:R562-67.

Freshney, R. I. 1994. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 3rd ed. Wiley-Liss. New York. 486p.

- Furuse, M., Nakajima, S-I., Miyagawa, S., Nakagawa, J. and Okumura, J-I. 1994. Feeding behavior, abdominal fat and laying performance in laying hens given diets containing red pepper. *Jpn Poult Sci* 31:45-52.
- Giordano, A., Morroni, M., Carle, F., Gesuita, R. Marchesi, G. F. and Cinti, S. 1998. Sensory nerves affect the recruitment and differentiation of rat periovarian brown adipocytes during cold acclimation. *J Cell Sci* 111:2587-94.
- Govindarajan, V. S. and Satyanarayana, M. N. 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* 29:435-74.
- Green, H. and Kehinde, O. 1975. An Established preadipose cell line and its differentiation in culture II.- Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5:19-27.
- Green, H. and Kehinde, O. 1976. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7:105-13.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sul, H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809.
- Griffin, H. D., Windsor, D. and Goddard, C. 1991. Why are young broiler chickens fatter than layer-strain chicks?. *Comp Biochem Physiol* 100A:205-10.
- Guyton, A. C. 1989. *Tratado de fisiología médica*. 7º ed. Interamericana McGraw-Hill. pp 868-97.

Hembree, J. R., Pampusch, M. S., Yang, F., Causey, J. L., Hathaway, M. R. and Dayton, W. R. 1996. Cultured porcine myogenic cells produce insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) and transforming growth factor beta-1 stimulates IGFBP-3 production. *J Anim Sci* 74:1530-40.

Himms-Hagen, J., Cui, J. and Sigurdson, L. 1990. Sympathetic and sensory nerves in control of growth of brown adipose tissue: Effects of denervation and of capsaicin. *Neurochem Int* 17:271-79.

Hood, B. S., Balks, Mitchell, R. S. and Lestourgeon, D. 1979. Rapid quantitative adipose conversion of chicken fibroblasts by high concentrations of chicken serum or plasma. *Experientia*. 35:1038-39.

Hood, R. L. 1982. The cellular basis for growth of the abdominal fat pad in broiler-type chickens. *Poult Sci* 61:117-21.

Hoogenboom, L. A. P. and Kuiper, H. A. 1997. The use of *in vitro* models for assessing the presence and safety of residues of xenobiotics in food. *Trends Food Sci Tech* 8:157-66.

Houseknecht, K. L. and Bauman, D. E. 1997. Regulation of lipolysis by somatotropin: Functional alteration of adrenergic and adenosine signaling in bovine adipose tissue. *J Endocrinol* 152:465-75.

Kawada, T., Hagihara, K-I. and Iwai, K. 1986a. Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J Nutr* 116:1272-78.

Kawada, T., Suzuki, T., Takahashi, M. and Iwai, K. 1984. Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats. *Toxicol Appl Pharm* 72:449-56.

- Kawada, T., Watanabe, T., Takaishi, T., Takana, T. and Iwai, K. 1986b. Capsaicin-induced β -adrenergic action on energy metabolism in rats: Influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *J Nutr* 116:1272-78.
- Klaus, S. 1996. Functional differentiation of white and brown adipocytes. *BioEssays* 19:215-23.
- Klaus, S., Ely, M., Encke, D. and Heldmaier, G. 1995. Functional assessment of white and brown adipocyte development and energy metabolism in cell culture. *J Cell Sci* 108:3171-80.
- Kozak, L. P. and Jensen, J. T. 1974. Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol-3- phosphate deshydrogenase. *J Biol Chem* 249:7775-81.
- Kuri-Harcuch, W. 1982. Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23:164-9.
- Kuri-Harcuch, W. and Castro-Muñozledo, F. 1984. Diferenciación adipocítica de las células 3T3. *Rev Invest Clin (Méx.)* 36:377-88.
- Kuri-Harcuch, W. and Green, H. 1978. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:6107-9.
- Kuwana, T., Hashimoto, K., Nakanishi, A., Yasuda Y., Tajima, A. and Naito, M. 1996. Long-term culture of avian embryonic cells *in vitro*. *Int J Dev Biol* 40:1061-4.
- MacDougald, O. A. and Lane M. D. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 63:345-73.

McFarland, D. C. 1992. Cell culture as a tool for the study of poultry skeletal muscle development. J Nutr 122:818-29.

Mackall, J. C., Student, A. K., Polakis, S. E. and Lane, M. D. 1976. Induction of lipogenesis during differentiation in a "preadipocyte" cell line. J Biol Chem 251:6462-64.

Mc Keehan, W., Barnes, D., Reid, L., Stanbridge, E., Murakami, H. and Sato, G. H. 1990. Frontiers in mammalian cell culture. In Vitro Cell Dev Biol 26:9-23.

Melnyk, A. and Himms-Hagen, J. 1995. Resistance to aging-associated obesity in capsaicin-desensitized rats one year After treatment. Obes Res 3:337-44.

Miller, C., Zhang, Z., Hamilton, S. M. and Teel, R. W. 1993. Effects of capsaicin on liver microsomal metabolism of the tobacco-specific nitrosamina NNK. Cancer Lett 75:45-52.

Mínguez-Mosquera, M. I. and Hornero-Mendez, D. 1993. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum L*), paprika and oleoresin by reversed-phase HPLC. J Agric Food Chem 41:1616-20.

Mínguez-Mosquera, M. Y. and Fernández-Díez, M. J. 1981. Ripe spanish red pepper capsicum genus. Relationship between red and yellow carotenoid pigments. Grasas y Aceites. (México) 32:293-98.

Morré, D. J., Sun, E., Geilen, C., Wu, L-Y., de Cabo, R., Krasagakis, K., Orfanos, C. E. and Morré, D. M. 1996. Capsaicin inhibits plasma membrane NADH oxidase and growth of human and mouse melanoma lines. Eur J Cancer 32A:1995-2003.

- Salazar-Olivo, L. A., Castro-Muñozledo, F. and 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.
- Salimath, B. P. and Satyanarayana, M. N. 1987. Inhibition of calcium and calmodulin-dependent phosphodiesterase activity in rats by capsaicin. *Biochem Biophys Res Commun* 148:292-9.
- Spiegelman, B. M. and Ginty, C. A. 1983. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3 adipocytes. *Cell* 35:657-66.
- Srinivasan, M. R. and Satyanarayana, M. N. 1986. Influence of red pepper (Chillies) and spice mixture feeding on liver, serum and carcass lipids of rats. *Nutr Rep Int* 34:365-71.
- Surh, Y-J. and Lee, S. S. 1995. Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sci* 56:1845-55.
- Surh, Y-J. and Lee, S. S. 1996. Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen. *Food Chem Toxicol* 34:313-6.
- Todaro, G. J. and Green, H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17:299-313.
- Van itallie, T. B. and Abraham, S. 1983. Some hazards of obesity and its treatment. En: *Recent advances in obesity research: IV Proceeding of the 4TH International Congress on Obesity*. Hirsch and Van itallie (Eds). John Libbey. London Paris. pp 1-19.

Van, R. L. R., Bayliss, C. E. and Roncari, D. A. K. 1976. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest* 58:699-704

Van, R. L. R. and Roncari, D. A. K. 1977. Isolation of fat cell precursor from adult rat adipose tissue. *Cell Tiss Res* 181: 197-203.

Wise, L. S. and Green, H. 1978. Studies of lipoprotein lipase during the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 13:233-42.

Wood, J. N., Winter, J., James, I. F., Rang, H. P., Yeats, J. and Bevan, S. 1988. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci* 8:3208-20.

Yamada, K. M., Yamada, S. S. and Pastan, I. 1975. The major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts is an agglutinin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 73:1217-21.

Zaitso, H. and Serrero, G. 1990. Pedersen feluin contains three adipogenic factors with distinct biochemical characteristics. *J Cell Physiol* 144:485-91.

Zhong, C., Nakae, H. S., Hu, C. Y. and Mirosh, L. W. 1995. Effect of full feed and early feed restriction on broiler performance, abdominal fat level, cellularity, and fat metabolism in broiler chickens. *Poult Sci* 74:1636-43.