



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Efecto de capsaicinoides sobre muerte y sobrevivencia celular in vitro

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

Francisco Javier Luján Méndez

Dirigido por:

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Presidente




Firma

Dr. Elhadi Yahia Kazus
Secretario



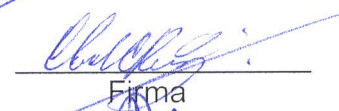
Firma

Dr. Roberto Ferriz Martínez
Vocal



Firma

M.C.O. Eduardo Castro Ruíz
Suplente



Firma

M.N.H. Josué López Martínez
Suplente



Firma



Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre de 2016
México

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS DE
FITOQUÍMICOS Y DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. TERESA GARCÍA GASCA Y
CON EL APOYO DEL CONACYT, DEL CINVESTAV Y DE LA UAQ.**

*A mi madre,
Que leyó para mí cuando yo no sabía leer,
Y puso un libro en mis manos cuando supe.*

Erin Bowman.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), sin cuyo apoyo y financiamiento no habría sido posible la realización de esta investigación, ni sus efectos en mi formación profesional.

A mi madre, por su entrega incondicional a la familia y su complicidad en cada una de mis andanzas. A mi padre, por labrarme con su ejemplo *a puño y cincel*. Gracias a ambos, por su amor y sacrificio.

A mis hermanos: Guadalupe, Leticia, Guillermo, Ernesto y Carlos, porque a pesar de que durante estos tres años he estado físicamente ausente en importantes momentos de sus vidas, permanecieron siempre en mi corazón, haciéndome fuerte. Gracias por tanto.

A la doctora Teresa García Gasca, por tomar la dirección de mi trabajo y porque así como exige lo mejor, sabe siempre darlo en correspondencia. Gracias por ser todo lo que es, especialmente mi mentora.

A mis compañeros y colegas del laboratorio: Laureana, Cynthia, Marcel, Octavio, Erick, Paco, Ricardo y Kuri; gracias por compartir conmigo sus aprendizajes, venturas y desventuras. Gracias en fin, por hacer sentir a éste foráneo en casa y entre amigos.

A los miembros del consejo sinodal, gracias por sus consejos y contribuciones a lo largo de estos tres años. Mención aparte para Josué López Martínez, gracias maestro, por tu amistad y apoyo durante todo este tiempo.

RESUMEN

Los capsaicinoides son metabolitos secundarios sintetizados en chiles picantes, los principales son capsaicina (CAP) y dihidrocapsaicina (DHC), de los cuales existen datos controversiales respecto a sus efectos sobre la muerte celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de CAP y DHC sobre la sobrevivencia y muerte celular. Ensayos dosis-respuesta fueron desarrollados en fibroblastos murinos embrionarios (NIH/3T3) expuestos a cada capsaicinoide. Utilizando la concentración letal 50 (CL₅₀) correspondiente, fue evaluada su bioactividad sobre parámetros de sobrevivencia, apoptosis y necrosis. Las curvas dosis-respuesta fueron evaluadas a través de regresión simple y los efectos sobre la proliferación y sobrevivencia celular con ANOVA de una vía y análisis post-hoc de Tukey y Dunnett (IC95%). Bajo las condiciones experimentales de este estudio, los efectos provocados por la CAP y la DHC presentaron el mismo patrón dosis-dependiente a lo largo de todo el espectro de concentraciones estudiado ($p > 0.05$), dentro del cual $\geq 100 \mu\text{M}$ resultaron eficaces para afectar tanto la proliferación como la sobrevivencia celular ($p < 0.05$). A partir de las curvas dosis-respuesta se identificaron CL₅₀ en aparente igualdad (DHC: 233.93 μM y CAP: 234.67 μM). Los ensayos de bioactividad revelaron que tras 8 h de exposición a la CL₅₀, ambos capsaicinoides incrementaron la apoptosis total en un 52% con respecto al control, mientras que los efectos sobre la necrosis celular fueron marginales. Basados en los perfiles cromatográficos de extractos de *Capsicum chinense*, los cuales revelaron una proporción CAP:DHC $\approx 3:1$; se evaluaron adicionalmente los efectos de una mezcla CAP:DHC (3:1), encontrándose también efectos con predominancia apoptótica (35%). Los resultados de este estudio indican que los efectos biológicos producidos por los dos capsaicinoides principales están sujetos a las mismas interacciones moleculares y que estas obran en favor de un patrón de respuesta común en células NIH/3T3. Asimismo, estos datos podrían indicar que las diferencias entre los divulgados efectos de la CAP y la DHC podrían haber sido determinadas por el tipo celular y no así por el capsaicinoide empleado.

Palabras clave: Capsaicina, dihidrocapsaicina, sobrevivencia celular, apoptosis, necrosis

SUMMARY

Capsaicinoids are secondary metabolites synthesized in hot peppers, the main ones being capsaicin (CAP) and dihydrocapsaicin (DHC), of which there are controversial data regarding their effects on cell death. The objective of this work was to evaluate the effects of CAP and DHC on cell survival and death. Dose-response assays were developed in embryonic murine fibroblasts (NIH / 3T3) exposed to each capsaicinoid. Using the corresponding lethal concentration 50 (LC50), its bioactivity was evaluated on parameters of survival, apoptosis and necrosis. The dose-response curves were evaluated through simple regression and effects on cell proliferation and survival with one-way ANOVA and post-hoc analysis of Tukey and Dunnett (95% CI). Under the experimental conditions of this study, the effects caused by CAP and DHC showed the same dose-dependent pattern over the entire spectrum of concentrations studied ($p > 0.05$), within which $\geq 100 \mu\text{M}$ were effective to affect both proliferation and cell survival ($p < 0.05$). From the dose-response curves LC50 was identified in apparent equality (DHC: $233.93 \mu\text{M}$ and CAP: $234.67 \mu\text{M}$). Bioactivity assays revealed that after 8 h of exposure to LC50, both capsaicinoids increased total apoptosis by 52% with respect to control, while effects on cell necrosis were marginal. Based on the chromatographic profiles of *Capsicum chinense* extracts, which revealed a CAP: DHC $\approx 3: 1$ ratio; the effects of a CAP: DHC (3: 1) mixture were evaluated, with effects with apoptotic predominance (35%). The results of the present study indicate that the biological effects produced by the two major capsaicinoids could be mediated by the same molecular interactions and, as a result of this both compounds work in favor of a common response pattern in NIH/3T3 cells. Also, these data could indicate that the differences between the reported effects of CAP and DHC could have been determined by the cell type and not by the capsaicinoid used.

Key words: Capsaicin, dihydrocapsaicin, cell survival, apoptosis, necrosis

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
2.1 CAPSAICINOIDES, DEFINICIÓN Y BIOSÍNTESIS	3
2.2 INHIBICIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMADAS MEDIADA POR CAPSAICINA	6
2.3 EVENTOS MOLECULARES EN LA APOPTÓISIS INDUCIDA POR CAPSAICINA	9
2.4 LA DUALIDAD DE LOS CAPSAICINOIDES EN CÁNCER	13
2.5 AUTOFAGIA CELULAR INDUCIDA POR CAPSAICINOIDES	19
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 OBJETIVO GENERAL	23
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 MATERIALES	24
6.1.1 MATERIAL VEGETAL	24
6.1.2 CULTIVO CELULAR	24
6.1.3 MATERIAL QUÍMICO	25
6.2 MEDICIONES Y ANÁLISIS	25
6.2.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES DE <i>Capsicum chinense</i>	25
6.2.2 ENSAYOS DOSIS-RESPUESTA	28
6.2.3 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE MUERTE Y SOBREVIVENCIA CELULAR	29
6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1 CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES DE <i>Capsicum chinense</i>	31
7.2 EFECTO DE CAPSAICINOIDES SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA CELULAR	32
7.3 EFECTO DE CAPSAICINOIDES SOBRE MUERTE Y SOBREVIVENCIA CELULAR	36
8. CONCLUSIONES	39

9. REFERENCIAS..... 40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina en las oleorresinas de <i>Capsicum chinense</i>	31
Cuadro 2. Distribución de las poblaciones celulares analizadas	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinodes en el género <i>Capsicum</i>	5
Figura 2. Principales eventos moleculares subyacentes a la apoptosis mediada por CAP en células de cáncer..	12
Figura 3. Modelo mecanicista de los efectos promotores observados en células transformadas expuestas a concentraciones 0.1 a 10 μ M de CAP	17
Figura 4. Cromatograma ejemplo, oleorresina obtenida a partir de muestras de invernadero liofilizadas, sometidas a extracción con acetonitrilo.....	31
Figura 5. Efecto de DHC y CAP sobre la proliferación y sobrevivencia celular.....	32
Figura 6. Curva dosis-respuesta de DHC sobre la proliferación y sobrevivencia..	34
Figura 7. Curva dosis-respuesta de CAP sobre la proliferación y sobrevivencia..	35
Figura 8. Efecto de capsaicinoides sobre muerte y sobrevivencia de células NIH/3T3.....	36

1. INTRODUCCIÓN

Los capsaicinoides son un grupo de metabolitos secundarios responsables de la pungencia de los frutos del género *Capsicum*, de cuyos frutos han sido identificados más de 22 compuestos análogos (Kim y col., 2014) destacando la capsaicina (CAP) y la dihidrocapsaicina (DHC), que típicamente representan entre el 80 y el 90% de los capsaicinoides totales (Cordell y Araujo, 1993; Contreras y Yahia, 1998). Los capsaicinoides son agonistas del receptor de potencial transitorio de tipo vainilloide 1 (TRPV1) un canal iónico no selectivo expresado en múltiples tejidos que opera como receptor polimodal para un amplio espectro de estímulos físicos y químicos, tales como calor, protones y ciertas toxinas (Yang y col., 2015). La inducción o fosforilación de TRPV1 por cualquiera de sus agonistas, resulta en la transducción de respuestas de inflamación y dolor, constitutivas de la pungencia de los frutos *Capsicum* (Cortright y Szallasi, 2004).

La CAP ha sido ampliamente estudiada y diversos efectos biológicos de relevancia farmacológica han sido propuestos (Srinivasan, 2015). En este sentido, destacan sus propiedades antiproliferativas y apoptóticas sobre una amplia variedad de modelos *in vitro*, preferentemente de cáncer, toda vez que la tolerancia al capsaicinoide en sistemas celulares normales es significativamente mayor (Macho y col., 1999; Chow y col., 2007; Zhang y col., 2008; Kim y col., 2010; Impheng y col., 2014; Lau y col., 2014). Sin embargo y a pesar de la creciente comprensión de los mecanismos subyacentes a dichos efectos, el beneficio y seguridad del consumo o uso médico de los capsaicinoides permanece incierto debido a contradictorias evidencias en modelos experimentales de carcinogénesis (Bode y Dong, 2011). A este respecto, pueden reconocerse dos enfoques de estudio en la literatura. El primero, relacionado con las propiedades inhibitorias sobre células cancerígenas con la expectativa de evaluar su potencial terapéutico y, segundo, como potenciales agentes promotores e incluso iniciadores de la carcinogénesis (Kim y col., 1985; Agrawal y col., 1986; Liu y col., 2012).

Mucho menos estudiados, los efectos de la DHC en sistemas celulares *in vitro* han sido por su parte asociados a la inducción de muerte autofágica mediada por catalasa (Oh y col., 2008), en células de las líneas MCF7 y HCT116 (adenocarcinoma mamario y cáncer de colon, respectivamente). Sin embargo, con la puesta en marcha de la autofagia, los escenarios posibles son diversos dado que, en principio, se trata de una respuesta adaptativa de la célula ante el agotamiento de los recursos nutricios, la autofagia puede suponer un recurso de sobrevivencia en células privadas de alimento o bajo la influencia de otras fuentes de estrés mediante la degradación de constituyentes citoplasmáticos dañados o tóxicos y la reutilización de las macromoléculas liberadas (Liu y col., 2013). Al respecto, otros linajes celulares respondieron de diferente manera a la DHC, pues el efecto autofágico provocado confirió mayor resistencia contra la muerte a células pulmonares de dos líneas (WI38 de fibroblastos epiteliales y H1299 de cáncer de pulmón no microcítico), cuyos índices de apoptosis y necrosis fueron menores a los observados en células de las líneas H460 y A549 (cáncer de pulmón) expuestas al mismo tratamiento (Choi y col., 2010). En todos los modelos hasta hoy explorados, la autofagia inducida por DHC ha sido mediada por catalasa, cuya activación incrementó en respuesta al tratamiento, atenuando los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en cada línea celular. En contraste los efectos apoptóticos de la CAP están ligados a la generación de estrés oxidativo, lo que podría indicar tanto diferencialidad en los efectos producidos por cada capsaicinoide, como un probable antagonismo entre las vías citotóxicas que ejecutan.

En este trabajo se determinaron los efectos de los dos capsaicinoides principales sobre la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos murinos embrionarios de la línea NIH/3T3, para luego evaluar su bioactividad por separado y en combinación, sobre parámetros de sobrevivencia y muerte celular. Analizados en contexto con las evidencias moleculares más recientes (Lee y col. 2015, Lin y col., 2016), los datos obtenidos sugieren que las diferencias entre los divulgados efectos de la CAP y la DHC podrían haber sido determinadas por el tipo celular y no así por el capsaicinoide empleado.

2. ANTECEDENTES

2.1 CAPSAICINOIDES: DEFINICIÓN Y BIOSÍNTESIS.

El género *Capsicum* pertenece a la familia *Solanaceae*, del clado *Asteridae* de las *eudicotas* y constituye un cultivo diploide, facultativo y autopolinizador estrechamente emparentado con la patata, jitomate, berenjena, tabaco y petunia (Kim y col., 2014). El género *Capsicum* alberga 25 especies categorizadas, 5 de las cuales están domesticadas (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum pubescens*) y son, en su conjunto, cultivadas y consumidas a lo largo de todo el mundo (Djian-Caporilano y col., 2007; Wahyuni y col., 2011).

La sensación de dolor y ardor provocada por los capsaicinoides del chile es una cualidad importante y en gran medida responsable de la popularidad de los frutos del género *Capsicum* (Asnin y Park, 2015; Smith, 2015). También conocida como pungencia, dicha sensación es resultado de la activación selectiva de neuronas sensoriales que transmiten información sobre estímulos nocivos al sistema nervioso central. Caterina y col. (1997) identificaron y clonaron por vez primera al receptor transmembranal responsable de dichos efectos. Actualmente conocido como TRPV1, es un canal iónico que opera como receptor polimodal para un amplio espectro de estímulos físicos y químicos tales como calor, protones y ciertas toxinas. Destaca la CAP por la cual TRPV1 exhibe una afinidad submicromolar y gran selectividad no presente en los canales homólogos TRPV2-TRPV6 (Yang y col., 2015). La inducción o fosforilación de TRPV1, ya sea directa por cualquiera de sus agonistas, o indirecta por medio de alguna de las cinasas asociadas, resulta en la transducción de respuestas de inflamación y dolor, empero la exposición prolongada a la CAP insensibiliza a TRPV1 a través del tiempo para aliviar el dolor a largo plazo (Cortright y Szallasi, 2004; Reddy y col., 2014). Pese a que todos los capsaicinoides son eficaces agonistas de TRPV1, exhiben diferentes grados de pungencia, en este sentido CAP y DHC son los de mayor potencia y asimismo los de mayor abundancia (Ravishankar y col., 2003).

Los capsaicinoides son compuestos inodoros e incoloros, sintetizados en la epidermis de la placenta del chile por estructuras celulares llamadas glándulas o ampollas, para luego almacenarse en vesículas (de 0.15 a 1.0 μm de diámetro), típicamente visibles en la superficie de este tejido entre 15 y 31 días post anthesis de acuerdo a la especie (Keyhaninejad y col., 2014; Sánchez-Segura y col., 2015). Ha sido señalado que los capsaicinoides desempeñan diversas funciones en la planta, tales como incremento en su resistencia al estrés abiótico dada su actividad antifúngica y antibacteriana, disuasión de depredadores mamíferos y, en contraste, fomentando la dispersión de sus semillas por las aves, cuyo TRPV1 no es responsivo a capsaicina debido a diferencias puntuales en su dominio de unión a compuestos vainilloides (Khan y col., 2014; Kim y col., 2014).

Químicamente los capsaicinoides son producto de la convergencia de dos vías biosintéticas. Se conforman por diferentes estructuras de ácidos grasos ramificados de cadena media y larga (grupos acilo) provenientes del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada, ligados a través de una condensación enzimática al anillo de benceno de la vainillilamina, originada en la vía fenilpropanoide (Thiele y col., 2008, Mazourek y col., 2009). De manera general, la clave reguladora de la síntesis de capsaicinoides es la enzima capsaicinoide sintasa (Figura 1), en virtud de ser la aciltransferasa responsable de la condensación de la vainillilamina con alguno de los ácidos grasos disponibles (Wahyuni y col., 2013). No obstante, muchas enzimas que intervienen en la biosíntesis de los capsaicinoides no están bien caracterizadas y la regulación de la vía de señalización no se comprende completamente, por lo que actualmente es objeto de intensa investigación (Keyhaninejad y col., 2014; Reddy y col., 2014; Arce-Rodríguez y Ochoa-Alejo, 2015).

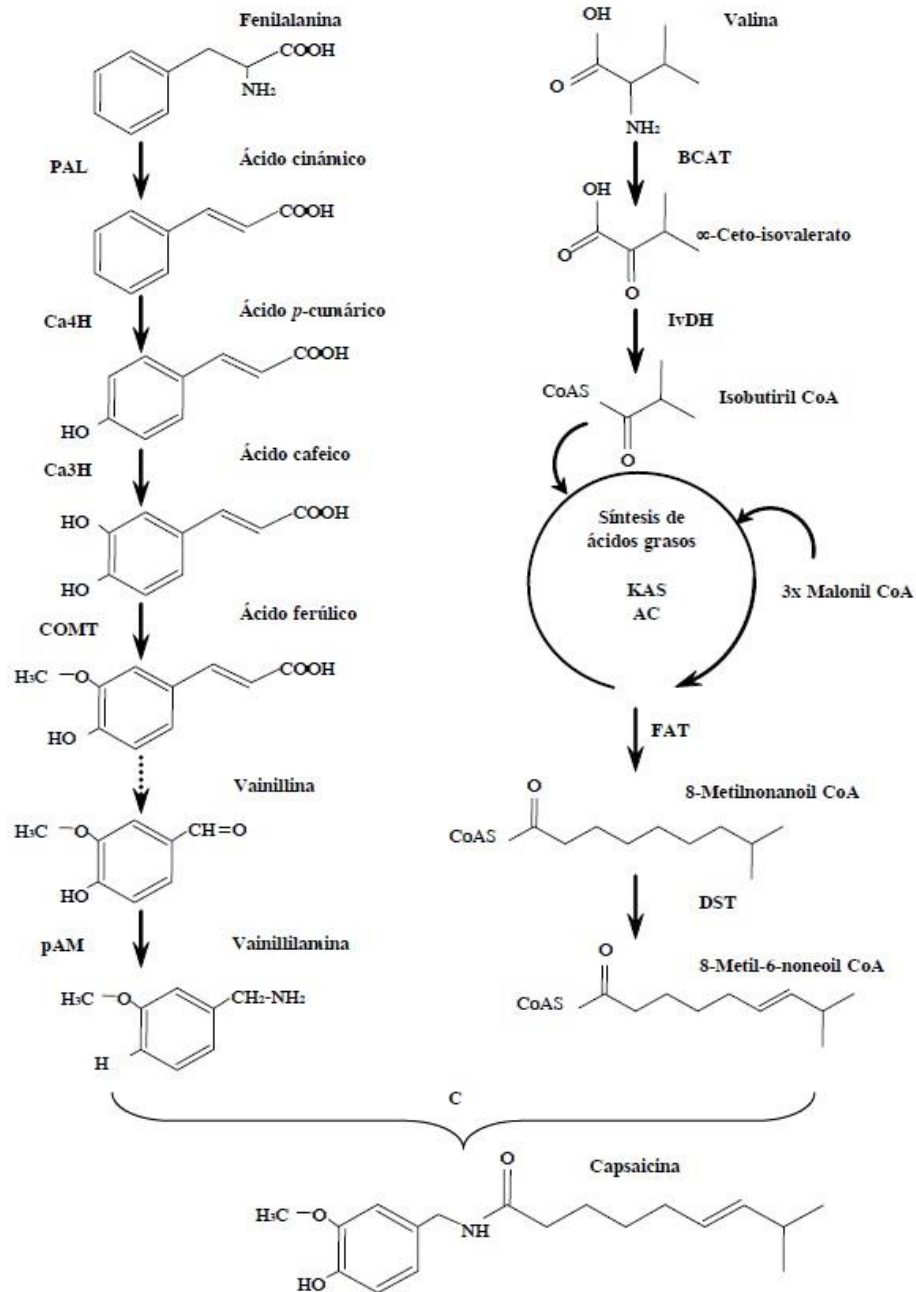


Figura 1. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinodes en el género *Capsicum* (Vázquez-Flota y col., 2007). PAL, fenilalanina amonio liasa; Ca4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; Ca3H cumarato 3 hidroxilasa; COMT, ácido cafeico O-metiltransferasa; pAMT, presunta aminotransferasa de la vainillina; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados, IvDH α-isovalerato deshidrogenasa; Kas β-cetoacil sintasa; ACL, proteína acarreadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST, desaturasa; CS capsaicinoide sintasa. La flecha punteada representa a reacciones por caracterizar.

2.2 INHIBICIÓN SELECTIVA DE CÉLULAS TRANSFORMADAS MEDIADA POR CAPSAICINA.

A lo largo de más de 20 años ha sido reportado que la CAP provoca efectos antiproliferativos y apoptóticos en una amplia variedad de modelos *in vitro*, preferentemente de cáncer. Si bien esta selectividad en los efectos inhibitorios de la CAP permanece sin ser comprendida en su totalidad, la expresión de ciertas moléculas en células transformadas ha demostrado ser determinante de su susceptibilidad al capsaicinoide. En este sentido, la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) oxidasa asociada a tumor (tNOX/ENOX2) parece jugar un papel superlativo. Miembro de la familia de las *growth-related plasma membrane hydroquinone oxidases*, tNOX es considerada un antígeno oncofetal resultante de la puesta en marcha de un programa aberrante de diferenciación, y no así de una mutación oncogénica (Cho y Morré, 2009; Morré y Morré, 2012). Su expresión ha sido documentada en células transformadas de numerosas líneas y consistentemente ha sido detectada en los sueros de pacientes con cáncer (Morré y col., 2008; Cheng y col., 2016). En este sentido, han sido identificadas más de 20 isoformas (con pesos moleculares entre 34 y 94 kDa) producidas a partir de splicing alternativo de ARN mensajero (mRNA), con cierta especificidad en una variedad de cánceres (Morré y col., 2008).

La proteína tNOX se encuentra permanentemente activada y a diferencia de la NADH oxidasa constitutiva (CNOX/ENOX1), no requiere de hormonas y/o factores de crecimiento para este propósito (Morré, 1998). Dicha característica supone un remodelamiento del metabolismo de NADH que afecta directamente la proporción basal NAD⁺/NADH (producto y sustrato de tNOX, respectivamente) conduciendo a su elevación en células transformadas. Asimismo, mediante enfoques de pérdida y ganancia de función, ha sido demostrado que tNOX desempeña un papel esencial en la adquisición de fenotipos agresivos en varias formas de cáncer al exacerbar la proliferación, sobrevivencia y progresión tumoral (Liu y col., 2008; Liu y col., 2012; Zeng y col., 2012).

Un creciente cuerpo de evidencia señala que CAP es capaz de inhibir la expresión de tNOX en células transformadas (Morré y col., 1995; Morré y col., 2000; Chueh y col., 2002; Chueh y col., 2003, Wang y col., 2008; Wang y col., 2011, Wang y col., 2015; Lin y col., 2016) mediante la depleción de su regulador transcripcional POU domain, class 3, transcription factor 2 (POU3F2) (Chen y col., 2016), lo que conduce a una regulación a la baja en la relación NAD⁺/NADH intracelular, como consecuencia directa del cese la actividad enzimática de tNOX.

Con la premisa de que la especie oxidada NAD⁺ actúa como cofactor de sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD (SIRT1), Lee y col. (2015) investigaron los efectos de la modulación de la relación NAD⁺/NADH mediada por CAP sobre la actividad deacetilasa de SIRT1, en células de cáncer de pulmón (línea A549) y fibroblastos pulmonares humanos de la línea MRC-5 (que no expresan tNOX). Sus resultados indican que tras la incubación con una concentración de CAP 200 μM, incrementó la relación NAD⁺/NADH y la actividad deacetilasa en las células no transformadas, ocasionando una caída en la acetilación de p53 y la consecuente activación de autofagia, sin afectaciones sobre la viabilidad celular. Por el contrario, las células A549 experimentaron una regulación a la baja en la expresión de tNOX, en detrimento de la relación NAD⁺/NADH intracelular. Lo anterior, condujo a una caída en la expresión de SIRT1 e incrementos tanto en la acetilación como en la fosforilación de p53, seguidos de un significativo aumento en la actividad apoptótica entre las células tumorales.

Soportando estas nociones sobre el eje tNOX/SIRT1/p53, el mismo grupo de trabajo recientemente ha reportado resultados similares en dos líneas celulares de cáncer de vejiga (TSGH8301 y T24). Adicionalmente, fue observada una pronunciada inhibición de la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4), derivada de la depleción de la ciclina D1. Lo anterior, condujo al cese de la influencia inhibitoria por hiperfosforilación sobre el supresor tumoral retinoblastoma (pRb) y el arresto al ciclo celular en la fase G1 (Lin y col., 2016). La depleción de tNOX abrogó asimismo, la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) y paxilina (pax), dos blancos río

abajo de la vía de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), cuya activación es esencial para el ensamble de las adhesiones focales emergentes en el frente de ataque de la célula migratoria (Hu y col., 2014). Colectivamente, estos resultados sugieren que CAP actúa a través de SIRT1, para inducir alternativamente vías de señalización con dos resultados distintos: autofagia en células no transformadas, y reversión del fenotipo invasivo así como muerte apoptótica en células transformadas, lo que explicaría la citotoxicidad diferencial de CAP y probablemente, la divergencia de resultados con otros modelos de cáncer.

Dentro de este marco, no todos los cánceres *in vitro* experimentan modulación de tNOX mediada por CAP, de manera particular las células de carcinoma gástrico humano de la línea TMC-1 mantienen estable su expresión de tNOX y asimismo exhiben una mayor tolerancia a concentraciones de CAP que resultan típicamente eficaces para lograr la abrogación de tNOX y apoptosis en otros modelos (Wang y col., 2011; Cheng y col., 2016), lo que podría indicar la existencia de eventos moleculares decisivos rio arriba. En este sentido, se ha observado que la actividad inhibitoria de la CAP sobre células de las líneas AGS (cáncer gástrico), DMS53 y DMS114 (cáncer de pulmón de células pequeñas) es dependiente de la disponibilidad del canal iónico TRPV6, cuya depleción por metodología siRNA condujo a la ablación del apoptosis mediada por CAP en estos modelos (Chow y col., 2007; Lau y col., 2014).

El canal epitelial TRPV6 es uno de los 28 receptores de potencial transitorio (TRP) expresados por mamíferos, pertenece a la misma subfamilia que el canal TRPV1 pero a diferencia de éste, exhibe una alta selectividad por Ca^{2+} (Vriens y col., 2009). En su carácter constitutivamente activo, TRPV6 es regulado por nivel de expresión y distribución celular, principalmente en próstata e intestino delgado (Hoenderop y col., 2000; Roderick y Cook, 2008) donde contribuye activamente al transporte transepitelial de Ca^{2+} (van Abel y col., 2005, Woudenberg-Vrenken y col., 2012). De manera interesante, múltiples análisis en especímenes oncológicos y células transformadas de diversas líneas han mostrado una expresión de TRPV6

sustancialmente mayor en cánceres de próstata, mama, tiroides, colon y ovario, con relación a la presentada en sus contrapartes no cancerosas (Peng y col., 2001; Wissenbach y col., 2001; Zhuang y col., 2002; Fixemer y col., 2003) lo que podría sugerir, tanto la participación de TRPV6 en el proceso patológico (Lehen'Kyí y col., 2007; Raphaël y col., 2014) como favorecer la hipótesis de su involucramiento en la selectividad de los efectos inhibitorios de CAP. Lo anterior incluso a pesar de que al presente no han sido identificados agonistas directos de TRPV6, pues ante la extraordinaria sensibilidad con que TRPV1 reacciona ante sus ligandos podría ser razonable hipotetizar que otros TRP's pudieran ser responsivos a agonistas directos o indirectos (Vriens y col., 2009). Sin embargo, los mecanismos de interacción entre CAP y TRPV6 en la inhibición de células transformadas no están del todo explicados.

2.3 EVENTOS MOLECULARES EN LA APOPTÓISIS INDUCIDA POR CAPSACINA.

Si bien los mecanismos moleculares que subyacen a la actividad inhibitoria de la CAP sobre células de cáncer no han sido completamente elucidados, sus efectos apoptóticos están ampliamente asociados a la estabilización de p53, producida tras su modificación postraducciona. Cuando células transformadas son expuestas a la CAP, la cinasa c-Jun amino terminal (JNK) fosforila la Thr81 de p53, con lo que su ubiquitinación por la proteína *murine doble minute 2* (MDM2) es eficazmente restringida, en detrimento de su subsecuente degradación por el sistema proteasoma. Siendo así que la vida media de p53 es sustancialmente mejorada, sobreviene su acumulación en núcleo y posterior activación transcripcional en favor del gen diana BAX, que codifica para una proteína proapoptótica, que en concomitante regulación a la baja de su dominante negativo, la proteína Bcl-2, conducen al incremento de la permeabilidad mitocondrial, la liberación citosólica del citocromo c y la activación de la apoptosis (Lo y col., 2005; Chow y col., 2007; Jin y col., 2013; Sarkar y col., 2015). En adición, ha sido reportado que la exposición a la CAP regula a la baja la expresión de MDM2 en células de la línea HCT116 (cáncer

de colon), incidiendo en los mismos eventos río abajo (Kim y col., 2009), lo que podría suponer una amplificación de la señal apoptótica transducida.

La apoptosis mediada por CAP también está fuertemente asociada al incremento del calcio intracelular, generación de estrés oxidativo por inhibición de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones y al rompimiento de la poliadenosina ribosa (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), en asociación con la regulación a la baja de tNOX (Chueh y col., 2003; Wang y col., 2008; Pramanik y col., 2011; Wang y col., 2011; Lee y col., 2015; Lin y col., 2016).

Por otro lado, algunos datos han probado el involucramiento de eventos de la vía extrínseca de la apoptosis en los efectos de la CAP en otros modelos de cáncer. Amantini y col. (2009) divulgaron que a una concentración 100 μ M, el capsaicinoide activó a la cinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM) la cual, desempeña un papel fundamental en la respuesta a daños en el ADN por una variedad de causales, entre los que se cuenta el estrés oxidativo (Kanu y col., 2015). Tras lo anterior, fue sustentada una pronta fosforilación de p53 en su residuo Ser15 y poco más tarde en Ser20 y 392, seguidas de una regulación al alza en la transcripción y traducción del receptor de muerte Fas/CD95 en células de papiloma urotelial (línea RT4). Fas/CD95 se redistribuyó por la membrana plasmática de las células para agruparse con receptores TRPV1, tras lo cual fue detectada la activación de las caspasas iniciadoras 8 y 9, así como BID truncada (p15). Interesantemente, el complejo Fas/CD95-TRPV1 provocó la transducción de la señal apoptótica desde la superficie celular en ausencia del ligando Fas/CD95 (FasL), el cual no fue detectado en los cultivos tratados. Al respecto, ha sido reportado que en el contexto de la nocicepción el extremo N-terminal del receptor TRPV1 puede unirse a la proteína adaptadora del receptor Fas/CD95, factor 1 asociado a FAS (FAF1) (Kim y col., 2006), lo que podría indicar la integración de sus vías de transducción en determinados escenarios.

Efectos similares fueron reportados con concentraciones subtóxicas de CAP (a partir de 50 μ M), las cuales condujeron a un incremento en la expresión del receptor

de muerte 5 (DR5) lo que provocó que células de 5 líneas de glioblastoma humano (SNU-444, U-87 MG, U343, T98G, U251N y U-251MG) fueran significativamente más susceptibles al ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL). El tratamiento con CAP y TRAIL inhibió la capacidad de la cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdc2) para fosforilar la Thr34 del inhibidor de apoptosis survivina, comprometiendo su estabilización y conduciéndola a la degradación proteasomal. En este sentido, astrocitos humanos no transformados provenientes de un cultivo primario no experimentaron ninguno de los efectos mencionados cuando fueron expuestos al mismo tratamiento (Kim y col., 2010).

Otros informes reproducen los eventos hasta ahora descritos en un solo modelo experimental, lo que sugiere su actuación conjunta en favor de la ejecución apoptótica. Kim y col. (2009) demostraron que tras la exposición a una concentración 100 μ M de CAP, células HCT116 (cáncer de colon) experimentaron estabilización y activación transcripcional de p53, con concomitante activación de los receptores Fas/CD95 y DR4. Adicionalmente, el tratamiento combinado de CAP (100 μ M) y resveratrol (50 μ M), mejoró sustancialmente estos efectos. En la Figura 2 se describen los principales eventos moleculares subyacentes a la apoptosis mediada por CAP en células de cáncer.

Finalmente, y a la luz de estos resultados, ha sido propuesto que una estrategia terapéutica que combine vainilloides (como la CAP) y drogas quimioterapéuticas podría ser viable (Santoni y col., 2013). En este sentido, han sido recientemente divulgadas mejoras en las capacidades quimioterapéuticas *in vitro* del cisplatino y el 5-fluorouracilo, con la administración conjunta de CAP en tratamientos experimentales en las líneas celulares SNU-668 y HGC-27 (cáncer gástrico humano), lo que podría fortalecer un hipotético uso del capsaicinoide como agente quimiosensibilizante en células tumorales quimiorresistentes (Huh y col., 2011; Meral y col., 2014).

Por otro lado, la evaluación del potencial anticáncer de CAP también incluye una gama de ensayos *in vivo* con resultados coherentes con las nociones mecanicistas

derivadas de los estudios *in vitro* (Kim y col., 1999; Beltran y col., 2007; Lu y col., 2010; Bai y col., 2011; Ghosh y Basu, 2012). Recientemente fue reportado que el capsaicinoide sustentó una significativa disminución en la tasa de crecimiento de xenoinjertos tumorales de células de cáncer de pulmón microcítico humano (línea DMS 53), implantados a ratones atímicos desnudos alimentados con una dieta estándar + 10 mg de CAP/kg de peso corporal. Mediante evaluación de la actividad de caspasa-3 e inmunoensayos para muerte celular y ruptura de PARP, fue demostrada una actividad apoptótica casi 3 veces mayor en los lisados tumorales de los animales tratados con respecto al control (Lau y col., 2014). Resultados similares fueron reportados en ratones implantados con xenoinjertos tumorales de células de cáncer pancreático humano, derivadas de tumor primario y sitio metastásico (líneas AsPC-1 y BxPC-3, respectivamente), tratados con 2.5 o 5 mg de CAP/Kg de peso corporal por vía intragástrica y una dieta especial libre de antioxidantes (Zhang y col., 2008; Pramanik y col., 2014; Wang y col., 2015).

Algunos estudios con modelos de carcinogénesis químicamente inducida en roedores han sido desarrollados con resultados semejantes. En su serie de trabajos en ratón albino suizo, Anandakumar y col. (2008, 2009a, 2009b, 2012, 2013) divulgaron que la administración intraperitoneal de CAP disuelta en aceite de oliva (10 mg/kg) resultó eficaz para restringir la carcinogénesis de pulmón inducida por benzopireno, mediante la inducción de apoptosis en la masa tumoral. Asimismo, el tratamiento con CAP revirtió las alteraciones sobre el metabolismo de la glucosa y mitigó las anomalías lisosomales en el tejido pulmonar, eventos concurrentes en éste modelo.

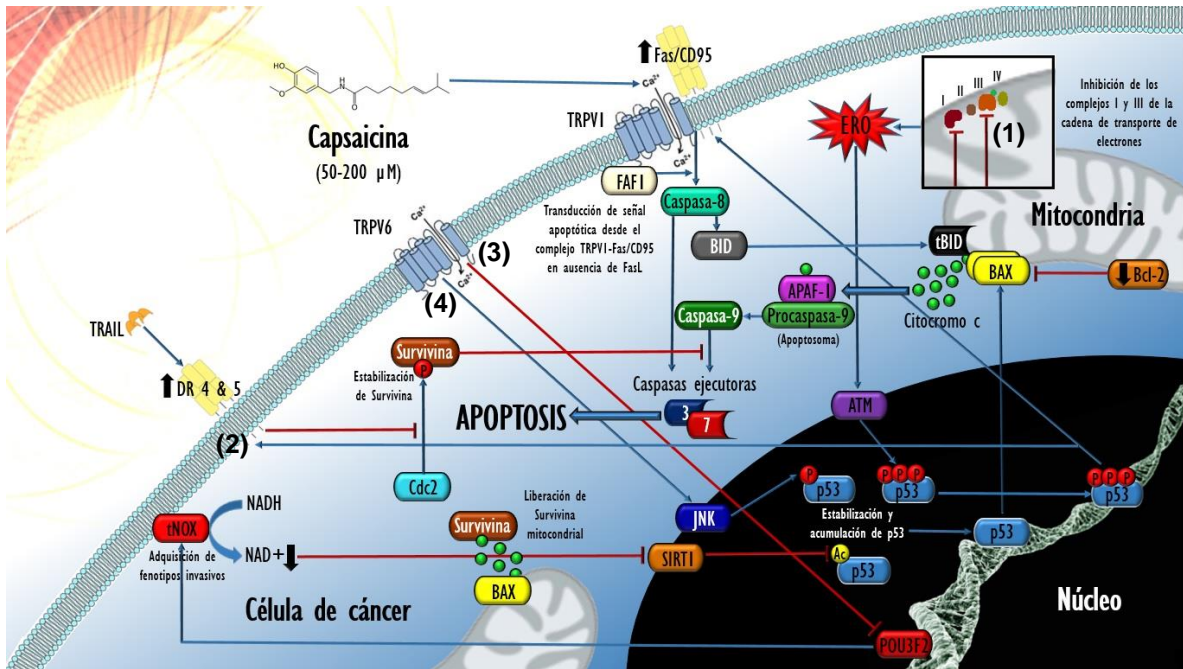


Figura 2. Principales eventos moleculares subyacentes a la apoptosis mediada por CAP en células de cáncer. Concurren mecanismos intrínsecos y extrínsecos mediados por p53. **(1)** Tras la inhibición de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones y el incremento de las ERO producidas, sobreviene la activación de ATM que fosforila en 3 residuos a p53, conduciendo a su activación transcripcional en favor de Fas/CD95, cuyo agrupamiento con TRPV1 resulta en la transducción de una señal apoptótica independiente de FasL sobre caspasa-8 y tBID, seguida de la liberación citosólica de los factores proapoptóticos mitocondriales citocromo c y APAF-1 que, luego de reclutar a procaspasa-9 heterotrimerizan (apoptosoma) para activar a caspasa-9, sustentando la subsecuente activación de las efectoras 3 y 7. **(2)** La actividad transcripcional de p53 conlleva incrementos en la expresión de DR4 y DR5 que, en presencia de TRAIL inhiben la estabilización de survivina, con lo que la señal apoptótica es amplificada. En manera dependiente de TRPV6, **(3)** CAP provoca la depleción de POU3F2 y de su producto transcripcional tNOX, conduciendo a una caída en la producción de NAD⁺ que incide negativamente en la actividad deacetilasa de SIRT1 sobre p53, incrementando su acetilación; en forma paralela **(4)** JNK es habilitada para fosforilar a p53, ambas modificaciones postraduccionales conducen a la expresión de BAX, cuyos efectos proapoptóticos sobre la membrana mitocondrial inciden en los eventos antes descritos.

2.4 LA DUALIDAD DE LOS CAPSAICINOIDES EN CÁNCER.

Pese a la creciente comprensión mecanicista de las propiedades anticáncer de la CAP, datos emergentes indican que la exposición prolongada a pequeñas concentraciones incrementa la expresión de tNOX, así como la fosforilación

concentración-dependiente de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2) en células tumorales, con consecuentes efectos promotores. Liu y col. (2012) monitorearon la impedancia eléctrica provocada por células de la línea HCT116 (cáncer colorrectal humano) cultivadas durante 80 h en presencia de concentraciones de CAP entre 0.1 y 10 μ M. Sus hallazgos incluyeron un incremento concentración-dependiente en la proliferación, así como en la capacidad migratoria de las células tumorales en cámara de Boyden, con relación a células cultivadas en presencia de vehículo. Efectos similares han sido recientemente reportados por el mismo grupo de trabajo en células de la línea TSGH (cáncer de vejiga) expuestas durante 23 h a 10 μ M de CAP (Lin y col., 2016).

Estudios adicionales revelaron que luego de una exposición de 24 h, las células HCT116 tratadas adquirieron un fenotipo mesenquimal en detrimento de sus características epiteliales, conformando la denominada transición epitelial-mesenquimal (EMT), un programa embriónico latente cuya activación aberrante en células de cáncer es asociada a una mayor competencia metastásica (Lamouille y col., 2014). En este sentido, fue registrada una pronunciada reducción en la expresión de las proteínas constitutivas en complejos de unión intercelular cadherina-E y Zonula Occludens-1 (ZO-1) lo cual, dada su divulgada capacidad para secuestrar respectivamente a β -catenina y a la proteína de unión a ácido nucleico asociada a ZO-1 (ZONAB) e interrumpir su importe al núcleo en detrimento de su actividad transcripcional (Orsulic y col., 1999; Spadaro y col., 2014), podría suponer una mayor libertad para que estos factores de transcripción pudieran obrar en favor de la proliferación celular, tal y como fue observado.

En adición, las células HCT116 incrementaron en manera concentración-dependiente la expresión de los marcadores mesenquimales cadherina-N y vimentina. A este respecto, una mayor disponibilidad de cadherina-N podría suponer más que un parámetro para el estudio de la EMT, al contribuir activamente en la progresión tumoral y la invasividad. Recientemente ha sido reportado que tras inducir la expresión del dominio citoplasmático soluble de la cadherina-N, células de

riñón canino (línea MDCK) experimentaron incremento en su proliferación y crecimiento en múltiples capas debido a la pérdida de la inhibición por contacto. Algunas células se desprendieron de la monocapa y evadieron la anoikis en correlación con la fosforilación de la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos/ERK (MAPK/ERK fosforilada), sustentando su sobrevivencia y proliferación en ausencia de anclaje a la matriz extracelular (ECM) (Ozawa, 2015), lo que supone tanto un rasgo típico de la transformación maligna, como una característica que habilita a las células transformadas para mantenerse viables durante su diseminación circulatoria (Hanahan y Weinberg, 2011).

Por su parte la contribución de la vía MAPK/ERK fosforilada en la evasión de la anoikis, es generalmente aceptada como una consecuencia de la señalización oncogénica de los receptores con actividad tirosina cinasa ErbB2 y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Reginato y col., 2003; Schafer y col., 2009; Weigel y col., 2014). Nuevos datos permiten además, una mejor comprensión de los eventos río abajo en la señalización de MAPK/ERK fosforilada. Valiéndose de las propiedades inherentes que permiten a las células de cáncer inflamatorio de seno (IBC) proliferar en suspensión en la linfa y no únicamente adheridas en tumores establecidos Buchheit y col. (2015) demostraron que la fosforilación (Ser59) de la proteína proapoptótica BIM-extra larga (Bim-EL), por MAPK/ERK fosforilada, es un evento clave para la sobrevivencia en ausencia de anclaje de células de IBC (líneas SUM149 y KPL-4) debido a un bloqueo concomitante en la activación de caspasas. A este respecto, ensayos de coimmunoprecipitación de proteínas endógenas revelaron que la fosforilación de Bim-EL condujo a su heterotrimerización con las proteínas LC8 y Beclin-1, con lo que la localización subcelular de Bim-EL fue acotada lejos de la mitocondria, en detrimento de su actividad antagónica sobre las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, el incremento en la permeabilidad mitocondrial y la subsecuente ejecución de la anoikis. En este sentido, la inhibición farmacológica de la MAPK/ERK fosforilada abrogó eficazmente la coprecipitación de Bim-EL y LC8 con Beclin-1, mejorando la colocalización inmunofluorescente de Bim-EL y la mitocondria, en favor de una resolución por

anoikis. Sin embargo, en otros tipos celulares, la fosforilación de la Ser69 de Bim-EL conduce a su ubiquitinación y subsecuente degradación proteasomal (Luciano y col., 2003), por lo que dentro de la variedad de mecanismos subyacentes a la sobrevivencia celular en independencia de anclaje se incluyen un número de eventos con convergencia en la fosforilación de Bim-EL.

Por otro lado, las postuladas propiedades promotoras de la CAP pueden ser también racionalmente asociadas a su agonismo sobre el canal iónico TRPV1 y la subsecuente internalización de Ca^{2+} eficazmente provocada a concentraciones de CAP tan bajas como $\leq 20 \mu\text{M}$ (Nagy y col., 2014). Este catión, operando como un segundo mensajero constituye un regulador positivo de la migración celular; particularmente efectivo en células transformadas debido al parecer, a su expresión aberrante de proteínas de manejo de Ca^{2+} y de efectores dependientes de Ca^{2+} , tales como cinasas, proteasas y fosfatasa; las cuales, habilitan a la célula para el rápido recambio de las adhesiones focales, así como para una proteólisis más eficaz de los componentes de la matriz extracelular (Prevarskaya y col., 2011).

En este sentido, ha sido demostrado que la disponibilidad de Ca^{2+} desempeña un papel esencial en el desarrollo de un fenotipo invasivo en células en cáncer de mama de metástasis pleural (línea MDA-MB-468). Éstas, tras haber sido sometidas a quelación intracelular de Ca^{2+} , experimentaron una pronunciada inhibición en la fosforilación de STAT3, restringiendo la EMT inducida por factor de crecimiento epidérmico (EGF), al reprimir significativamente la expresión transcripcional de marcadores mesenquimales como cadherina-N, Twist, la relación CD44/CD24 y en un nivel traduccional, a la proteína vimentina. Aunque poco comprendidos, los mecanismos subyacentes a tales respuestas fueron parcialmente dependientes de la disponibilidad del canal catiónico receptor de potencial transitorio de tipo melastatina número 7 (TRPM7) por lo que, el involucramiento de otros transportadores de Ca^{2+} es altamente probable (Davis y col., 2014). En la Figura 3, se propone un modelo mecanicista a los efectos promotores observados en células transformadas expuestas a bajas concentraciones de CAP.

A pesar de lo anterior, resulta interesante el hecho de que efectos similares sobre la expresión de tNOX, la proliferación e invasividad hayan sido observados en células de cáncer de pulmón (línea A549) cuando fueron expuestas a bajas concentraciones de los agentes quimioterapéuticos doxorubicina y tamoxifeno (Su y col., 2012). En virtud de que estos 3 compuestos actúan por mecanismos considerablemente distintos, parece razonable especular que los hallazgos de Liu y col. (2012) y Su y col. (2012) constituyan en su conjunto, una "contramedida" común de las células transformadas cuando son expuestas a concentraciones no letales de compuestos citotóxicos. En este sentido y contrastando con los efectos promotores observados con la exposición prolongada a concentraciones $\leq 10 \mu\text{M}$ de CAP, se ha reportado que 100 y 250 μM resultan eficaces para regular a la baja tNOX, producir efectos inhibitorios y apoptosis en las células HCT116 (Mao y col., 2008; Kim y col., 2009)

No obstante lo anterior, la tolerancia al capsaicinoide entre los diversos cánceres *in vitro* está sujeta a una notable variabilidad. Otros modelos de cáncer como las células de las líneas MCF7 y T24 (derivadas de adenocarcinoma mamario y cáncer de vejiga de células transicionales, respectivamente) experimentan efectos inhibitorios mediados por CAP desde concentraciones tan bajas como 10 μM (Shim y Song 2015; Lin y col., 2016), en tanto que concentraciones experimentales entre 50 y 250 μM conllevan típicamente efectos apoptóticos en la generalidad de células de cáncer (Chow y col., 2007; Lee y col., 2012). Estos datos demuestran que el resultado de la exposición de células de cáncer a la CAP, se define en términos de la concentración del capsaicinoide en asociación con el perfil de expresión génica de un tipo de cáncer dado. Por lo anterior, tanto la delimitación de una dosis de CAP con eficacia antitumoral, como la identificación de cánceres potencialmente responsivos a CAP constituyen aspectos fundamentales para su evaluación experimental en humanos.

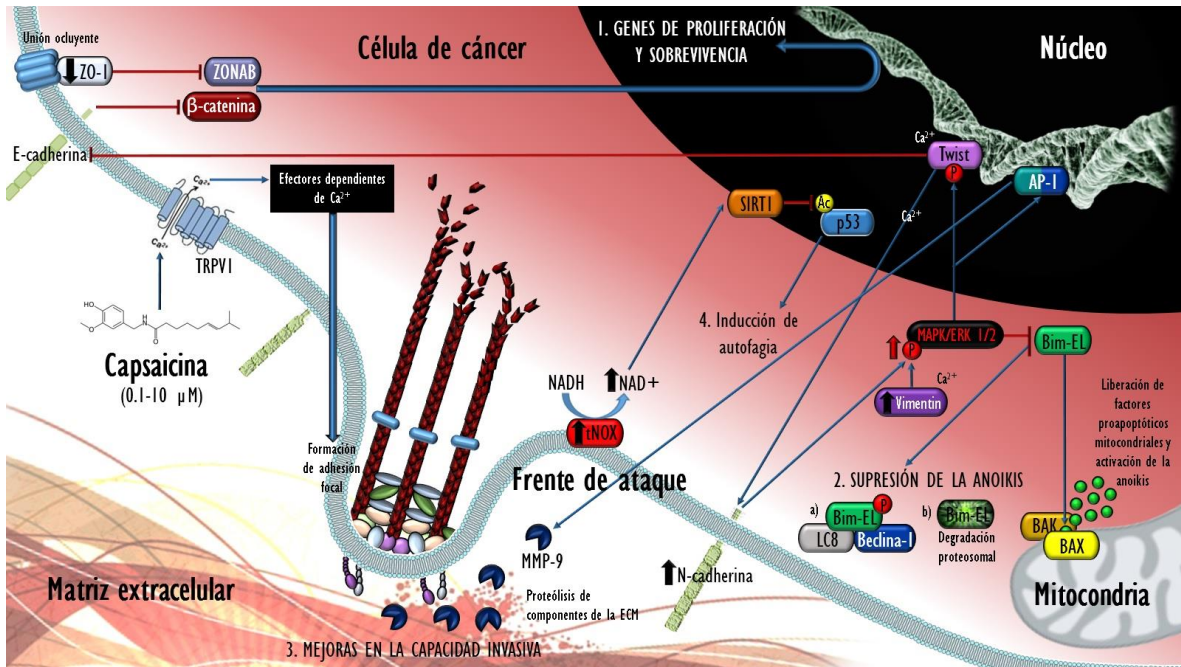


Figura 3. Modelo mecanicista de los efectos promotores observados en células transformadas expuestas a concentraciones 0.1 a 10 μM de CAP. Mejoras en la proliferación e invasividad son producidas a través de la transición epitelial-mesenquimal. Luego de una caída en la expresión de ZO-1 y cadherina-E, sobreviene el importe de ZONAB y β -catenina al núcleo, habilitando su actividad transcripcional sobre genes de proliferación y supervivencia (1). El incremento en la señalización MAPK/ERK 1/2 fosforila y modula la actividad de 3 objetivos rio-abajo: Bim-EL, que ve suprimida su actividad proanoikis (2) por a) secuestro en heterotrímero o b) degradación proteosomal; en Twist, cuya regulación transcripcional explicaría tanto la abrogación de cadherina-E como la sobreexpresión de cadherina-N; la cual, a través de su dominio intracitoplasmático y en conjunto con vimentina, retroalimentan positivamente la fosforilación de MAPK/ERK 1/2; cuya señalización, estimula en paralelo la expresión de MMP-9 a través de la activación transcripcional del heterodímero AP-1, produciendo efectos proteolíticos sobre la matriz extracelular. Concomitante internalización de Ca^{2+} habilitada por CAP a través de TRPV1, capacita a la célula para un rápido recambio de adhesiones focales, en favor de una mayor capacidad invasiva (3). Finalmente, tras el incremento en la expresión de tNOX y de su producto NAD^+ , SIRT1 deacetila a p53 y conduce a la autofagia (4), garantizando la disponibilidad nutricional durante la eventual diseminación circulatoria de la célula tumoral. La dependencia de Ca^{2+} en algunos de estos eventos es señalada.

En cualquier modo, la postulada capacidad promotora de los capsaicinoides también ha sido objeto de abordaje epidemiológico. Otros autores han encontrado una asociación entre el consumo de chile y el desarrollo de cáncer gástrico, tales como Archer y Jones (2002) y posteriormente López-Carrillo y col. (2012), quienes

contemplaron además, otros factores de riesgo en su análisis. Estos autores encontraron base experimental con modelos animales en trabajos como el de Agrawal y col. (1986), quienes atribuyeron a un extracto etanólico de chile (con una concentración estimada de CAP de 2.5 mg/mL), efecto promotor en la carcinogénesis inducida por N-nitroso-acetoximetil-metilamina (DMN-OAc) en estómago e hígado de ratón albino. Resultados similares fueron reportados en carcinogénesis inducida por N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) en estómago de ratas Fisher con 1 y 3% de pimiento rojo en su pellet alimenticio (Kim y col., 1985) más en estos trabajos no fue encontrada evidencia de tumorigénesis en los grupos tratados únicamente con chile. Tales tratamientos, por su parte consistieron en una mezcla de capsaicinoides y otros constituyentes del fruto *Capsicum* dada la naturaleza de los extractos empleados (Bley y col., 2012), por lo que sus hallazgos podrían estar sujetos a una variabilidad sustancial. En este sentido, otros autores han postulado tanto inocuidad, como efectos quimiopreventivos a las mezclas naturales de capsaicinoides. Mediante un esquema de administración crónica a ratones B6C3F1, Akagi y col. (1998) no sólo no encontraron incremento en la incidencia de tumores sino que, por el contrario, observaron una correlación negativa entre la incidencia de neoplasias de cojinete y las dosis de capsaicinoides administradas.

2.5 AUTOFAGIA CELULAR INDUCIDA POR CAPSAICINOIDES.

A pesar de que la familia de los capsaicinoides se conforma por 22 compuestos análogos y 5 de ellos son ampliamente referidos en la literatura, la información disponible sobre sus efectos biológicos se limita casi exclusivamente a la solución del modelo de la CAP (Perucka y Materska, 2001). Si bien la similitud estructural entre capsaicinoides, permite predecir su bioactividad agonista sobre el TRPV1 (Yang y col., 2015), otras facetas de sus efectos podrían estar sujetas a interacciones más complejas y por tanto, incidir de diferente manera sobre sistemas biológicos. En la literatura, se cuenta una serie de tres trabajos han sido desarrollados con objeto de evaluar los efectos del segundo capsaicinoide más

abundante, la DHC (Oh y col., 2008; Choi y col., 2010). Si bien dichos datos se limitan a los reportes de un grupo de investigación, sus resultados en una gama de modelos *in vitro* que incluye tanto a líneas celulares transformadas como no transformadas, han denotado notables diferencias con respecto a los efectos citotóxicos *in vitro* típicamente asociados a la CAP.

Tras una exposición de 24 h a una concentración 200 μ M de DHC, células de adenocarcinoma mamario y cáncer de colon (de las líneas MCF7 y HCT116, respectivamente) experimentaron muerte por autofagia, en cantidades superiores a las provocadas por la CAP; que por su parte resultó ineficaz para inducir apoptosis en estos experimentos (Oh y col., 2008). Interesantemente, la autofagia inducida por DHC fue mediada por la activación de la enzima antioxidante catalasa, cuya expresión incrementó a partir del minuto 30 de exposición, suprimiendo los niveles de ERO, en correlación con la lipidación de la proteína LC3 II, lo cual resulta esencial para la formación del autofagosoma y la adecuada ejecución de la autofagia. Posteriormente y tras la inhibición farmacológica de catalasa por el compuesto 3-amino-1,2,4-triazol, se demostró el cese de la lipidación de LC3 II y la abrogación de la autofagia, en favor de una resolución por apoptosis. Colectivamente, estos datos demuestran que la muerte autofágica mediada por DHC en estos modelos, es dependiente de catalasa y a diferencia de la apoptosis mediada por CAP, de una respuesta antioxidante en el sistema celular.

Sin embargo, con la puesta en marcha de la autofagia los escenarios posibles son diversos, dado que en principio se trata de una respuesta adaptativa de la célula ante el agotamiento de los recursos nutricios. La autofagia puede resultar en un efecto protector al mantener vivas a las células durante la privación de alimento u otras fuentes de estrés, mediante la degradación de constituyentes citoplasmáticos dañados o tóxicos y el reciclaje de las macromoléculas liberadas o, por el contrario, si la fuente de estrés continúa o induce de forma excesiva la autofagia, conducir a la muerte celular (Liu y col., 2013). En este sentido, la autofagia mediada por DHC condujo a un desenlace distinto en otros linajes celulares, pues el efecto autofágico

provocado confirió mayor resistencia contra la muerte a células de dos líneas de pulmón (WI38 de fibroblastos epiteliales y H1299 de cáncer de pulmón no microcítico), cuyos índices de apoptosis y necrosis fueron menores a los observados en células de las líneas celulares H460 y A549 (cáncer de pulmón), cuya capacidad para ejecutar autofagia fue menor (Choi y col., 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

Para evaluar los potenciales terapéuticos de los capsaicinoides es preciso un conocimiento integral de sus diferentes facetas. Actualmente los datos sobre los efectos de la DHC en la sobrevivencia y muerte celular se limitan a los reportes de un grupo de trabajo, por lo que su exploración en otros modelos es pertinente.

Por su parte, la divulgada interdependencia entre la autofagia inducida por DHC y la respuesta antioxidante mediada por catalasa en los modelos hasta hoy estudiados, constituye un mecanismo opuesto al ampliamente aceptado eje CAP/ERO/Apoptosis. En virtud de que ambos capsaicinoides inciden sobre una proteína transmembranal común, emerge la posibilidad de antagonismo entre las señales transducidas por estos capsaicinoides en un escenario de exposición simultánea. Por lo anterior, y dada la potencial influencia de dichos eventos en las decisiones de sobrevivencia o muerte de células animales, es pertinente evaluar los efectos producidos por la exposición simultánea a CAP y DHC, cuya mezcla es inherente a los frutos del género *Capsicum*.

5. HIPÓTESIS

La CAP y la DHC inducen efectos diferenciales sobre la sobrevivencia y muerte celular de fibroblastos murinos embrionarios.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar los efectos de CAP y DHC sobre la sobrevivencia y muerte celular de fibroblastos murinos embrionarios.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener un extracto de chile habanero (*Capsicum chinense*) y determinar su contenido de CAP y DHC.
- Determinar el efecto dosis-respuesta de CAP y DHC en fibroblastos murinos embrionarios.
- Evaluar la bioactividad de cada capsaicinoide puro y en una mezcla de proporción similar a la del material vegetal analizado, sobre parámetros de muerte y sobrevivencia celular.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIALES

7.1.1 MATERIAL VEGETAL

Frutos *Capsicum chinense* Jacq variedad Chichen Itzá (casa semillera Seminis®) fueron cultivados bajo condiciones de invernadero en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro (El Marqués, Querétaro). Las semillas se germinaron en el sustrato Peat Moss Sunshine Advanced Growing Mix®. Una vez desarrolladas 4 hojas verdaderas las plantas se transplantaron a sustrato de tenzontle con granulometría de 3 tamaños de partícula (3 mm, 2 mm y polvo) fertilizado con solución Steiner al 70%. Las plantas se regaron por goteo localizado y fueron mantenidas en un rango de 10 a 40°C. Los frutos se cosecharon ≈ 70 días posteriores a la floración. Como material de referencia se utilizó chile habanero cultivado a campo abierto y adquirido en mercados locales de Cancún, Quintana Roo.

7.1.2 CULTIVO CELULAR

Fibroblastos murinos embrionarios de la línea NIH/3T3 (No. Cat. CRL-1658™) adquiridas en la American Type Culture Collection (ATCC®) fueron almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido a -190°C hasta su cultivo y propagación en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Posterior a su descongelación, las células fueron cultivadas en medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO®. ATCC® No. Cat. 30-2002™ California, EUA) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB, GIBCO®. ATCC® No. Cat. 30-2021™) y 1% de Antibiótico-antimicótico (Anti-Anti, GIBCO®. Thermo Fisher Scientific® No. Cat. 15240-062). Sembradas en cajas para cultivo de tejidos de 60 mm de diámetro (Thermo Scientific™ No. Cat. 130181), las células fueron incubadas a 37°C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, con cambios de medio cada 48 h.

Toda vez que los cultivos alcanzaron una alta confluencia (>90%) en la caja, las células fueron transferidas incorporando 2 mL de tripsina al 0.15% (GIBCO®, Thermo Scientific™ No. Cat. 27250018) suplementada con 0.02% de ácido etildiaminotetraacético estéril (EDTA, J.T. Baker™, Fisher Scientific™ No. Cat. 02-002-786) e incubando por 5 min a 37°C. Una vez confirmada la pérdida de la adhesión celular (mediante su observación al microscopio), la enzima fue inactivada incorporando 4 mL del medio de crecimiento y enseguida, la suspensión celular fue transferida a un tubo cónico estéril de 50 mL y centrifugada (Velocity 18R, Metrix®) a 200 g por 5 min a 25° C. Retirado el sobrenadante, el pellet fue resuspendido en 8 mL de medio de crecimiento, procurando una completa homogenización de células en la suspensión, para ser finalmente propagadas a dos cajas de 60 mm.

7.1.3 REACTIVOS

Acetona (Nos. Cat. K3000.4000, K3100.4000) y acetonitrilo (Nos. Cat. 9011-03 y 9012-03) en grados reactivo analítico ACS y HPLC, fueron adquiridos de J.T. Baker™. Los estándares analíticos de capsaicina (No. Cat. 12084) y dihidrocapsaicina (No. Cat. 03813) se obtuvieron de Sigma-Aldrich®.

7.2 MEDICIONES Y ANÁLISIS

7.2.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES DE *Capsicum chinense*.

Retirados los pedúnculos, los frutos de invernadero y de campo abierto fueron seccionados con un corte vertical y luego seleccionados bajo criterios de calidad en cuanto a tamaño y estado fitosanitario. Posteriormente, un primer lote de muestras de cada grupo fue secado en horno (estufa Blue M® SLU-17TA) a 65° C por 48 h y muestras de un segundo lote fueron congeladas por inmersión en nitrógeno líquido y luego sometidas a liofilización (LABCONCO® 77520). Una vez deshidratadas, las muestras fueron empaquetadas al vacío (FoodSaver® V3880) y almacenadas a -80° C hasta los ensayos de extracción por medio de un método desarrollado en

base al perfil fisicoquímico de los analitos de interés, con objeto de identificar al extracto con mejor rendimiento.

Posteriormente, 5 g de materia deshidratada de cada grupo, fueron pulverizados en molino (IKA Works, Inc.® A1082) y colocados en matraces volumétricos de 100 mL. Enseguida se incorporaron 50 mL del solvente según el caso y a cada matraz se le colocó un capuchón de papel aluminio sellado con parafilm para impedir la evaporación del solvente. En seguida cada mezcla fue agitada a alta velocidad en Vortex (Scientific Industries, INC. G-560) y luego sometida a 60 minutos de sonicación a 25° C (Branson® 2510). Las mezclas fueron colocadas en un baño con agitación (Precision Scientific® 25) de 120 rpm durante 24 h a temperatura ambiente. A continuación las mezclas fueron centrifugadas a 210 g y a 30° C, durante 10 minutos (Velocity 18R, Metrix®). Colectados los sobrenadantes, fueron filtrados en unidades de filtración de 13 mm de diámetro con membrana de fluoróporo hidrofóbico (PTFE) con poro de 0.20 µm (Millex Millipore®, No. Cat. SLFG85000). Finalmente, cada solución fue concentrada al vacío en rotavapor (Büchi® R-200) bajo las siguientes condiciones: matraz en rotación a 30 rpm con baño calefactor a 40°C, agua de refrigeración a <10°C y presiones de vacío de 556 y 226 mbar para los extractos de acetona y acetonitrilo, respectivamente. Las oleorresinas resultantes fueron colectadas en viales de color ámbar de 1.5 mL forrados con papel aluminio y almacenados a 4°C en una atmosfera de nitrógeno hasta su posterior análisis.

La cuantificación de CAP y DHC se realizó se realizó por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) utilizando un sistema Agilent Technologies® 1290 Infinity, equipado con inyector automático, bomba binaria, detector de arreglo de diodos y una columna C18 de fase reversa (Waters Acquity UPLC® BEH 1.7 µL 2.1 x 100 mm) mantenida a 25°C durante cada corrida. Para cada analito se preparó una curva de calibración con 7 concentraciones (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 µg/mL, figura 2). Posteriormente, se diluyeron 10 µL de cada oleorresina en 190 µL de acetonitrilo al 60%, y 1 µL de cada solución fue inyectado a una tasa de flujo de 0.4 mL/min en

sistema isocrático (acetonitrilo al 60%). Con el detector UV a una longitud de onda de 280 nm fue confirmada la identidad de los compuestos, mediante la comparación con los tiempos de retención presentados por los estándares de referencia y su cuantificación realizada, a partir del valor x en la regresión simple, de la curva de calibración correspondiente (Figura 3).

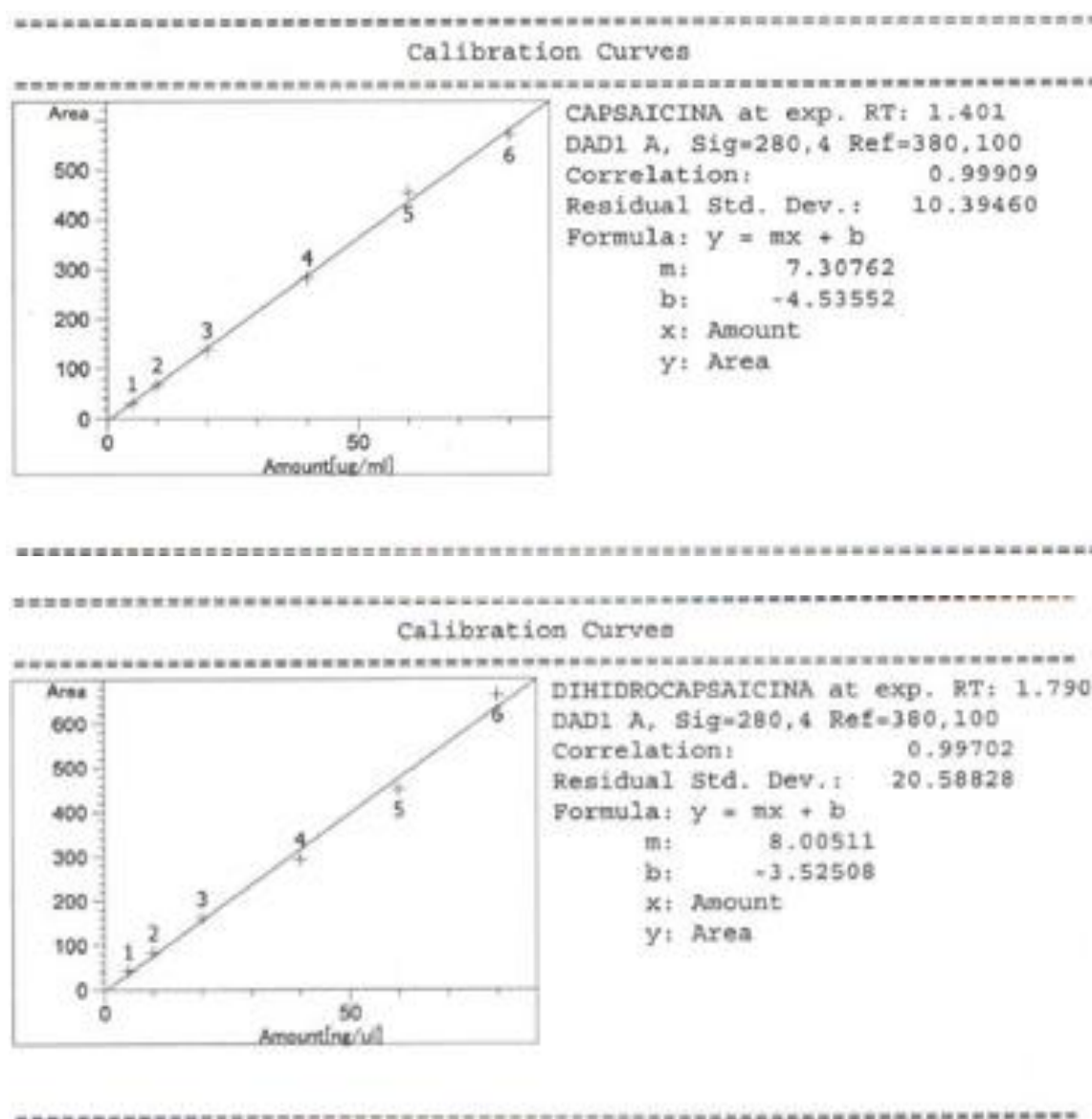


Figura 3. Curvas patrón de CAP (superior) y DHC (inferior).

7.2.2 ENSAYOS DOSIS-RESPUESTA.

A partir de cultivos confluentes, suspensiones de 5×10^3 células por 500 μL de medio de crecimiento, fueron sembradas en 14 pozos de una placa de 24 (Nunclon Δ Thermo Fisher Scientific®, Sigma-Aldrich® No. Cat. D7039-1CS) para luego ser incubadas en las condiciones antes descritas. Transcurridas 48 h, un cambio de condiciones fue realizado para sincronizar los cultivos mediante el reemplazo del medio de crecimiento por medio de sincronización (DMEM suplementado con 2% de SFB + 1% de Anti-anti). Luego de una incubación de 24 h se realizó el conteo de control inicial, incorporando 500 μL de tripsina + 0.02% de EDTA a dos de los pozos e incubando durante 5 min a 37° C. Inactivada la enzima con 500 μL de medio de crecimiento, las suspensiones celulares fueron trasladadas a tubos Eppendorf® de 1.5 mL (Sigma-Aldrich® No. Cat. T9661) y centrifugadas (Eppendorf® 5415C) a 200 g por 5 min. Luego de retirar 900 μL de sobrenadante, los pellets fueron cuidadosamente resuspendidos y 20 μL de las suspensiones celulares concentradas fueron introducidos en cada una de las dos cámaras de un contador celular de Neubauer (BLAUBRAND®, Sigma-Aldrich® No. Cat. BR717805-1EA) para realizar 2 recuentos independientes. Entre tanto, un segundo cambio de condiciones fue realizado al resto de los cultivos en la placa al reemplazar el medio de sincronización de cada par de pozos, por uno de los medios prueba, consistentes en DMEM suplementado con 1% de anti-anti + 0.5% albúmina sérica bovina (ASB, GIBCO® Sigma-Aldrich® No. Cat. 9048-46-8) y una de 9 concentraciones de cada capsaicinoide (1, 10, 100, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 μM), o vehículo Dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.5% (v/v). Dado el carácter no polar de los compuestos de interés, fueron previamente preparadas soluciones stock de CAP y DHC, mediante su disolución en DMSO a un volumen final del 0.5%. Luego de incorporar las mezclas resultantes al volumen pertinente de medio de prueba, las soluciones stock fueron esterilizadas por filtración en membrana de nitrocelulosa con poro de 0.22 μm (Merck Millipore® No. Cat. N8395).

Transcurridas 24 h de exposición, los cultivos fueron tripsinizados y se procedió al recuento celular como ha sido descrito.

El porcentaje de sobrevivencia fue calculado en base a la media de los conteos de control inicial y el porcentaje de proliferación, a partir de la media de los conteos de control negativo (vehículo). Se realizaron regresiones simples de cada tratamiento, utilizando las medias de 3 experimentos independientes desarrollados con células de distintas transferencias, para determinar en cada caso las concentraciones inhibitoria 50 (CI₅₀) y letal 50 (CL₅₀).

7.2.3 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE MUERTE Y SOBREVIVENCIA CELULAR.

Para evaluar el efecto de cada capsaicinoide puro así como de una mezcla de proporción similar a la del material vegetal analizado, sobre la sobrevivencia, apoptosis y necrosis de las células NIH/3T3 fue utilizando el kit de detección de apoptosis Annexin V & Dead Cell Kit Muse™ (Millex Millipore® No. Cat. MCH100105) según las instrucciones del fabricante. Empleando la CL₅₀ para cada caso, las células fueron tratadas durante 8 horas con CAP, DHC, la mezcla o con la cantidad de vehículo correspondiente (DMSO 0.25% v/v), para luego ser lavadas con solución amortiguadora de fosfatos al 1% (PBS) y posteriormente tripsinizadas. Concluida la centrifugación, cada pellet celular fue resuspendido en 1 mL de DMEM + Antianti (1%) + ASB (0.05%), procurando una adecuada homogenización de las células en la suspensión.

Posteriormente una alícuota de cada suspensión celular (100 µL) fue transferida a un tubo Eppendorf® de 1.5 mL y 100 µL del reactivo Annexin-V fueron añadidos. La mezcla fue agitada a velocidad media en vortex (Scientific Industries, INC. G-560) durante 3 segundos, y finalmente puesta en incubación en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 min. Los parámetros de muerte y sobrevivencia celular inducidos por cada uno de los tratamientos, fueron cuantificados en el Muse Cell Analyzer (Millex Millipore® No. Cat. 0500-3115) bajo la lógica siguiente: células que con tinción positiva para anexina V y negativas para 7-aminoactinomicina D,

experimentan apoptosis temprana; las células positivas para anexina V y 7-aminoactinomicina D experimentan apoptosis tardía; una tinción positiva para 7-amino-actinomicina D y negativa para Anexina V sugiere necrosis celular. Por su parte, células que no se tiñen con Anexina V o 7-aminoactinomicina D, están vivas y no experimentan apoptosis cuantificable.

7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las curvas dosis-respuesta se analizaron mediante regresión simple y los datos experimentales de dosis-respuesta con ANOVA de una vía, comparando las medias de 3 experimentos independientes por pruebas post hoc de Tukey (IC95%) y Dunett (IC95%) utilizando el paquete estadístico IBM SPSS® Statisticks versión 22. Los parámetros de sobrevivencia, apoptosis y necrosis se presentan en frecuencias.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES DE *Capsicum chinense*

Las muestras de invernadero secadas en horno, mostraron niveles similares de los capsaicoides estudiados con respecto a las muestras de campo abierto cultivadas en Cancún cuando se realizó la extracción con acetona. Sin embargo, al utilizar acetonitrilo se obtuvo la mitad del rendimiento. La cuantificación de CAP y DHC se resume en el Cuadro 1.

Para el caso de las muestras cultivadas en invernadero, se encontró que la liofilización condujo a un rendimiento 2.56 veces mayor en la extracción de CAP y 2.11 veces mayor de DHC con relación al rendimiento obtenido de muestras secadas por horno. La mejor extracción de capsaicoides fue obtenida con acetonitrilo a partir de muestras de invernadero liofilizadas, con contenidos de 32,697.01 µg de CAP/mL y 10,462.55 µg de DHC/mL (Figura 4). Con excepción de la oleorresina obtenida con acetonitrilo a partir de muestras de campo abierto secadas en horno, todas las oleorresinas analizadas presentaron una razón CAP:DHC \approx 3:1. Por lo que la mezcla preparada con capsaicoides puros para los ensayos de bioactividad mantuvo dicha proporción.

Cuadro 1. Contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina en las oleorresinas de *Capsicum chinense*

Oleorresina			Capsaicina (µg/mL)	Dihidrocapsaicina (µg/mL)
Tipo de fruto	Tipo de secado	Solvente de extracción		
Campo abierto	Horno	Acetona	14,376.86	4,894.92
	Horno	Acetonitrilo	23,388.86	15,927.71
Invernadero	Liofilizado	Acetona	16,044.59	5,374.40
	Liofilizado	Acetonitrilo	32,697.01	10,462.55
	Horno	Acetona	15,107.35	5,255.24
	Horno	Acetonitrilo	12,757.29	4,945.82

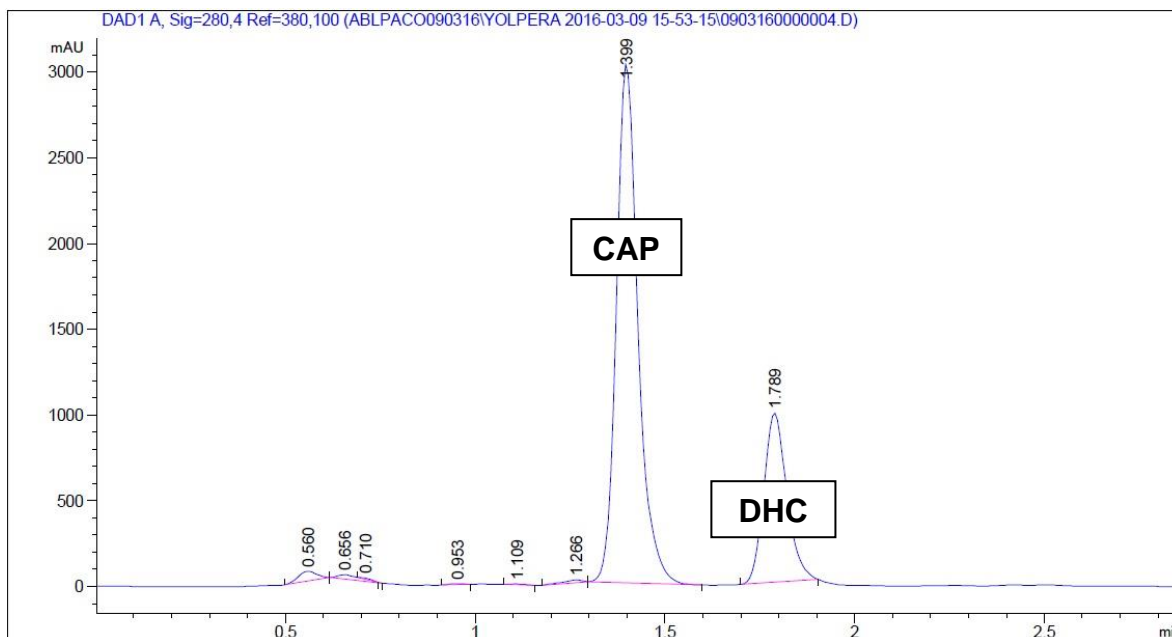


Figura 4. Cromatograma de la oleoresina obtenida a partir de muestras de invernadero liofilizadas, sometidas a extracción con acetonitrilo. En conformidad a los tiempos de retención presentados por los estándares de referencia, 1.399 min corresponde a CAP y 1.789 min a DHC.

8.2 EFECTO DE CAPSAICINOIDES SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA CELULAR

Utilizando el método de recuento directo en hemocitómetro y tiempos de exposición de 24 h, fueron desarrolladas por duplicado 3 series de experimentos dosis-respuesta. Los datos obtenidos, revelan una evidente similitud entre los patrones de respuesta de CAP y DHC a lo largo de todo el espectro de concentraciones estudiado. Una vez desarrollado el análisis de comparación de medias, fue confirmada la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los efectos producidos por cada capsaicinoide, tanto en la proliferación como en la sobrevivencia celular; las cuales, resultaron significativamente afectadas con concentraciones de CAP/DHC $\geq 100 \mu\text{M}$ ($p < 0.05$). Los datos se presentan como porcentaje de proliferación/sobrevivencia con respecto al control negativo/inicial, respectivamente (Figura 5).

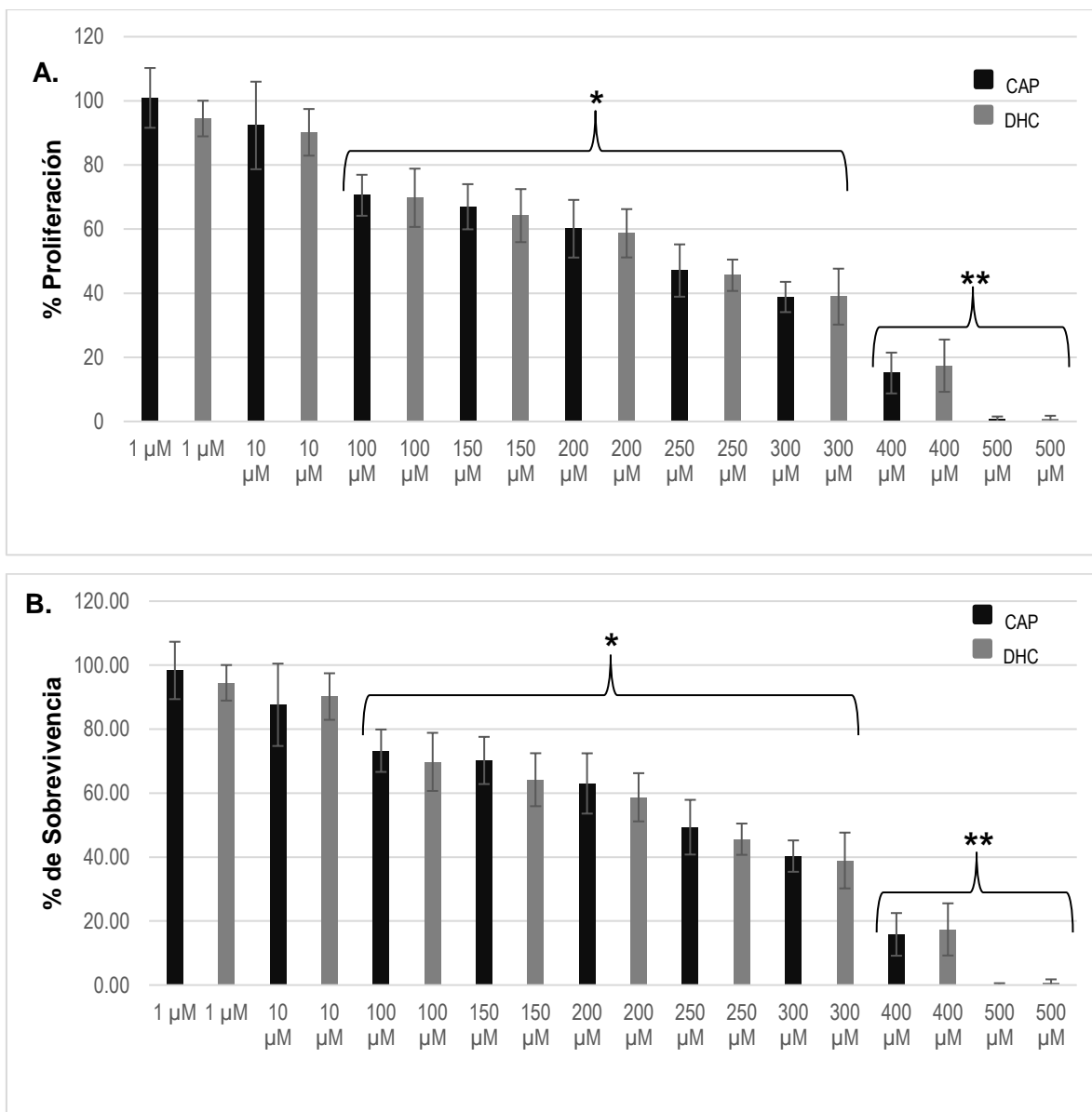


Figura 5. Efecto de CAP y DHC sobre la proliferación (A) y sobrevivencia (B) celular. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$). Tras 24 h de exposición, CAP y DHC reducen en manera concentración-dependiente la proliferación y sobrevivencia de células NIH/3T3. Los efectos de cada concentración empleada, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre capsaicinoides.

Posteriormente, y en el interés de determinar las concentraciones a utilizar en los ensayos de bioactividad sobre parámetros de muerte y sobrevivencia celular, fueron realizadas las curvas dosis-respuesta correspondientes a los efectos de cada capsaicinoide sobre la proliferación y la sobrevivencia celular. En las Figuras 4 y 5

se presentan los diagramas de dispersión resultantes. Bajo el característico patrón sigmoïdal, se observó que el segmento a partir del logaritmo decimal 2.18 (correspondiente a una concentración 150 µM), presentó la linealidad pertinente para el desarrollo de las regresiones simples empleadas para determinar en cada caso la CL₅₀. Bajo las condiciones experimentales de este estudio se observó que las CL₅₀ de ambos capsaicinoides fueron similares, de 233.93 µM para DHC y de 234.67 µM de CAP. Dicho hallazgo sugiere la baja posibilidad de divergencia en los efectos de estos compuestos sobre células NIH/3T3.

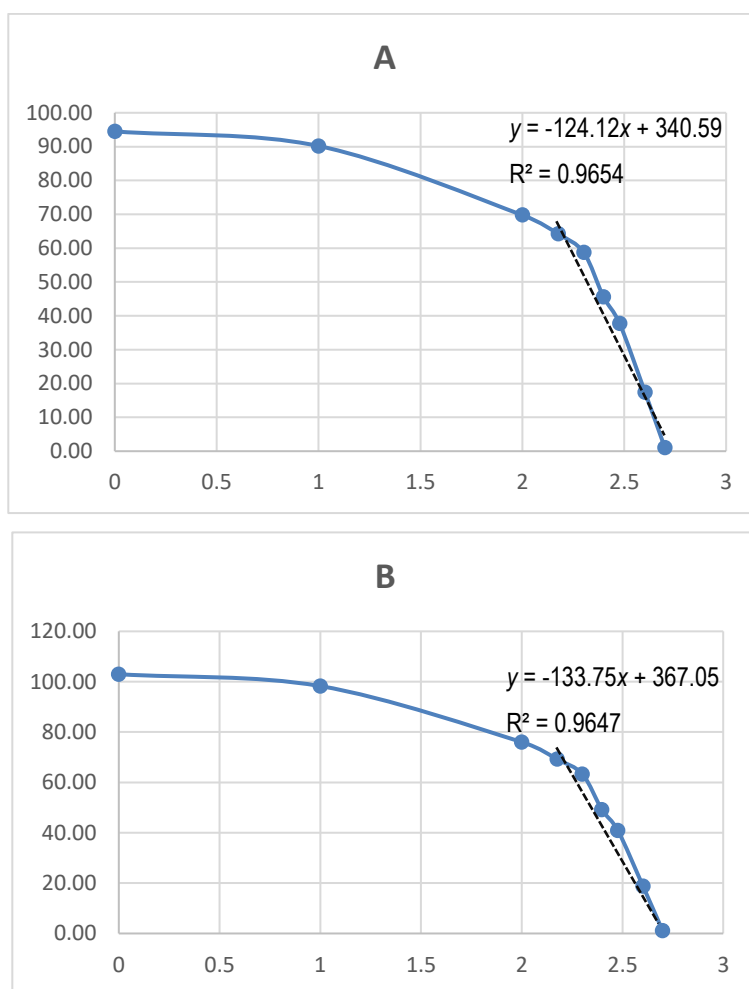


Figura 6. Curva dosis-respuesta de CAP sobre la proliferación (A) y sobrevivencia (B) celular. Los casos representan el porcentaje de la población celular censada tras 24 h de exposición a CAP (concentraciones en notación logarítmica), con respecto a las células censadas tras 0 (B) y 24 h (A) de exposición al vehículo. Representaciones de las rectas de regresión y sus ecuaciones, son acotadas a cada diagrama.

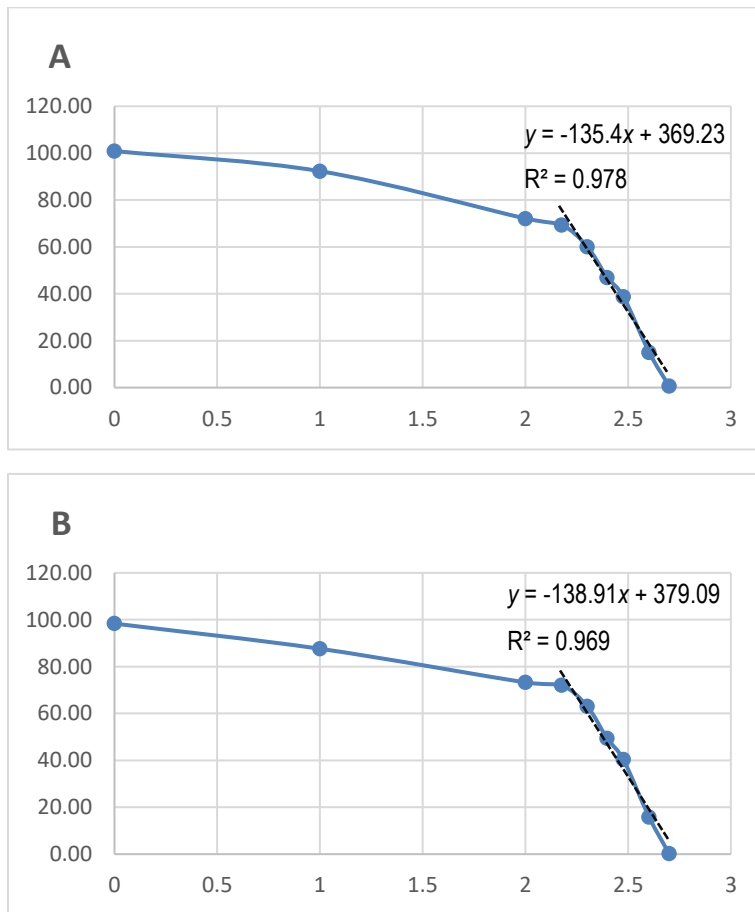


Figura 7. Curva dosis-respuesta de DHC sobre la proliferación (A) y sobrevivencia (B) celular. Los casos representan el porcentaje de la población celular censada tras 24 h de exposición a DHC (concentraciones en notación logarítmica), con respecto a las células censadas tras 0 (B) y 24 h (A) de exposición al vehículo. Representaciones de las rectas de regresión y sus ecuaciones, son acotadas a cada diagrama.

Por otro lado, las CL_{50} determinadas son similares a las reportadas en líneas celulares transformadas, cuya generalidad típicamente experimenta la muerte del 50% de su población con 200 μM de capsaicinoide. Lo anterior, incluso a pesar de la ausencia de tNOX en éste sistema celular. Como precedente, en una serie de experimentos de expresión heteróloga, Zeng y col. (2012) observaron que en concordancia con su naturaleza no transformada, las células NIH/3T3 no

expresaron tNOX sino hasta después de su transfección. Sin embargo, la tolerancia de los fibroblastos murinos fetales empleados en este estudio, fue en promedio apenas 17.15% superior a la comúnmente observada en líneas celulares de cáncer.

8.3 EFECTO DE CAPSAICINOIDES SOBRE MUERTE Y SOBREVIVENCIA CELULAR.

En la parte final del estudio, los parámetros de muerte y sobrevivencia celular fueron evaluados por citometría de flujo. Empleando la CL₅₀ en cada caso, se encontró que tras 8 h de exposición, tanto la CAP como la DHC incrementaron la apoptosis total en un 51.94% con respecto al control, mientras que los efectos sobre la necrosis celular fueron marginales (Figura 8).

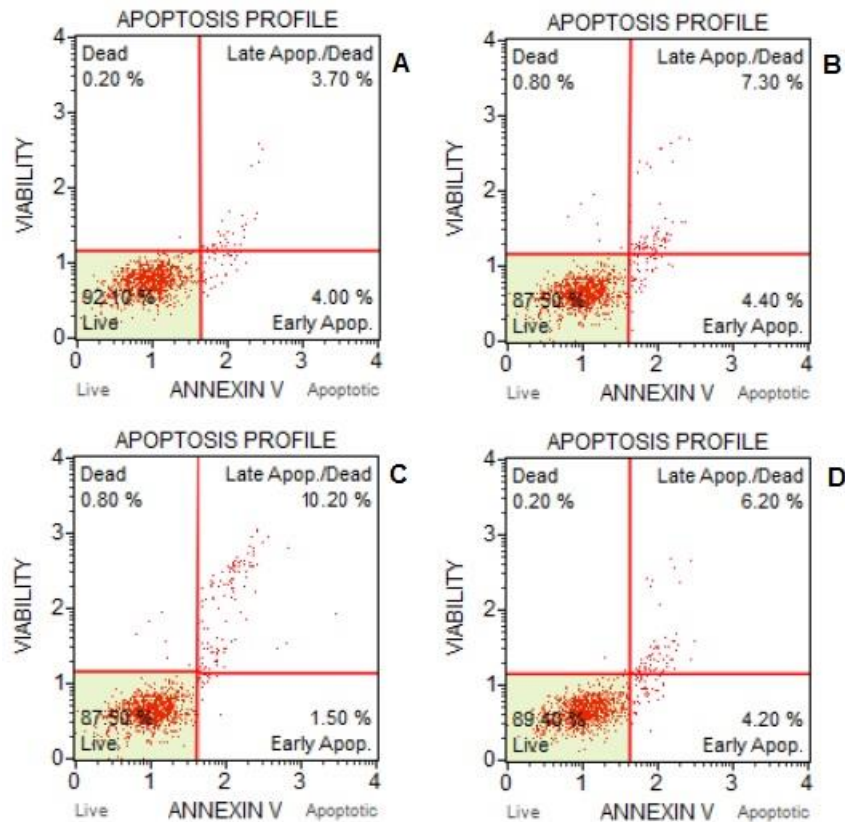


Figura 8. Efecto de capsaicinoides sobre muerte y sobrevivencia de células NIH/3T3. Los paneles presentan los efectos sobre las poblaciones celulares tras 8 h de exposición a vehículo (A), CAP (B), DHC (C) o CAP:DHC 3:1 (D).

En consistencia con los datos previamente obtenidos, los efectos producidos por la CAP y la DHC sobre la sobrevivencia y muerte celular se presentaron en el mismo orden de magnitud (Cuadro 2), en tanto que el tratamiento con la mezcla condujo al mismo patrón de predominancia apoptótica, que incrementó un 35%. Dado que la exposición simultánea de las células NIH/3T3 a ambos capsaicinoides mantuvo una clara tendencia a la resolución por apoptosis, es válido suponer que los mecanismos REDOX subyacentes a los efectos inducidos por cada capsaicinoide, no operan bajo un patrón antagónico. En este sentido, las diferencias previamente divulgadas entre los efectos de la CAP y la DHC sobre sistemas celulares, pudieran estar sujetas a las particularidades de los modelos empleados.

Cuadro 2. Distribución de las poblaciones celulares analizadas

Tratamiento	Condición celular			
	Vivas Células/mL (%)	Necrosis Células/mL (%)	Apoptosis temprana Células/mL (%)	Apoptosis tardía Células/mL (%)
Vehículo	8.76E+05 (92.10%)	1.90+E+03 (0.20%)	3.81E+04 (4.00%)	3.52E+04 (3.70%)
CAP	7.11E+05 (87.50%)	6.50E+03 (0.80%)	3.58E+04 (4.40%)	5.93E+04 (7.30%)
DHC	8.34E+05 (87.50%)	7.53E+03 (0.80%)	1.46E+04 (1.50%)	9.85E+04% (10.20%)
CAP:DHC	7.37E+05 (89.4%)	1.65E+03 (0.20%)	3.46E+04 (4.20%)	5.11E+04 (6.20%)

En la literatura, la descripción de los efectos de la CAP sobre células no transformadas, está comúnmente limitada a datos que indican una mayor tolerancia con respecto a la típicamente presentada en células transformadas. Dentro de las moléculas que han demostrado ser críticas en tal diferencialidad, tNOX es probablemente la más estudiada (Morré y col., 1995; Morré y col., 2000; Chueh y col., 2002; Chueh y col., 2003, Wang y col., 2008, Wang y col., 2011, Wang y col., 2015, Lin y col., 2016, Chen y col., 2016). En células transformadas, la capacidad de la CAP para abrogar en forma dosis-dependiente a tNOX e inhibir su actividad enzimática conlleva efectos apoptóticos, no observados al mismo umbral de concentración en células no transformadas. Las cuales, expresan alternativamente

a ENOX1, oxidasa de NADH que a diferencia de tNOX, no ve disminuida su actividad enzimática en presencia de CAP sino que por el contrario aumenta su producción de la especie reducida NAD⁺, que en última instancia y operando como coenzima para SIRT1 favorece la ejecución de la autofagia dependiente de p53 (Lee y col., 2015). Por cuanto el mecanismo descrito supone un *switch* entre apoptosis y autofagia, podría ser válido especular que la ausencia de tNOX en los modelos utilizados (fibroblastos pulmonares de la línea WI38 y células de cáncer de mama MCF-7) hubiera jugado un papel en los informes de Oh y col. (2008) y Choi y col. (2010), referidos a la autofagia inducida por DHC. Sin embargo, permanecen las interrogantes sobre la respuesta antioxidante también observada en estos trabajos.

9. CONCLUSIONES

Los frutos *Capsicum chinense* cultivados bajo las condiciones referidas en este estudio presentaron un elevado contenido de CAP y DHC. Ambos compuestos, son eficazmente extraídos empleando sistemas de solventes como acetona y acetonitrilo. En adición, las oleorresinas resultantes presentaron una baja presencia de impurezas, tal y como lo demostró el perfil cromatográfico. Por lo que los frutos *Capsicum chinense* se presentan como una conveniente matriz vegetal para la obtención y purificación estos capsaicinoides.

Por su parte, los datos obtenidos en los experimentos de bioactividad, confirman que tanto la CAP como la DHC son eficaces inductores de apoptosis en sistemas celulares *in vitro* y si bien, las células NIH/3T3 presentan una tolerancia ligeramente superior, dicha propiedad no se limita a células de cáncer.

Asimismo, la homología en los patrones de respuesta observados con cada capsaicinoide y con su combinación, sugieren que las diferencias previamente divulgadas en sus mecanismos de acción, podrían haber sido determinadas por los perfiles de expresión génica de los modelos biológicos empleados. Por lo que este trabajo revela la necesidad de profundizar en los eventos moleculares que definen el destino de la célula cuando esta es expuesta a CAP/DHC.

Colectivamente, los resultados de este estudio indican que los efectos biológicos producidos por los dos capsaicinoides principales están sujetos a las mismas interacciones moleculares y que éstas obran en favor de un patrón de respuesta común en fibroblastos murinos embrionarios de la línea NIH/3T3.

10. REFERENCIAS

- Agrawal RC, Wiessler M, Hecker E, Bhide SV. 1986. Tumour-promoting effect of chilli extract in BALB/c mice. *Int J Cancer* 38:689-95.
- Akagi A, Sano N, Uehara H, Minami T, Otsuka H, Izumi K. 1998. Non-carcinogenicity of capsaicinoids in B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol* 36(12):1065-71.
- Amantini C, Ballarini P, Caprodossi S, Nabissi M, Morelli MB, Lucciarini R, ... y Santoni G. 2009. Triggering of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) by capsaicin induces Fas/CD95-mediated apoptosis of urothelial cancer cells in an ATM-dependent manner. *Carcinogenesis* 30(8): 1320-29.
- Anandakumar P, Jagan S, Kamaraj S, Ramakrishnan G, Titto AA, Devaki T. 2008. Beneficial influence of capsaicin on lipid peroxidation, membrane-bound enzymes and glycoprotein profile during experimental lung carcinogenesis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60(6): 803-8.
- Anandakumar P, Kamaraj S, Jagan S, Ramakrishnan G, Asokkumar S, Naveenkumar C, ... y Devaki T. 2012. Capsaicin inhibits benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in an in vivo mouse model. *Inflammation Research* 61(11): 1169-75.
- Anandakumar P, Kamaraj S, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T. 2009a. Effect of capsaicin on glucose metabolism studied in experimental lung carcinogenesis. *Natural product research* 23(8): 763-74.
- Anandakumar P, Kamaraj S, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T. 2009b. Lysosomal abnormalities during benzo (a) pyrene-induced experimental lung carcinogenesis—defensive role of capsaicin. *Fundamental & clinical pharmacology*, 23(1): 97-103.
- Anandakumar P, Kamaraj S, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T. 2013. Capsaicin provokes apoptosis and restricts benzo (a) pyrene induced lung tumorigenesis in Swiss albino mice. *International immunopharmacology* 17(2): 254-9.
- Arce-Rodríguez ML y Ochoa-Alejo N. 2015. Silencing AT3 gene reduces the expression of pAmt, BCAT, Kas, and Acl genes involved in capsaicinoid biosynthesis in chili pepper fruits. *Biologia Plantarum* 59(3): 477-484.
- Archer Victor E y Jones Daniel W. 2002. Capsaicin pepper, cancer and ethnicity. *Medical Hypotheses* 59(4):450-57.
- Asnin L, Park SW. 2015. Isolation and analysis of bioactive compounds in *Capsicum* peppers. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 55(2):254-89.
- Bai H, Li H, Zhang W, Matkowskyj KA, Liao J, Srivastava SK, Yang GY. 2011. Inhibition of chronic pancreatitis and pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)

- by capsaicin in LSL-KrasG12D/Pdx1-Cre mice. *Carcinogenesis* 32(11): 1689-96.
- Beltran J, Ghosh AK, Basu S. 2007. Immunotherapy of tumors with neuroimmune ligand capsaicin. *The Journal of Immunology* 178(5): 3260-3264.
- Bley K, Boorman G, Mohammad B, McKenzie D, Babbar S. 2012. A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicol Pathol* 40(6): 847-73.
- Bode AM, Dong Z. 2011. The two faces of capsaicin. *Cancer Research* 71:2809-2814.
- Buchheit CL, Angarola BL, Steiner A, Weigel KJ, Schafer ZT. 2015. Anoikis evasion in inflammatory breast cancer cells is mediated by Bim-EL sequestration. *Cell Death & Differentiation* 22(8): 1275-86.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389(6653): 816-24.
- Chen HY, Lee YH, Chen HY, Yeh CA, Chueh PJ, Lin YMJ. 2016. Capsaicin Inhibited Aggressive Phenotypes through Downregulation of Tumor-Associated NADH Oxidase (tNOX) by POU Domain Transcription Factor POU3F2. *Molecules* 21(6): 733.
- Cheng HL, Lee YH, Yuan TM, Chen SW, Chueh PJ. 2016. Update on a tumor-associated NADH oxidase in gastric cancer cell growth. *World Journal of Gastroenterology* 22(10): 2900-5.
- Cho N, Morr  DJ. 2009. Early developmental expression of a normally tumor-associated and drug-inhibited cell surface-located NADH oxidase (ENOX2) in non-cancer cells. *Cancer immunology, immunotherapy* 58(4): 547-52.
- Choi CH, Jung YK, Oh SH. 2010. Selective induction of catalase-mediated autophagy by dihydrocapsaicin in lung cell lines. *Free Radic Biol Med* 15;49(2):245-57.
- Chow J, Norng M, Zhang J, Chai J. 2007. TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells--Mechanisms behind a possible new "hot" cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 1773:565-76.
- Chueh PJ, Kim C, Cho N, Morr  DM, Morr  DJ. 2002. Molecular cloning and characterization of a tumor-associated, growth-related, and time-keeping hydroquinone (NADH) oxidase (tNOX) of the HeLa cell surface. *Biochemistry* 41(11): 3732-41.

- Chueh PJ, Wu LY, Morr  DM, Morr  DJ. 2003. tNOX is both necessary and sufficient as a cellular target for the anticancer actions of capsaicin and the green tea catechin (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biofactors* 20(4): 235-49.
- Contreras PM Yahia E. 1998. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chili peppers and relation with peroxidase activity. *J Agr Food Chem* 46(6):2075-79.
- Cordell GA Araujo OE. 1993. Capsaicin: identification, nomenclature and pharmacotherapy. *Ann Pharmacother* 27, 330-6.
- Cortright DN, Szallasi A. 2004. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. *European Journal of Biochemistry*. 271:1814-19.
- Davis FM, Azimi I, Faville RA, Peters AA, Jalink K, Putney JW, ... y Monteith GR. 2014. Induction of epithelial–mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene* 33(18): 2307-2316.
- Djian-Caporilano C, Lefebvre V, Sage-Daubeze A.M. Palloix A. 2007. Capsicum. In: Singh, R.J. (Ed.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vegetable Crops*, vol. 3. CRC Press, Boca Raton, pp. 185–243.
- Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. 2003. Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 22(49): 7858-61.
- Ghosh AK y Basu S. 2012. Tumor macrophages as a target for Capsaicin mediated immunotherapy. *Cancer letters* 324(1): 91-7.
- Hanahan D y Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hoenderop JG, Hartog A, Stuiver M, Doucet A, Willems PH, Bindels RJ. 2000. Localization of the epithelial Ca²⁺ channel in rabbit kidney and intestine. *Journal of the American Society of Nephrology* 11(7): 1171-8.
- Hu YL, Lu S, Szeto KW, Sun J, Wang Y, Lasheras JC, Chien S. 2014. FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific reports*, 4.
- Huh HC, Lee SY, Lee SK, Park NH, Han IS. 2011. Capsaicin induces apoptosis of cisplatin-resistant stomach cancer cells by causing degradation of cisplatin-inducible Aurora-A protein. *Nutr Cancer* 63(7): 1095-103.
- Impheng H, Pongcharoen S, Richert L, Pekthong D, Srisawang P. 2014. The Selective Target of Capsaicin on FASN Expression and De Novo Fatty Acid Synthesis Mediated through ROS Generation Triggers Apoptosis in HepG2 Cells. *PLoS One* 9(9): e107842.

- Jin J, Lin G, Huang H, Xu D, Yu H, Ma X, ... Jiang H. 2013. Capsaicin mediates cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells via stabilizing and activating p53. *International journal of biological sciences* 10(3): 285-95.
- Kanu N, Zhang T, Burrell RA, Chakraborty A, Cronshaw J, Costa CD, ... y Behrens A. 2015. RAD18, WRNIP1 and ATMIN promote ATM signalling in response to replication stress. *Oncogene* [Epub ahead of print]
- Keyhaninejad N, Curry J, Romero J, O'Connell MA. 2014. Fruit specific variability in capsaicinoid accumulation and transcription of structural and regulatory genes in *Capsicum* fruit. *Plant Science* 215, 59-68.
- Kim JM, Kim JD, Yu R, Kim BS, Shin MK, Han IS. 1999. Effects of capsaicin on induction of c-jun proto-oncogene expression in Fisher-344 rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer letters* 142(2): 155-160.
- Kim JP, Park JG, Lee MD, Han MD, Park ST, Lee BH, Jung SE. 1985. Co-carcinogenic effects of several Korean foods on gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Jpn J Surg* 15:427-437
- Kim JY, Kim EH, Kim SU, Kwon TK, Choi KS. 2010. Capsaicin sensitizes malignant glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis via DR5 upregulation and survivin downregulation. *Carcinogenesis* 31(3): 367-75.
- Kim MY, Trudel LJ, Wogan GN. 2009. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. *Anticancer Research* 29(10): 3733-40.
- Kim S, Kang C, Shin CY, Hwang SW, Yang YD, Shim WS., ... y Oh U. 2006. TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1. *The Journal of neuroscience* 26(9): 2403-12.
- Kim S, Park M, Yeom SI, Kim YM, Lee JM, Lee HA, ... Choi HS. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics* 46:270-78.
- Khan AL, Shin JH, Jung HY, Lee IJ. 2014. Regulations of capsaicin synthesis in *Capsicum annuum* L. by *Penicillium resedanum* LK6 during drought conditions. *Scientia Horticulturae* 175:167-73.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(3): 178-196.
- Lau JK, Brown KC, Dom AM, Witte TR, Thornhill BA, Crabtree CM, ... Dasgupta P. 2014. Capsaicin induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. *Apoptosis* 19(8): 1190-1201.

- Lee SH, Richardson RL, Dashwood RH, Baek SJ. 2012. Capsaicin represses transcriptional activity of β -catenin in human colorectal cancer cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 23(6): 646-55.
- Lee YH, Chen HY, Su LJ, Chueh PJ. 2015. Sirtuin 1 (SIRT1) Deacetylase Activity and NAD⁺/NADH Ratio Are Imperative for Capsaicin-Mediated Programmed Cell Death. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:7361-7370.
- Lehen'Kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. 2007. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca²⁺/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 26(52): 7380-5.
- Lin MH, Lee YH, Cheng HL, Chen HY, Jhuang FH, Chueh PJ. 2016. Capsaicin Inhibits Multiple Bladder Cancer Cell Phenotypes by Inhibiting Tumor-Associated NADH Oxidase (tNOX) and Sirtuin1 (SIRT1). *Molecules* 21(7): 849.
- Liu B, Wen X, Cheng Y. 2013. Survival or death: disequilibrating the oncogenic and tumor suppressive autophagy in cancer. *Cell death & disease* 4(10):e892.
- Liu NC, Hsieh PF, Hsieh MK, Zeng ZM, Cheng HL, Liao JW, Chueh PJ. 2012. Capsaicin-mediated tNOX (ENOX2) up-regulation enhances cell proliferation and migration *in vitro* and *in vivo*. *Journal of agricultural and food chemistry* 60(10): 2758-65.
- Liu SC, Yang JJ, Shao KN, Chueh PJ. 2008. RNA interference targeting tNOX attenuates cell migration via a mechanism that involves membrane association of Rac. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 365:672-77.
- Lo YC, Yang YC, Wu IC, Kuo FC, Liu CM, Wang HW, Kuo CH, Wu JY, Wu DC. 2005. Capsaicin-induced cell death in a human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 11:6254-7.
- López-Carrillo L, Camargo MC, Schneider BG, Sicinschi LA, Hernández-Ramírez RU, Correa P, Cebrian ME. 2012. Capsaicin consumption, *Helicobacter pylori* CagA status and IL1B-31C>T genotypes: a host and environment interaction in gastric cancer. *Food Chem Toxicol* 50(6):2118-22.
- Lu HF, Chen YL, Yang JS, Yang YY, Liu JY, Hsu SC, ... y Chung JG. 2010. Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells *in vitro* and colo 205 tumor xenografts *in vivo*. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(24): 12999-3005.
- Luciano F, Jacquelin A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G, Auberger P. 2003. Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22(43): 6785-93.

- Macho A, Calzado MA, Muñoz-Blanco J, Gomez-Diaz C, Gajate C, Mollinedo F, ... Muñoz E. 1999. Selective induction of apoptosis by capsaicin in transformed cells: the role of reactive oxygen species and calcium. *Cell Death and Differentiation* 6:155-165.
- Mao LC, Wang HM, Lin YY, Chang, TK, Hsin, YH, Chueh, PJ. 2008. Stress-induced down-regulation of tumor-associated NADH oxidase during apoptosis in transformed cells. *FEBS letters* 582(23):3445-50.
- Mazourek M, Pujar A, Borovsky Y, Paran I, Mueller L, Jahn MM. 2009. A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant physiology* 150(4):1806-21.
- Meral O, Alpay M, Kismali G, Kosova F, Cakir DU, Pekcan M, Yigit S, Sel, T. 2014. Capsaicin inhibits cell proliferation by cytochrome c release in gastric cancer cells. *Tumor Biology*, 35(7): 6485-6492.
- Morré DJ. 1998. NADH oxidase: a multifunctional ectoprotein of the eukaryotic cell surface. In *Plasma membrane redox systems and their role in biological stress and disease* (pp. 121-156). Springer Netherlands.
- Morré DJ, Chueh PJ, Morré DM. 1995. Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(6): 1831-35.
- Morré DJ, Bridge A, Wu LY, Morré DM. 2000. Preferential inhibition by (-)-epigallocatechin-3-gallate of the cell surface NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Biochemical pharmacology* 60(7): 937-46.
- Morré DJ, Kim C, Hostetler B, Weston N, M Morré D. 2008. Cancer type-specific tNOX isoforms: A putative family of redox protein splice variants with cancer diagnostic and prognostic potential. *Biofactors* 34(3): 201-7.
- Morré DJ, Morré DM. 2012. ENOX2 (tNOX) and Cancer. En: *ECTO-NOX Proteins* Springer New York. pp. 211-259.
- Nagy I, Friston D, Valente JS, Perez JVT, Andreou AP. 2014. Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. In *Capsaicin as a Therapeutic Molecule* (pp. 39-76). Springer Basel.
- Oh SH, Kim YS, Lim SC, Hou YF, Chang IY, You HJ. 2008. Dihydrocapsaicin (DHC), a saturated structural analog of capsaicin, induces autophagy in human cancer cells in a catalase-regulated manner. *Autophagy* 4(8):1009-19.
- Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *Journal of cell science* 112(8): 1237-45.
- Ozawa M. 2015. The N-cadherin cytoplasmic domain confers anchorage-independent growth and the loss of contact inhibition. *Scientific reports*, 5.

- Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, ... Freeman MR. 2001. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 282(3): 729-3
- Perucka I, Materska M. 2001. Phenylalanine ammonia-lyase and antioxidant activities of lipophilic fraction of fresh pepper fruits *Capsicum annum* L. *Innovative Food Science y Emerging Technologies* 2(3):189-192.
- Pramanik KC, Boreddy SR, Srivastava SK. 2011. Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PLoS One* 6(5): e20151.
- Pramanik KC, Fofaria NM, Gupta P, Srivastava SK. 2014. CBP-mediated FOXO-1 acetylation inhibits pancreatic tumor growth by targeting SirT. *Molecular cancer therapeutics* 13(3): 687-98.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. 2011. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature Reviews Cancer* 11(8): 609-618.
- Raphaël M, Lehen'kyi VY, Vandenberghe M, Beck B, Khalimonchuk S, Abeele FV, ... Gosset P. 2014. TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(37): E3870-9.
- Ravishankar GA, Suresh B, Giridhar P, Rao SR, Johnson TS. 2003. Biotechnological studies on *Capsicum* for metabolite production and plant improvement. *Capsicum: the genus Capsicum*, 96-128.
- Reddy UK, Almeida A, Abburu VL, Alaparthy SB, Unselt D, Hankins G, ... Nimmakayala P. 2014. Identification of gene-specific polymorphisms and association with capsaicin pathway metabolites in *Capsicum annum* L. collections. *PloS one* 9(1).
- Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J., ... y Brugge JS. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nature cell biology* 5(8): 733-40.
- Roderick HL, Cook SJ. 2008. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews Cancer* 8(5): 361
- Sánchez-Segura L, Téllez-Medina DI, Evangelista-Lozano S, García-Armenta E, Alamilla-Beltrán L, Hernández-Sánchez H, ... Gutiérrez-López GF. 2015. Morpho-structural description of epidermal tissues related to pungency of *Capsicum* species. *Journal of Food Engineering* 152, 95-104.
- Santoni G, Caprodossi S, Farfariello V, Liberati S, Amantini C. 2013. Role of Death Receptors Belonging to the TNF Family in Capsaicin-Induced Apoptosis of

- Tumor Cells. In Role of Capsaicin in Oxidative Stress and Cancer (pp. 19-46). Springer Netherlands.
- Sarkar A, Bhattacharjee S, Mandal DP. 2015. Induction of Apoptosis by Eugenol and Capsaicin in Human Gastric Cancer AGS Cells-Elucidating the Role of p53. Asian Pac J Cancer Prev 16(15): 6753-9.
- Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY, ... y Brugge JS. 2009. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. Nature 461(7260): 109-13.
- Shim Y. y Song JM. 2015. Quantum dot nanoprobe-based high-content monitoring of notch pathway inhibition of breast cancer stem cell by capsaicin. Molecular and cellular probes 29(6): 376-81.
- Smith SH. 2015. In the shadow of a pepper-centric historiography: Understanding the global diffusion of *Capsicums* in the sixteenth and seventeenth centuries. Journal of ethnopharmacology 167, 64-77.
- Spadaro D, Tapia R, Jond L, Sudol M, Fanning AS, Citi S. 2014. ZO proteins redundantly regulate the transcription factor DbpA/ZONAB. Journal of Biological Chemistry 289(32): 22500-11.
- Srinivasan K. 2015. Biological Activities of Red Pepper (*Capsicum annuum*) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. (just-accepted), 00-00.
- Su YC, Lin YH, Zeng ZM, Shao KN, Chueh PJ. 2012. Chemotherapeutic agents enhance cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition through transient up-regulation of tNOX (ENOX2) protein. Biochim Biophys Acta 1820(11): 1744-52.
- Thiele R, Mueller-Seitz E, Petz M. 2008. Chili pepper fruits: presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids. Journal of agricultural and food chemistry 56(11): 4219-24.
- van Abel M, Hoenderop JG, Bindels RJ. 2005. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 371(4): 295-306.
- Vázquez-Flota F, Miranda-Ham ML, Monforte-González M, Gutiérrez-Carbajal G, Velázquez-García C, Nieto-Pelayo Y. 2007. La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. Revista Fitotecnia Mexicana 30(4): 353-60.
- Vriens J, Appendino G, Nilius B. 2009. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. Molecular Pharmacology 75(6): 1262-79.

- Wang HM, Chueh PJ, Chang SP, Yang CL, Shao KN. 2008. Effect of Capsaicin on tNOX (ENOX2) protein expression in stomach cancer cells. *Biofactors* 34(3): 209-17.
- Wang HM, Chuang SM, Su YC, Li YH, Chueh PJ. 2011. Down-regulation of tumor-associated NADH oxidase, tNOX (ENOX2), enhances capsaicin-induced inhibition of gastric cancer cell growth. *Cell Biochem Biophys* 61(2):355-66.
- Wang P, Sun YC, Lu WH, Huang P, Hu Y. 2015. Selective killing of K-ras-transformed pancreatic cancer cells by targeting NAD (P) H oxidase. *Chinese Journal of Cancer* 34(3): 1.
- Wahyuni Y, Ballester AR, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG. 2011. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72(11): 1358-70.
- Wahyuni Y, Ballester AR, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG. 2013. Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *J Natural Products* 76(4):783-93.
- Weber, N., Ismail, A., Gorwa-Grauslund, M., y Carlquist, M. 2014. Biocatalytic potential of vanillin aminotransferase from *Capsicum chinense*. *BMC biotechnology* 14(1): 1.
- Weigel KJ, Jakimenko A, Conti BA, Chapman SE, Kaliney WJ, Leevy WM, ... y Schafer ZT. 2014. CAF-secreted IGFBNs regulate breast cancer cell anoikis. *Molecular Cancer Research* 12(6): 855-66.
- Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalié A, ... Flockerzi V. 2001. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *Journal of Biological Chemistry* 276(22): 19461-68.
- Woudenberg-Vrenken TE, Lameris AL, Weißgerber P, Olausson J, Flockerzi V, Bindels RJ, ... Hoenderop JG. 2012. Functional TRPV6 channels are crucial for transepithelial Ca²⁺ absorption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 303(7): G879-85.
- Yang F, Xiao X, Cheng W, Yang W, Yu P, Song Z, ... Zheng J. 2015. Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nature Chemical Biology* 11(7): 518-24.
- Zeng ZM, Chuang SM, Chang TC, Hong CW, Chou JC, Yang JJ, Chueh PJ. 2012. Phosphorylation of serine-504 of tNOX (ENOX2) modulates cell proliferation and migration in cancer cells. *Experimental cell research* 318(14): 1759-66.

Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK. 2008. *In vitro* and *in vivo* induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis* 13(12): 1465-78.

Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR. 2002. Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Laboratory Investigation* 82(12): 1755-64.