

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**Evaluación biológica de dos análogos de Capsaicina en la inhibición
de la Lipogénesis en Adipocitos 3T3-L1**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

CLAUDIA ELIZABETH MORALES MARTÍNEZ

Las Agujas, Zapopan, Jal., julio de 2013



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. CLAUDIA ELIZABETH MORALES MARTÍNEZ
PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción TESIS con el título: "Evaluación biológica de dos análogos de Capsaicina en la inhibición de la Lipogénesis en Adipocitos 3T3-L1 ", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo Dr. Alejandro Canales Aguirre y como asesor a la Dra. Ana Lilia Vigueras Guzmán.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 12 de julio de 2013


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE
TITULACION




M.C. VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción Tesis con el título: "Evaluación biológica de dos análogos de Capsaicina en la inhibición de la Lipogénesis en Adipocitos 3T3-L1" que realizó el/la pasante **Claudia Elizabeth Morales Martínez** con número de código **207395582**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Guadalajara, Jalisco, a 26 de junio de 2013



Dr. Alejandro Canales Aguirre
 Director del trabajo



Dra. Ana Lilia Viguera's Guzmán
 Asesora

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		26 Jun 2013
Dr. Liberato Portillo Martínez		26. JUN. 2013
Dra. Mónica Elisa Ureña Guerrero		26/06/13
Dra. Ana Lilia Viguera's Guzmán		26/06/2013

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), dentro del proyecto "Evaluación del Efecto en la Adipogénesis de una Capsaicina obtenida por síntesis enzimática", dirigido por el Dr. Jorge Rodríguez González. Clave del proyecto: SALUD-2008-C01-86988 CONACYT.

Director de tesis

Dr. Alejandro Arturo Canales Aguirre

Asesora

Dra. Ana Lilia Vígueras Guzmán

*A las personas que más amo en la vida, mis padres
Gracias por su apoyo incondicional*

*A mi abuelita por estar siempre conmigo,
a pesar de la distancia*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Canales Aguirre por la oportunidad que me brindó de pertenecer al equipo de trabajo de este proyecto y por todo el apoyo y dirección para que esta tesis pudiera realizarse, pero sobre todo por creer en mí aún sin conocerme.

A la Dra. Rocío López Roa y Saray Quintero por el tiempo, conocimiento y apoyo brindado.

Al Dr. Jorge Rodríguez González, investigador del área de Biotecnología Industrial en CIATEJ, por haber provisto amablemente las moléculas utilizadas en este estudio.

Al Dr. Rubén de Regil, por su valiosa participación en la síntesis de las moléculas empleadas en éste estudio.

A la Dra. Ana Laura Márquez Aguirre por su valiosa dirección en el área de biología molecular para que este proyecto pueda continuar reforzándose.

A mis sinodales, el Dr. Liberato Portillo, la Dra. Mónica Ureña, el Dr. Alfonso Islas y la Dra. Ana Lilia Viguera por su valiosa contribución y visto bueno al escrito final de esta tesis.

A mi "partner" José Herrera por todo el apoyo incondicional que me has brindado, agradezco infinitamente el haberte conocido, y encontrarnos en el camino; sé que aún nos quedan muchas aventuras por disfrutar.

A mis padres María Isabel Martínez Cordero y José Octavio Morales Albores, por su interminable apoyo en todo momento de mi vida, sus enseñanzas y sobre todo su amor; los admiro y los quiero, siempre serán mi mayor motivación.

A Diosito por siempre iluminar mi camino y permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida, pero sobre todo, por permitirme compartir esta etapa con mi familia y amigos.

ÍNDICE GENERAL

Índice general	v
Índice de figuras	viii
Índice de cuadros	x
Lista de abreviaturas	xi
Resumen	xiii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Obesidad.....	2
2.1.1 El índice de masa corporal.....	3
2.1.2 La obesidad en México.....	4
2.1.3 Mecanismos biológicos de la obesidad.....	6
2.1.4 Alternativas para el manejo y control de la obesidad.....	6
2.1.4.1 Esquema nutricional y actividad física.....	7
2.1.4.2 Tratamientos quirúrgicos.....	7
2.1.4.3 Tratamientos farmacológicos.....	7
2.2 Modelos experimentales para el estudio de la obesidad.....	9
2.2.1 Modelos experimentales <i>in vivo</i>	9
2.2.2 Modelos experimentales <i>in vitro</i>	10
2.2.2.1 Línea celular 3T3-L1.....	12
2.3 Metabolismo lipídico.....	13
2.4 Tejido adiposo.....	13
2.4.1 Tejido adiposo marrón.....	14
2.4.2 Tejido adiposo blanco.....	15
2.4.3 Distribución del tejido adiposo.....	15

2.5 Adipocitos	16
2.5.1 Desarrollo y metabolismo del adipocito.....	17
2.5.1.1 Lipogénesis.....	17
2.5.1.2 Lipólisis.....	17
2.6 Adipogénesis	19
2.6.1 Diferenciación de los adipocitos	20
2.7 El género <i>Capsicum</i> y su rol en la prevención de la obesidad	21
2.7.1 Composición química.....	21
2.7.1.1 Capsaicinoides.....	21
2.7.1.2 Pungencia	22
2.7.1.3 Capsaicina	23
2.7.1.4 Derivados/análogos de la capsaicina.....	24
2.7.2 La capsaicina y su importancia en la medicina.....	25
2.7.3 Mecanismos de acción de la capsaicina	26
2.7.3.1 Receptor TRPV1	26
2.7.3.2 Vía de la caspasa-3	27
3. Justificación	28
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	31
5.1 Objetivo general.....	31
5.2 Objetivos particulares.....	31
6. Material y métodos.....	32
6.1 Cultivo y propagación de las células 3T3-L1.....	32
6.2 Diferenciación <i>in vitro</i> de las células 3T3-L1	32
6.3 Preparación de las moléculas de estudio	33
6.4 Evaluación biológica de las muestras.....	33

6.4.1 Determinación del porcentaje de viabilidad celular por el método de MTT.....	33
6.4.2 Determinación del contenido de lípidos totales mediante la tinción de rojo oleoso.....	34
6.4.3 Cuantificación del contenido de triglicéridos intracelular	34
6.4.4 Cuantificación del contenido de glicerol libre	35
6.4.5 Análisis de datos.....	35
7. Resultados	36
7.1 Establecimiento y diferenciación de las células 3T3-L1	36
7.2 Efecto de las moléculas sobre la viabilidad celular.....	37
7.3 Tinción de las vesículas lipídicas de los adipocitos 3T3-L1	38
7.4 Efecto de las moléculas sobre la acumulación de triglicéridos en adipocitos 3T3-L1	40
7.5 Efecto lipolítico de las moléculas en los adipocitos 3T3-L1	41
8. Discusión	42
8.1 Evaluación de la citotoxicidad de olvanil y VAMC8.....	42
8.2 Evaluación del efecto de las moléculas en la inhibición de la lipogénesis	43
8.3 Olvanil y VAMC8 promueven la lipólisis en adipocitos 3T3-L1	43
9. Conclusiones	45
10. Perspectivas	46
11. Referencias.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Porcentaje de la población mundial mayor de 15 años con un IMC superior a 30.....	4
Figura 2.	Porcentaje de la población en México mayor de 20 años, según su situación de peso corporal, por sexo.....	5
Figura 3.	Modelos celulares <i>in vitro</i> para el estudio de la diferenciación celular del adipocito.....	11
Figura 4.	Principales características entre los tipos de tejido adiposo.....	14
Figura 5.	Fisiología y metabolismo del tejido adiposo.....	16
Figura 6.	Principales rutas metabólicas durante el proceso de lipogénesis y lipólisis en una célula adiposa.....	18
Figura 7.	Esquematación del proceso de adipogénesis.....	19
Figura 8.	Clasificación de los chiles de acuerdo al grado de pungencia que presentan.....	23
Figura 9.	Estructura química de la capsaicina.....	24
Figura 10.	Regiones de la molécula de capsaicina.....	24
Figura 11.	Mecanismo de acción de la capsaicina propuesto por Zhang y col. en el 2007.....	27
Figura 12.	Fibroblastos 3T3-L1 en fase exponencial de crecimiento.....	36
Figura 13.	Caracterización morfológica de adipocitos 3T3-L1 durante la diferenciación <i>in vitro</i>	37
Figura 14.	Efecto citotóxico de olvanil, VAMC8 y capsaicina sobre el porcentaje de viabilidad celular en adipocitos 3T3-L1.....	38
Figura 15.	Tinción intracelular de lípidos.....	39

Figura 16. Cuantificación de la acumulación de triglicéridos en los adipocitos tratados con olvanil, capsaicina y VAMC8 a diferentes concentraciones.....	39
Figura 17. Efecto de olvanil, VAMC8 y capsaicina en la inhibición del contenido de triglicéridos intracelular en adipocitos 3T3-L1.....	40
Figura 18. Efecto de olvanil, capsaicina y VAMC8 a diferentes concentraciones sobre el proceso de lipólisis.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Parámetros de peso según el IMC obtenido.....	3
Cuadro 2.	Fármacos para el tratamiento de la obesidad.....	8
Cuadro 3.	Modelos celulares <i>in vitro</i> para el estudios de la diferenciación de adipocitos.....	10
Cuadro 4.	Principales capsaicinoides presentes en el chile.....	22
Cuadro 5.	Características y propiedades de la capsaicina y derivados sintetizados de capsaicina.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil - CoA carboxilasa
ACP	Proteína acarreadora de acilos
ADN	Acido desoxirribonucleico
AGL	Ácidos grasos libres
C/EBP- α	Proteina alfa de unión al potenciador CCAAT
C/EBPs	Proteinas de unión al potenciador CCAAT
CK	Ciclo de Krebs
CL	Enzima Citrato liasa
DE	Desviación estándar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
ES	Células Madres Embrionarias
FDA	Agencia de Drogas y Alimentos
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	4 - (2hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HSL	Hormona sensitiva a lipasa
IBMX	3-isobutil-metil-xantina
IMC	Índice de masa corporal
IL -1	Interleucina 1
IL -6	Interleucina 6

LSH	Enzima lipasa sensible a hormonas
LPL	Lipoproteína lipasa
MTT	3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro difeniltetrazolio
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PPAR γ	Receptor activador de la proliferación del peroxisoma gamma
SFB	Suero Fetal Bovino
TG	Triglicéridos
TRPV1	Canal con potencial transitorio de receptor tipo 1

RESUMEN

En los últimos años, la obesidad se ha convertido en la enfermedad metabólica de mayor preocupación en el mundo, considerándose un problema de Salud Pública. México ocupa el primer lugar en obesidad infantil y el segundo lugar en obesidad en adultos a nivel mundial. Investigaciones recientes sugieren que los mecanismos clave para reducir la incidencia de obesidad son la disminución de la diferenciación y proliferación de preadipocitos; así como la disminución de la lipogénesis. Se ha reportado que la capsaicina, principio pungente (irritante) del chile del género *Capsicum*, disminuye el peso del tejido adiposo mediante la disminución del contenido de triglicéridos en los adipocitos, sin embargo, su alta pungencia puede ocasionar serios problemas a la salud. En el presente estudio, se evaluó el efecto de la capsaicina y sus derivados: VAMC8 (medianamente pungente) y olvanil (no pungente), sobre la inhibición de la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1. Las tres moléculas disminuyeron significativamente la acumulación intracelular de triglicéridos de una manera dosis-dependiente. Además, se observó un incremento significativo en la concentración de glicerol en el medio extracelular en las células tratadas con capsaicina, olvanil y VAMC8 en comparación con las no tratadas. Estos resultados demuestran que el nivel de pungencia de dichas moléculas no es determinante para desencadenar un efecto en el metabolismo de los adipocitos 3T3-L1. Además, los resultados sugieren que olvanil puede ser considerado como un análogo de la capsaicina de interés científico y tecnológico debido a que es un agente no pungente capaz de reducir el contenido celular de lípidos e inducir un efecto biológico significativo en adipocitos 3T3-L1.

1

INTRODUCCIÓN

Se ha descrito a la obesidad como la inflamación que sufre el tejido adiposo a consecuencia de una respuesta al exceso de nutrientes, los cuales funcionan como señales que generan una serie de desórdenes metabólicos, como la resistencia a la insulina y otras patologías relacionadas, donde los adipocitos juegan un papel central (Trayhurn, 2007).

En los últimos años, los estudios relacionados con la obesidad se han enfocado en la búsqueda de moléculas naturales (principios bioactivos) que inhiban la acumulación de grasa corporal. Estas moléculas derivados de fuentes naturales, han demostrado tener efectos benéficos sobre esta vía, mediante la inhibición de la adipogénesis y la estimulación de la lipólisis. Algunos de estos componentes son el epigallocatequina-3-galato del té verde, que ha demostrado reducir la masa grasa, incrementar el gasto energético y prevenir la obesidad *in vitro*; y más recientemente, la capsaicina de los chiles del género *Capsicum*, para la cual se ha demostrado un efecto en el catabolismo lipídico e inhibición de la adipogénesis, reduciendo el peso y la grasa corporal (Kim y Park, 2011; Lee y col., 2011). Sin embargo, la capsaicina es un compuesto altamente pungente o irritante, por lo que se ha trabajado en la obtención de compuestos análogos, a través de la síntesis enzimática o química, para inducir modificaciones estructurales de la molécula y favorecer su aplicación terapéutica.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de olvanil y VAMC8, dos derivados de capsaicina con menor pungencia, sobre el proceso de lipogénesis en adipocitos 3T3-L1 y se comparó con el efecto ya descrito de la capsaicina.

2

ANTECEDENTES

2.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por el exceso de grasa en el organismo, asociada frecuentemente, al exceso de peso corporal. Generalmente la obesidad propicia el desarrollo de otras enfermedades como cardiopatías, diabetes, hipertensión, trastornos del aparato locomotor e incluso cáncer, lo que significa un importante factor de riesgo para la salud (López y González, 2001; Pi-Sunyer, 2002). En el 2010, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a la obesidad como uno de los principales problemas de Salud Pública en el mundo, reportando que entre el 60 y 65 % de la población mundial se ve afectada por esta enfermedad, siendo el quinto factor de riesgo de mortalidad en el mundo. A consecuencia de esto, fallecen aproximadamente 2.8 millones de personas al año.

Además de las consecuencias negativas a la salud, los individuos que padecen obesidad sufren de problemas psicológicos debido a que experimentan rechazo social y discriminación, generando prejuicios, autoestima baja y pérdida de autocontrol en la ingesta de alimentos, lo que a largo plazo contribuyen a seguir aumentando de peso. Existen muchos factores que aumentan la prevalencia de la obesidad, entre los principales se encuentran los factores genéticos, que están directamente influenciados por el ambiente, los factores dietéticos y metabólicos, es decir ingerir mayor cantidad de calorías que las que el cuerpo necesita y no realizar ningún tipo de actividad física; y los factores socioeconómicos, en donde el nivel económico de las personas determina sus hábitos alimenticios. Como se puede ver, los factores que influyen en el incremento de peso son muy complejos y tienden a ser dependientes unos con otros, situación que obliga a la aplicación de un tratamiento integral y multidisciplinario (Whitaker y col., 2000; Martínez y col., 2002).

Aunque la obesidad y el sobrepeso se utilizan erróneamente como sinónimos, ya que ambos conceptos se relacionan con la acumulación de grasa corporal, existen parámetros para indicar si una persona tiene sobrepeso u obesidad y en qué grado (**Cuadro 1**). Actualmente los indicadores más utilizados son el porcentaje de peso actual con respecto al ideal y el Índice de Masa Corporal (IMC), considerado este último como el método más práctico para evaluar el grado de riesgo asociado con la obesidad (Osuna y col., 2006; Ayvaz y Cimen, 2011).

2.1.1 El Índice de Masa Corporal

El IMC evalúa el contenido de grasa corporal en relación al peso y estatura que presenta un individuo. Fue ideado por el estadístico belga Adolphe J. Quetelet en 1835 y resulta de dividir el peso de la persona entre la estatura elevada al cuadrado, es decir: $IMC = \text{peso (kg)} / \text{estatura (m}^2\text{)}$. Una persona con un IMC entre 18.5 y 24.9 se encuentra en la clasificación de peso normal, un IMC de 25 a 29.9 se clasifica con sobrepeso y un individuo se considera obeso cuando su IMC es de 30 o más. En la actualidad, estos límites y categorías de peso que se emplean con base en el IMC son aplicables para toda la población adulta (Weisell, 2002; Díaz, 2011).

Cuadro 1. Parámetros de peso según el IMC obtenido. Los valores están expresados en kg/m^2 (WHO, 2004).

PESO	GRADO DE OBESIDAD	IMC	RIESGO DE ENFERMEDAD
Bajo	-	< 18.5	Elevado
Normal	-	18.5 – 24.9	Normal
Sobrepeso	-	25.0 – 29.9	Elevado
Obeso	I	30.0 – 34.9	Alto
Obeso Severo	II	35.0 – 39.9	Muy alto
Obeso Mórbido	III	≥ 40.0	Extremadamente alto

2.1.2 La obesidad en México

La obesidad no excluye a ningún país del mundo y en las últimas décadas los incrementos más drásticos en la prevalencia de obesidad han sido en los países en desarrollo como México, parte de China y Tailandia. Actualmente México es el segundo país con mayores casos de obesidad y sobrepeso de una lista de cuarenta naciones (**Figura 1**), únicamente Estados Unidos supera esta proporción, en donde el 31 % son individuos obesos (OECD, 2011).

EEUU  31%	México  24%	Gran Bretaña  23%	Rusia  22%	Grecia  22%	Australia  22%	Nueva Zelanda  21%	Hungría  19%	República Checa  15%
Canadá  14%	España  13%	Irlanda  13%	Alemania  13%	Portugal  13%	Finlandia  13%	Turquía  12%	Bélgica  12%	Polonia  11%
Holanda  10%	Suecia  10%	Dinamarca  10%	Francia  9%	Austria  9%	Italia  9%	Noruega  9%	Japón  3%	Corea  3%

Figura 1. Porcentaje de la población mundial mayor de 15 años con un IMC superior a 30 (OECD, 2011).

De acuerdo con el XII Censo General de Población y Vivienda, la frecuencia de obesidad en México ha ido aumentando con el paso de los años y para el 2006, el 21.7 % de hombres y mujeres adultos presentaban algún grado de obesidad y el 38 % tenía sobrepeso, es decir solo el 40 % de la población adulta se encontraba en su peso adecuado, mientras que el 60 % tenía un IMC inadecuado (Olaiz y col., 2006). Los últimos datos reportan que la prevalencia de obesidad es del 69.4 %, de los cuales el 40 % tienen sobrepeso y el 29.4 % padecen obesidad, siendo más afectadas las mujeres que los hombres (**Figura 2**) (Barrera y col., 2013).



Figura 2. Porcentaje de la población en México mayor de 20 años, según su situación de peso corporal, por sexo. Se observa que en la categoría de sobrepeso, la prevalencia es mayor entre hombres que mujeres: 37.4 % de las mujeres y 42.5 % de los hombres presentan esa condición nutricia. Sucede lo contrario en la categoría de obesidad, donde la proporción es mayor entre las mujeres que en los hombres (Díaz, 2011).

La mayoría de los casos de obesidad tienen un origen multifactorial, sin embargo, se ha comprobado que en México la principal causa o factor del sobrepeso son los malos hábitos alimenticios, que incluye el ritmo de vida, la preferencia a la comida chatarra y sobre todo la falta de actividad física, es decir, el sedentarismo (González, 2002; García, 2011).

En los últimos años, esta enfermedad ha tenido un fuerte impacto social y económico para el país, por ejemplo, cada año se otorgan alrededor de 200.000 consultas relacionadas con el sobrepeso y la obesidad, siendo Chihuahua, Veracruz, Sinaloa, Guanajuato, Estado de México, Distrito Federal y Jalisco los estados de la república que concentran la mayor población con obesidad mórbida; además, se estima que para el año 2017, los costos de salud generados por la atención de enfermedades causadas por la obesidad ascenderán a 150,000 millones de pesos aproximadamente (Sassi, 2010; Aguirre, 2012).

2.1.3 Mecanismos biológicos de la obesidad

El cuerpo humano requiere energía constante para el mantenimiento del organismo, la cual se obtiene de los productos que ingerimos. Los alimentos contienen calorías que le aportan al cuerpo la energía necesaria para llevar a cabo todas sus funciones y mantener la temperatura corporal adecuada. Cuando comemos, parte de los nutrientes son usados de inmediato y otra gran parte se almacena como reserva, que se aprovecha en periodos de ayuno. El almacenamiento de la grasa no presenta limitación, ya que los depósitos de grasa se expanden con facilidad para dar lugar a cantidades superiores de almacenamiento. Para que exista una acumulación excesiva de grasa en el cuerpo, el número de calorías ingeridas tiene que ser mucho mayor que el número de calorías gastadas, es decir, si se consume una dieta alta en carbohidratos y grasas, y éstas no son aprovechadas o eliminadas por el organismo, se generan nuevas células grasas a partir de células precursoras existentes en el tejido adiposo, llevando a un estado de sobrepeso y a largo plazo de obesidad (Tortora y Derrickson, 2006; Lazo de la Vega y Fernández, 2010).

En individuos con un IMC normal, el tejido adiposo contiene 18 % de agua, 80 % triacilglicéridos y 2 % de proteínas, mientras que en las personas obesas el contenido graso aumenta y proporcionalmente el contenido acuoso disminuye. A medida que una persona adulta aumenta de peso, la cantidad de tejido adiposo se incrementa, generándose al mismo tiempo nuevos vasos sanguíneos: como consecuencia, una persona obesa tiene más vasos sanguíneos que una persona delgada, situación que trae consigo un mayor esfuerzo del corazón para bombear la sangre, lo que suele desencadenar múltiples problemas a la salud (Tortora y Derrickson, 2006).

2.1.4 Alternativas para el manejo y control de la obesidad

La obesidad es una enfermedad muy compleja que requiere de un tratamiento muy amplio en el que participan múltiples aspectos como lo es el paciente, el entorno familiar, el ritmo de vida, los hábitos alimenticios, el estado de ánimo, entre otros: por lo que se hace evidente la intervención de diferentes disciplinas y estrategias para su manejo. Actualmente, existen diversos tratamientos para combatir la obesidad, sin embargo, como todo tratamiento, existen ciertas limitaciones y determinantes para que éste demuestre su efectividad.

2.1.4.1 Esquema nutricional y actividad física

La actividad física es cualquier movimiento realizado por el músculo esquelético que produzca un gasto energético y que sea benéfico para la salud. Se ha demostrado que la combinación de una dieta saludable con actividad física, es un tratamiento que ayuda al mantenimiento de peso, ya que influye en el equilibrio de energía teniendo un efecto sobre el metabolismo, y a largo plazo mejora la composición corporal. Sin embargo, no se considera un tratamiento que pueda ser aplicado en personas con un grado de obesidad alto (grado II y III), ya que estas acciones tienden a incrementar considerablemente la tensión arterial y producir serias complicaciones médicas, pudiendo empeorar la calidad de vida (Reyes y Madrigal, 2010).

2.1.4.2 Tratamientos quirúrgicos

Este tipo de procedimientos se eligen sólo si las personas cumplen con uno o varios criterios, entre los cuales están la edad, el grado de obesidad que el paciente presenta, enfermedades asociadas y múltiples intentos para perder peso. En la actualidad existen tres tipos de técnicas: restrictivas, que limitan la capacidad gástrica creando un reservorio en la parte superior del estómago; malabsortivas, las cuales disminuyen la absorción de nutrientes a nivel intestinal; y mixtas, que combinan los procedimientos de restricción y malabsorción. Otro procedimiento es la liposucción, que se considera una cirugía estética que ayuda a reducir el exceso de grasa acumulada en algunas zonas difíciles de eliminar, contribuyendo a perder peso a corto plazo y mejorar la apariencia corporal. Sin embargo, estos tipos de tratamientos suelen ser muy complicados y pueden implicar una recuperación dolorosa para el paciente, además del costo elevado que cada uno de ellos tiene (Lépori, 2006; González, 2010).

2.1.4.3 Tratamientos farmacológicos

La farmacoterapia constituye una de las alternativas más utilizadas para combatir la obesidad y surge como una herramienta complementaria a la dieta y demás tratamientos, ya que sin medicamentos la enfermedad tiende a progresar y empeorar la situación y pronóstico del paciente. Hoy en día, se conocen tres tipos de fármacos, los que reducen el apetito, los que alteran la absorción de nutrientes y los que

incrementan el gasto energético (**Cuadro 2**). Como se puede ver, estos tratamientos van orientados a controlar la ingesta de alimentos actuando sobre la saciedad y controlando la absorción gastrointestinal de grasas y carbohidratos, sin embargo, sólo algunos han sido aprobados por la FDA para ser utilizados como tratamiento para la obesidad y la mayoría de los pacientes no se comprometen al proceso, ya que se requiere de mucha voluntad para cambiar conductas en la personalidad y estilo de vida, y sobre todo mantenerlas en forma indefinida (Parra, 2010).

Cuadro 2. Fármacos para el tratamiento de la obesidad (Martin y Anton, 2002; Caballero, 2006).

MEDICAMENTO	MECANISMO	FASE DE DESARROLLO SEGÚN FDA	EFFECTOS SECUNDARIOS
Sibutramina	Sensación de saciedad	Aceptado en 1999. Retirado del mercado en 2010.	Boca seca, cefalea, ritmo cardiaco elevado, insomnio.
Fentermina	Sensación de saciedad	Aceptado en 1970. Solo para manejo de peso por corto tiempo.	Tembor, insomnio, ritmo cardiaco elevado, presión alta, potencial para adicción.
Lorcaserina	Suprime el apetito	Fase III	Cefalea, mareo, náusea.
Orlistat	Inhibidor de lipasa. Inhibe la absorción de la grasa intestinal.	Aprobado en 1998. Disponible en el mercado sin receta desde el 2007.	Diarrea y dolor abdominal. Se reportan casos de daño en el hígado.
Topiramato	Disminución de apetito	Aprobado en el 2010.	Cefalea, diarrea, ritmo cardiaco elevado.

2.2 Modelos experimentales para el estudio de la obesidad

Los modelos experimentales surgen de la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas para combatir la obesidad y sus complicaciones a la salud. Cada modelo genera información importante que ayuda a correlacionar información e interpretar más cercanamente a la realidad los mecanismos biológicos que desencadenan esta patología. Hoy en día existen dos tipos de modelos experimentales. los modelos *in vivo* y los modelos *in vitro* (Carmona, 2010).

2.2.1 Modelos experimentales *in vivo*

La obesidad puede ser inducida en ciertos modelos animales mediante alteraciones neuroendócrinas, manipulaciones dietéticas o cambios genéticos. Los roedores son los animales que más se utilizan como modelos experimentales debido a la gran similitud de su genoma con el de los humanos. Por ejemplo, el ratón Agouti es el modelo de obesidad de tipo genético más descrito, en el cual los animales son portadores del alelo obeso AVY con el consiguiente desarrollo de obesidad ocasionado por el bloqueo de las señales de saciedad moduladas por la insulina y leptina (Dolinoy, 2008). Otro modelo genético muy utilizado es el de la rata Zucker que se caracteriza por la presencia de una mutación "fatty", los animales son obesos desde las primeras semanas de vida, y presentan una mutación recesiva en el gen del receptor de leptina, lo cual desencadena su singular fenotipo obeso. Así mismo, existen los modelos por alteraciones en el control nervioso de la ingesta de alimento y metabolismo celular, que puede ser inducida por alimentación forzada, dietas ricas en grasa, algún fármaco, entre otras (Aleixandre y Miguel, 2008).

Existen diversos modelos de obesidad *in vivo*, no obstante, es muy importante tomar en cuenta el tipo de diseño experimental que se va a llevar a cabo en la investigación cuando se decida utilizar un modelo *in vivo*, ya que todos son útiles pero tienen ciertas limitaciones, además es importante saber el costo de estos ejemplares para ajustarse al presupuesto planeado en la investigación (Benavides y Guenet, 2003).

TESIS/CUCBA

2.2.2 Modelos experimentales *in vitro*

Los modelos *in vitro* son una herramienta que permite estudiar los procesos celulares y moleculares implicados en la diferenciación de los adipocitos, es decir los eventos que se llevan a cabo durante la transición de preadipocitos hasta células adiposas maduras. Para el estudio del proceso de obesidad, se han utilizado diversos modelos de cultivos celulares, en los que se incluyen las líneas celulares preadipocitarias y los cultivos primarios de células precursoras del estroma vascular del tejido adiposo (**Cuadro 3**) (Gregoire y col. 1998).

Cuadro 3. Modelos celulares *in vitro* para el estudio de la diferenciación de adipocitos
(Moreno y Martínez, 2002).

LÍNEAS CELULARES	ORIGEN	INDUCTORES DE LA DIFERENCIACIÓN	CATEGORÍA
ES	Blastocitos de embrión de ratón	Ácido retinoico	Totipotente
3T3-L1	Fibroblastos de embrión de ratón	10% SFB, Insulina, dexametasona, IBMX	Unipotente
3T3-F442A	Fibroblastos de embrión de ratón	10% SFB, Insulina	Unipotente
Ob 17	Grasa epididimal de ratón adulto	8% SFB, insulina, Triyodotironina	Unipotente
CULTIVOS PRIMARIOS	ORIGEN	INDUCTORES DE LA DIFERENCIACIÓN	CATEGORÍA
Rata	Células estroma vasculares de grasa subcutánea	Insulina con o sin SFB	Unipotente
Ratón	Células estroma vasculares de grasa subcutánea	Insulina, HDL, dexametasona	Unipotente
Humano	Células estroma vasculares de grasa subcutánea	Insulina y glucocorticoides	Unipotente

Un cultivo primario son preadipocitos o adipocitos tomados directamente de un organismo, que pueden ser obtenidos de varias especies a diferentes etapas del desarrollo y de diferentes depósitos de grasa; las células conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Una línea celular es un cultivo que tiene alta capacidad de multiplicarse *in vitro*, establecido a partir del primer subcultivo de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen, además, son considerados cultivos inmortales ya que su proliferación es ilimitada (**Figura 3**) (Freshney, 2005).

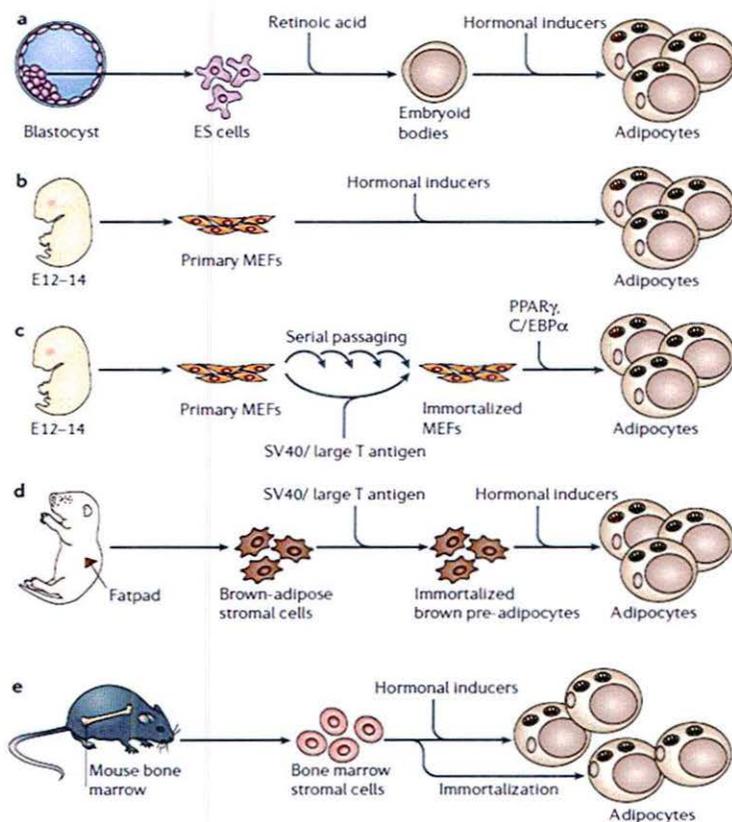


Figura 3. Modelos celulares *in vitro* para el estudio de la diferenciación celular del adipocito.

a) Células madres embrionarias (ES) pueden diferenciarse directamente en adipocitos en presencia de hormonas pro-adipogénicas y ácido retinoico. Fibroblastos aislados de embriones de ratón en los días 12-14, pueden diferenciarse en: **b)** adipocitos mediante estímulos hormonales; y **c)** células inmortalizadas cuando después de una serie de pasajes-subcultivos se cultivan en presencia de factores de transcripción pro-adipogénicos como PPAR γ y C/EBP- α ; **d)** células adiposas marrones de ratones recién nacidos inmortalizadas pueden diferenciarse eficientemente en adipocitos con un tratamiento hormonal; **e)** células tomadas directamente de la médula ósea pueden diferenciarse en adipocitos con inductores hormonales (Rosen y MacDougald, 2006).

2.2.2.1 Línea Celular 3T3-L1

Las líneas celulares se pueden dividir en tres categorías: células embrionarias totipotentes, capaces de generar todas las líneas celulares; células multipotentes, que pueden dar lugar a miocitos, adipocitos y condrocitos; y células ya comprometidas hacia la línea adiposa, que se denominan líneas celulares de preadipocitos. Algunas de ellas son la 3T3-L1 y 3T3-F442A, las cuales sufren varios procesos de división celular antes de diferenciarse, mientras que otras líneas celulares de preadipocitos como las C3H10T1/2, tanto de ratón como de humano, se diferencian sin pasar por mitosis post-confluencia (Rosen y MacDougald, 2006; Vidal-Puig, 2007).

La línea celular 3T3-L1 se origina a partir del cultivo primario de las células 3T3 del ratón suizo albino. Tiene características morfológicas de fibroblastos que bajo ciertos estímulos de tipo hormonal como la insulina, un glucocorticoide (dexametasona) e isobulmetilxantina (IBMX), llegan a diferenciarse a adipocitos, incrementando la síntesis y acumulación de triglicéridos para finalmente adquirir la apariencia redonda de un adipocito maduro. Esta línea constituye un modelo celular del adipocito *in vitro* ampliamente utilizado para el estudio de la obesidad y metabolismo de lípidos, y en comparación con otras líneas celulares existentes, se ha comprobado que la 3T3-L1 resulta en un tipo de célula que más se asemeja a las células adiposas que se producen en los tejidos. Otra ventaja es que estas células tienen la capacidad de captar más rápidamente los ácidos grasos del medio para sintetizar triglicéridos, y por consiguiente, almacenar mayor cantidad en su interior (Green y Kehinde, 1975; Clavijo y col., 2007).

2.3 Metabolismo lipídico

Los alimentos que ingerimos contienen gran cantidad de lípidos, entre los cuales se encuentran los triglicéridos (TG), formados por tres moléculas de ácidos grasos y una molécula de glicerol que se unen mediante una reacción llamada esterificación. Los TG se hidrolizan por la acción de lipasas que son enzimas que degradan a los lípidos, generando ácidos grasos libres y glicerol. Posteriormente estos ácidos grasos serán transportados por la sangre, unidos a una molécula de albúmina, y otra parte de los ácidos grasos serán re-esterificados en el intestino y formarán TG de nuevo. Estos lípidos absorbidos por la mucosa intestinal se empaquetan formando partículas de lipoproteínas llamadas quilomicrones, las cuales circularán por el organismo, a nivel linfático y por el torrente sanguíneo, liberando lípidos por los diferentes tejidos como tejido adiposo, músculo, corazón, entre otros; los cuales podrán extraer los TG de los quilomicrones gracias a la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) que se encuentra localizada en el epitelio de los capilares sanguíneos de dichos tejidos. De modo similar, los TG que son sintetizados por el hígado, son empaquetados formando otro tipo de lipoproteínas de muy baja densidad llamadas VLDL, las cuales se vierten directamente al torrente sanguíneo. La LPL hidroliza a los TG y los ácidos grasos son capturados por los tejidos para ser utilizados como reserva o como fuente de energía (Nelson y Cox, 2006).

2.4 Tejido adiposo

El tejido adiposo es una capa de grasa que se encuentra distribuido en todo el cuerpo por debajo de la piel (tejido adiposo subcutáneo), y alrededor de las vísceras (tejido adiposo visceral). El tejido adiposo subcutáneo es el responsable de las formas corporales distintivas entre hombres y mujeres, representa del 15 al 20 % del peso corporal en hombres y del 20 al 25 % del peso corporal en mujeres; además de proveer aislamiento térmico. Por otro lado, el tejido adiposo visceral tiene como función rellenar los espacios entre los órganos y mantenerlos en su posición adecuada (Sandoval, 2010).

En términos generales, el tejido adiposo está compuesto de varios tipos celulares como lo son fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, predominando las células conjuntivas denominadas adipocitos. Se distinguen dos tipos de tejido

(Figura 4), el tejido adiposo blanco (grasa blanca) responsable del almacenamiento lipídico y el tejido adiposo marrón (grasa parda) encargado de la actividad termogénica, es decir producción de calor (Tortora y Derrickson., 2006).

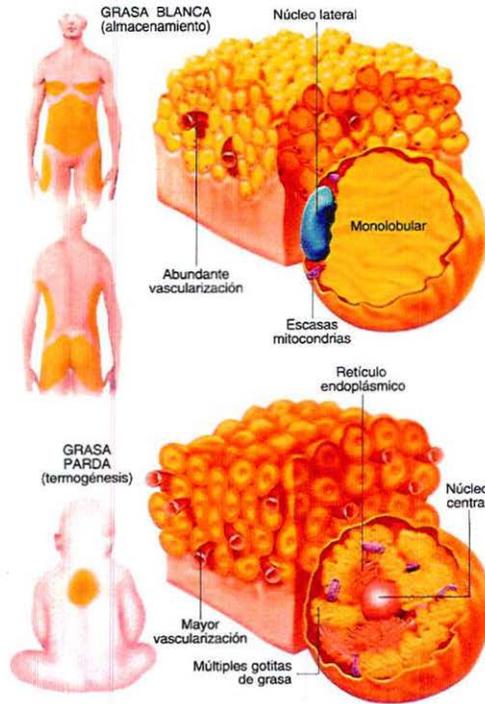


Figura 4. Principales características entre los tipos de tejido adiposo (Lépori, 2006).

2.4.1 Tejido adiposo marrón

Este tejido es abundante en el feto y el recién nacido, aunque de mayor importancia en aquellos mamíferos que hibernan, ya que la producción de calor en estos animales es imprescindible para vivir. Histológicamente sus células adiposas son poligonales, pequeñas y se observan en el citoplasma numerosas gotitas de grasa. Una notable diferencia entre los dos tipos de tejido, es que éste tiene abundantes mitocondrias con crestas muy desarrolladas, las cuales le dan el aspecto de color marrón. Estos

organelos son los principales productores de energía, y como tales, son los encargados de proporcionar calor cuando es necesario (Lépori, 2006).

2.4.2 Tejido adiposo blanco

También llamado unilocular, porque los lípidos se almacenan en un solo compartimiento, es decir en el interior de las células como una gran gota citoplasmática. Es un tejido muy vascularizado que presenta gran cantidad de adipocitos poliédricos y se considera la mayor reserva de energía en eucariotes. Sus principales funciones son almacenar energía en forma de triglicéridos en periodos de sobrealimentación, y cuando el cuerpo requiera suministrar energía en algún lugar del organismo, liberarla en forma de ácidos grasos (Lépori, 2006). Además, hoy en día se conoce que el tejido adiposo blanco no es simplemente un depósito de energía, también se comporta como un órgano endócrino ya que libera sustancias de secreción que intervienen en la regulación de la ingesta, gasto energético, respuesta inmune y función vascular, estas sustancias son llamadas adipocinas y algunas son leptina, TNF- α , IL-1, IL-6, adiponectina, estrógenos y resistina, actuando todas ellas en la regulación endócrina, parácrina y exócrina dentro del propio tejido y en la función de órganos como el páncreas, hígado y cerebro (Fonseca y col., 2007).

2.4.3 Distribución del tejido adiposo

La cantidad y localización del tejido adiposo varía según la edad en cada persona. En el nacimiento existen aproximadamente cinco billones de adipocitos que representan el 17 % del peso corporal y no existe diferenciación entre sexos. A medida que el niño va creciendo y hasta los 10 años de edad, el tejido graso aumenta su volumen sin aumentar el número de células adiposas; al inicio de la pubertad ya existe un aumento en el número y tamaño de los adipocitos, así como la notable diferencia en la masa grasa entre sexos, ya que en el organismo femenino se presenta el doble de la cantidad de grasa que en el masculino sin que esto represente obesidad. Aunque los adipocitos pueden seguirse formando a lo largo de la vida, se dice que en un adolescente el número de adipocitos es similar a los de un adulto (Díaz, 2010).

2.5 Adipocitos

Los adipocitos son células redondeadas que, dentro del tejido adiposo blanco, se encargan de sintetizar, almacenar y degradar lípidos en su interior, desplazando al núcleo y demás organelos hacia la periferia, mostrando una apariencia como de anillo. Debido a la elasticidad de la membrana plasmática, su tamaño puede variar entre 10 y 100 μm , es decir, modifican su diámetro de acuerdo a la cantidad de triglicéridos que almacenan. Se ha comprobado que un adipocito tiene la capacidad de almacenar cantidades de triglicéridos iguales al 80-95 % de su masa celular, la cual se encuentra generalmente en forma líquida para ser hidrolizada y transportada desde las células (**Figura 5**) (Guyton y Hall, 2006).

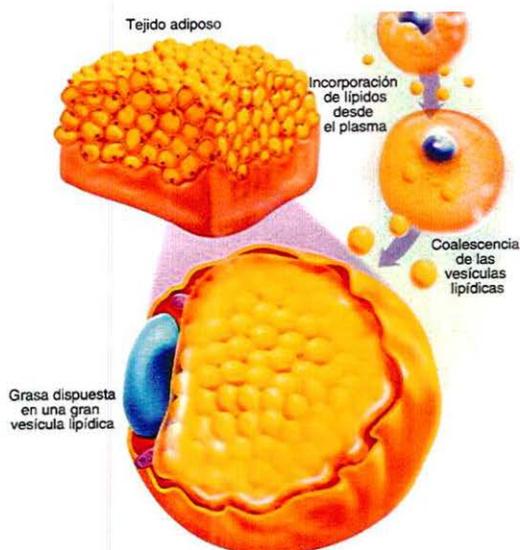


Figura 5. Fisiología y metabolismo del tejido adiposo. Acumulación de triglicéridos dentro del adipocito (Lépori, 2006).

2.5.1 Desarrollo y metabolismo del adipocito

El aumento del volumen del tejido adiposo puede deberse por un lado, a un aumento en el tamaño de los adipocitos que se conoce como hipertrofia y es característica de las obesidades grado I; y por otro, al incremento en el número de adipocitos llamado hiperplasia, presente en obesidades grado II y III (Lépori, 2006). Para que el tejido adiposo pueda llevar a cabo sus funciones, se encuentran implicados dos procesos bioquímicos: lipogénesis y lipólisis, ambos son simultáneos y se llevan a cabo dentro del adipocito.

2.5.1.1 Lipogénesis

Se conoce como lipogénesis al proceso por el cual se sintetizan ácidos grasos a partir de Malonil-CoA y Acetil – CoA, unidos con una molécula de glicerol para formar triglicéridos. Este proceso utiliza la vía de la glucólisis para producir piruvato, el cual mediante un proceso catalítico dentro de la mitocondria, se convierte en el precursor Acetil – CoA y subsecuentemente en citrato. A través de un acarreador que se encuentra en la membrana mitocondrial, el citrato sale hacia el citoplasma de la célula donde es transformado por la enzima citrato liasa en Acetil – CoA. Posteriormente, la enzima acetil – CoA carboxilasa adiciona un carbono a este compuesto de dos carbonos y lo transforma en una molécula de tres carbonos, llamada malonil – CoA. El malonil – CoA se une a una proteína acarreadora de acilos (ACP) para que pueda conjugarse con una molécula de acetil –CoA y formar acetoacetil – ACP, quien a través de todo un proceso de β reducción, forma un ácido graso con mayor número de carbonos. Este último paso se repite hasta formar ácidos grasos de cadena larga. Finalmente, tres ácidos grasos de cadena larga se unen a una molécula de glicerol para dar lugar a una molécula de triacilglicerol (síntesis *de novo* de triglicéridos), más comúnmente llamado triacilglicérido (**Figura 6**). Los triacilglicéridos se acumularán como depósito energético (Esquivel y col., 2010; Large y col., 2004).

2.5.1.2 Lipólisis

Durante la lipólisis, los triacilglicéridos que fueron almacenados en el tejido adiposo durante la lipogénesis, serán nuevamente hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol

que van a ser utilizados por el resto del organismo como combustible, en su mayoría por el tejido muscular pero también son importantes para el hígado y riñón (Figura 6). La lipólisis es estimulada por el frío, el ejercicio y la hipoglucemia a través de la enzima lipasa sensible a hormonas (LSH), ya que es la encargada de iniciar el proceso lipolítico; la actividad de esta enzima es regulada por las catecolaminas, hormona de crecimiento, glucagón y corticoesteroides (Esquivel y col., 2010; Large y col., 2004).

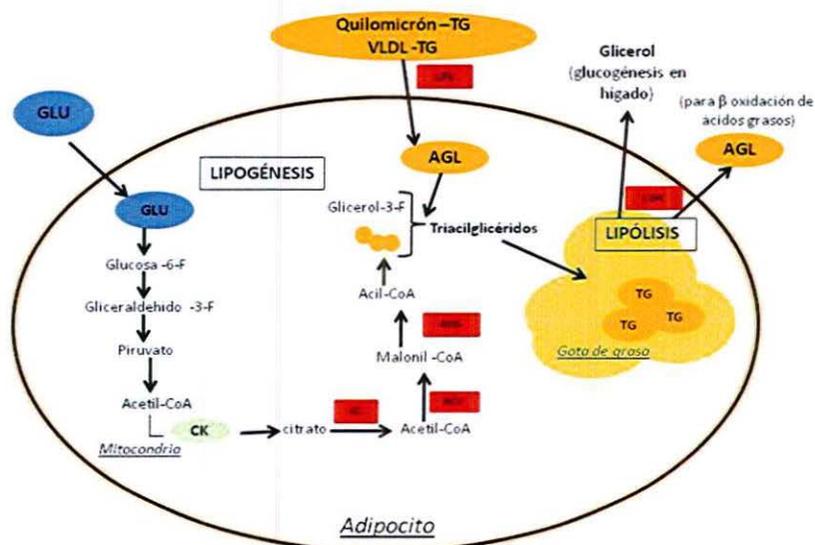


Figura 6. Principales rutas metabólicas durante el proceso de lipogénesis y lipólisis en una célula adiposa. **Lipogénesis:** a partir del piruvato, en la mitocondria tiene lugar la formación del precursor acetil - CoA, que entra al ciclo de Krebs (CK) para formar citrato, que se transforma en Acetil - CoA por acción de la enzima citrato liasa (CL). El acetil - CoA se carboxila hacia malonil - CoA mediante la enzima acetil - CoA - carboxilasa (ACC). El malonil - CoA se une a una proteína acarreadora de acilos y se conjuga con otra molécula de Acetil - CoA para formar acetoacetil - ACP, que formará un ácido graso con mayor número de carbonos. Por otro lado, la lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza a los triglicéridos (TG) proveniente de los quilomicrones y VLDL circulantes en ácidos grasos (AGL), que ingresan a la célula para incorporarse al proceso de lipogénesis. Los lípidos recién formados se almacenan en vesículas de grasa en el citoplasma. **Lipólisis:** ocurre cuando la enzima lipasa sensible a hormonas (LSH) transforma a los TG en glicerol y ácidos grasos, éstos se transportan hacia el hígado y el músculo para emplearse como fuente de energía (Lazo de la Vega y Fernández, 2010; Large y col., 2004).

2.6 Adipogénesis

El origen embrionario de los adipocitos no es totalmente conocido, aunque numerosos estudios sugieren que derivan de una célula progenitora mesenquimática totipotente que puede diferenciarse hacia células unipotentes del tipo adipocitos u otros linajes como lo son condroblastos, mioblastos y osteoblastos. Esta capacidad de poder diferenciarse en diferentes tipos celulares dependerá de mecanismos moleculares y de la exposición a diferentes ambientes que le indicarán a la célula madre hacia donde evolucionar (Lépori, 2006; Rayalam y col., 2008).

Los preadipocitos son células que están comprometidas a diferenciarse hacia la línea adiposa. morfológicamente pasan de ser similarmente fibroblastos hacia células de forma esférica que con el tiempo van desarrollando las características bioquímicas de lo que se consideraría un adipocito totalmente maduro. A éste proceso de diferenciación mediante el cual las células precursoras multipotenciales dan origen a células adiposas maduras se le conoce como adipogénesis (**Figura 7**), el cual se encuentra modulado por diferentes hormonas y factores de crecimiento (Gregoire y col., 1998; Strem y col., 2005)

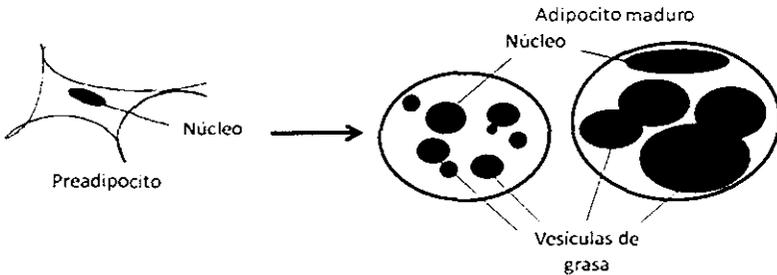


Figura 7. Esquematación del proceso de adipogénesis. Principales diferencias morfológicas entre un preadipocito (fibroblasto) y un adipocito maduro (Yang y Jarrett, 2009).

2.6.1 Diferenciación de los adipocitos

La diferenciación de los adipocitos implica un proceso complejo en el cual los preadipocitos interrumpen su crecimiento, es decir, salen del ciclo celular antes de su conversión final en adipocitos. Este proceso involucra cambios sucesivos en la expresión de genes, adquiriendo aquellos que son característicos para la célula y a su vez reprimiendo los que no son necesarios para el adipocito maduro (Ntambi y Cheul, 2000). Actualmente se ha propuesto un modelo de diferenciación para la línea celular 3T3-L1 en tres fases que se describen a continuación:

1. Fase de inhibición del crecimiento y expansión clonal

Durante esta fase, los preadipocitos sufren inhibición por contacto y se produce una expansión mitótica por replicación del ADN y duplicación celular. El contacto entre células induce la expresión de LPL y genes relacionados con la diferenciación (Quintero, 2013).

2. Fase de expresión temprana de genes

En esta fase la expansión clonal cesa, y se inicia la activación transcripcional de genes específicos del adipocito mediante una serie de señales bioquímicas. Se han descrito hasta ahora dos familias de estos factores, las C/EBPs (proteínas de unión al potenciador CCAAT) y PPAR γ (receptor gamma de activación de la proliferación del peroxisoma), altamente indispensables y críticos en la regulación de la transcripción de genes adipogénicos (Ntambi y Cheul, 2000; Gerhold y col., 2002).

3. Fase de diferenciación terminal

Las células adquieren el fenotipo de adipocito maduro e incrementan la expresión y actividad de enzimas implicadas en el proceso de lipogénesis, tales como acetil-CoA, enzima sintetasa de ácidos grasos, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, entre otras, observándose por lo tanto un incremento en el almacenamiento lipídico, ya que se lleva a cabo la síntesis y transporte de lípidos. Así mismo, los adipocitos en esta etapa comienzan a secretar sustancias endócrinas y parácrinas, tales como leptina y adiposina (Moreno y Martínez, 2002; Rayalam y col., 2008; Rosen y MacDougald, 2006).

2.7 El género *Capsicum* y su rol en la prevención de la obesidad

Capsicum es un género de plantas que fue descrito por Carlos Linneo en 1753 para hacer alusión a que las semillas estaban encapsuladas en una especie de caja debido a la forma que tienen los frutos de estas plantas. El nombre científico del género deriva del griego “*kapto*” que significa picar, lo que describe la principal característica del fruto. Pertenecen a este género todas las formas de chile, pimiento o ají que son utilizados por el hombre, los cuales se incluyen en la familia de las solanáceas, la misma a la que pertenecen el jitomate y el tabaco. En México, se utiliza la palabra chile para referirse a todo fruto clasificado dentro de este género, el cual comprende alrededor de 30 especies, de las cuales sólo cinco de ellas son cultivadas: *Capsicum annum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens* (Nuez y col., 2003; López, 2003).

2.7.1 Composición química

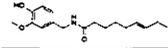
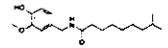
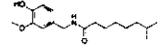
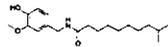
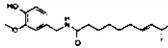
Una de las características que diferencian a los vegetales de los animales, es su capacidad de llevar a cabo reacciones químicas llamadas rutas metabólicas secundarias, las cuales son distintas a las del metabolismo primario, que es común en todos los seres vivos. El producto final de estas rutas metabólicas secundarias son compuestos químicos que generalmente se restringen a un grupo taxonómico o incluso a una especie en concreto, y se denominan metabolitos secundarios. Algunos ejemplos de metabolitos secundarios son aceites volátiles como lupeol; ácidos orgánicos como ácido caféico y ácido cítrico; terpenoides; y alcaloides como la solanina y capsaicina, entre otros. Los compuestos característicos de los frutos del género *Capsicum* son los capsaicinoides (Pimienta, 2008; Ruiz y col., 2011).

2.7.1.1 Capsaicinoides

Los capsaicinoides son compuestos que se producen como metabolitos secundarios en las plantas del género *Capsicum*, y son las moléculas responsables del sabor picante que las caracteriza. Los frutos de las plantas de este género son conocidos como chiles, cuyo consumo se asocia principalmente a la sensación picante que produce en la boca. Los capsaicinoides se sintetizan y acumulan dentro de las vesículas del tejido placentario del fruto; dicha biosíntesis se lleva a cabo durante

todo el desarrollo del fruto hasta el final de la fase de crecimiento. La cantidad de capsaicinoides acumulados, disminuye después de la maduración del fruto (Vázquez y col., 2007). Se conocen alrededor de 20 capsaicinoides (**Cuadro 4**), sin embargo, hoy en día se sabe que más del 90 % del contenido total de los capsaicinoides en el chile lo representan en primer lugar, la capsaicina y en segundo lugar, la dihidrocapsaicina, que se diferencian por la longitud de su cadena, presencia o ausencia de doble enlace, el punto de ramificación y su picor relativo (Rodríguez y col., 2010; Chinn y col., 2010).

Cuadro 4. Principales capsaicinoides presentes en el chile (Peng y col., 2012).

NOMBRE	% EN EL CHILE	PUNGENCIA (Unidades Scoville)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Capsaicina	69%	15,000,000	
Dihidrocapsaicina	22%	15,000,000	
Nordihidrocapsaicina	7%	9,100,000	
Homodihidrocapsaicina	1%	8,600,000	
Homocapsaicina	1%	8,600,000	

2.7.1.2 Pungencia

El término pungencia se refiere al grado de picor que tiene un compuesto. El nivel de pungencia que se presenta en las diferentes especies de *Capsicum* es proporcional a la capacidad de acumular capsaicinoides. Existen dos métodos para determinar la pungencia: la escala Scoville y Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). La escala Scoville, fue la primera técnica de estimación de picor confiable, descrita en 1912 por Wilbur Scoville, quien desarrolló "El Examen Organoléptico Scoville", que consistía en diluir el extracto de chile en agua azucarada hasta que el picante ya no pudiera ser detectado por una persona: el número de veces que es diluido el extracto corresponde al grado de pungencia en la escala. Actualmente, la escala consiste en diluir un extracto en agua tantas veces como sea necesario hasta hacer imperceptible el picor. De acuerdo con este método, el chile habanero, considerado el más picante, debe ser diluido 300.000 veces antes de perder su nivel máximo de picante (**Figura 8**) (Bosland y Votava, 2000).



Figura 8. Clasificación de los chiles de acuerdo al grado de pungencia que presentan. La concentración de capsaicina se representa en Unidades Scoville (SIAP, 2010).

Actualmente, el método más común para determinar la pungencia es por HPLC, el cual consiste en separar los componentes de una o varias mezclas, basándose en los diferentes tipos de interacciones químicas que se presentan entre las sustancias analizadas y una columna cromatográfica; la cuantificación se realiza mediante la concentración de compuestos presentes obtenida en la muestra, y se determina el valor de pungencia en Unidades Scoville (Collins y col., 1995; Tapia y col., 2008; Al y col., 2011).

2.7.1.3 Capsaicina

Es el capsaicinoide más abundante presente en el chile. Como compuesto químico se denomina 8-metil-N-vanillil-6-nonenamida, es lipofílico, inodoro, incoloro y parecido a la cera; su fórmula química condensada es $C_{18}H_{27}NO$. Fue aislado por primera vez en 1846 y su estructura química (**Figura 9**) se determinó en 1919. Hoy en día se conoce que esta molécula es muy irritante para los mamíferos ya que produce una fuerte sensación de ardor en la mucosa oral, por lo que es cuidadosamente utilizado en productos alimenticios, para hacerlos más picantes. La

capsaicina purificada, diluida 100.000 veces, sigue siendo tan activa que aún es capaz de producir ampollas en la lengua; además de estimular las secreciones gástricas, por lo que si se usa en exceso, ocasiona inflamación (Gómez y col., 1995; Legin, 1996).

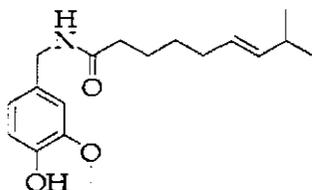


Figura 9. Estructura química de la capsaicina. Principal componente del chile.

La molécula de capsaicina se divide en tres regiones: un anillo aromático, un enlace amino y una cadena lateral hidrófoba (**Figura 10**). Las diferencias estructurales de los diferentes capsaicinoides dependen del número de carbonos que presente la cadena lateral hidrófoba, que va desde nueve hasta once carbonos de longitud, con un número variable de dobles enlaces situados en diferentes posiciones a lo largo de la cadena (Reyes y col., 2011).

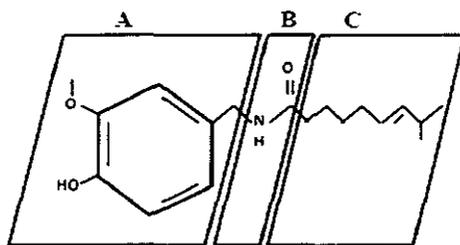


Figura 10. Regiones de la molécula de capsaicina. A) Anillo aromático. B) Enlace amino. C) Cadena lateral hidrófoba (Reyes y col., 2011).

2.7.1.4 Derivados/análogos de la capsaicina

Los derivados de la capsaicina son compuestos que se obtienen a través de una o varias modificaciones estructurales de la capsaicina mediante síntesis química o enzimática, lo que puede aumentar o disminuir su pungencia. La síntesis química de

estos análogos, ha sido motivada para la búsqueda de moléculas aisladas de la capsaicina natural, que puedan actuar como sustitutos picantes, fármacos y otras sustancias útiles que sean medianamente o nada pungentes para el humano (Wang y col., 2009; Wang y col., 2011).

2.7.2 La capsaicina y su importancia en la medicina

La capsaicina es y ha sido objeto de estudio de gran interés en todo el mundo. En los últimos años se han publicado alrededor de 3.900 artículos de investigación clínica, en los cuales se describen los múltiples efectos que este compuesto tiene. Algunos de estos trabajos se muestran a continuación.

- **Szallasi y Blumberg (1999)**, fueron los primeros en demostrar que la capsaicina provoca su acción ardiente mediante la activación del canal catiónico TRPV1 que se expresa sobre las terminaciones nerviosas sensoriales (Szallasi y Blumberg, 1999; Cioffi, 2007).
- **Haanpaa y Treede (2012)**, reportan todos los estudios que se llevaron a cabo para demostrar que la capsaicina, al actuar sobre el sistema nervioso logra un efecto analgésico, ya que reduce la sustancia P, un péptido que lleva los mensajes de dolor desde las terminaciones nerviosas de la piel hasta el sistema nervioso central. Estos resultados fueron muy prometedores y llevaron a estimular el uso de la capsaicina como analgésico para el tratamiento del dolor en afecciones como la artritis reumatoide, dolor muscular, lumbalgia y neuropatía diabética (Wong y Gavva, 2008; Haanpaa y Treede, 2012).

Actualmente las investigaciones se enfocan hacia el efecto antiobesidad de este compuesto y diversos estudios han reportado resultados interesantes al respecto.

- **Kang y colaboradores (2010)**, demostraron que la dieta suplementada con capsaicina en murinos obesos resulta en la disminución de peso causado por trastornos metabólicos como la resistencia a la insulina y esteatosis hepática. Estos efectos están relacionados con la estimulación de la expresión de genes como PPAR γ y la activación del canal TRPV1.

- **Joo y colaboradores (2010)**, evidenciaron que la aplicación de un tratamiento de capsaicina en ratas con una dieta alta en grasas, regula la adipogénesis y disminuye el peso corporal en un 8 %, además de disminuir significativamente el peso del tejido adiposo blanco.
- **Lee y colaboradores (2010)**, reportaron que la capsaicina ejerce una acción lipolítica en células adiposas de ratón 3T3-L1, por el incremento de la hidrólisis de triglicéridos en los adipocitos, la cual es regulada por la expresión de múltiples genes que están involucrados en las vías catabólicas de los lípidos, como lo son PPAR γ y HSL.

2.7.3 Mecanismos de acción de la capsaicina

Hasta el momento no se ha descubierto el mecanismo por el cual la capsaicina ejerce su efecto antiobesidad, sin embargo, estudios recientes han descrito dos posibles modelos:

2.7.3.1 Receptor TRPV1

El receptor de la capsaicina es conocido como VR (Receptor Vanilloide subtipo 1), el cual es un canal de intercambio catiónico, no selectivo, con alta permeabilidad al calcio, que se localiza en las membranas plasmáticas de varias células, entre ellas los adipocitos. Este receptor forma parte de la familia de canales iónicos que son llamados canales con potencial transitorio de receptor tipo 1 (TRPV1), los cuales pueden ser estimulados por calor o por estímulos químicos, como la capsaicina y la resiniferatoxina, productos de la clase vanilloide.

El primer modelo descrito por Zhang y colaboradores (2007), indica que la capsaicina induce la activación de TRPV1 en los preadipocitos e inhibe la adipogénesis y la obesidad. En éste, se propone que la unión de la capsaicina al receptor VR de la membrana celular de los adipocitos, activa el canal TRPV1 para desencadenar el incremento de calcio citosólico. La acumulación de calcio libre en el citosol podría activar a la enzima Calcineurina, la cual podría desencadenar alguna vía de señalización intracelular que condujera a la inhibición de importantes factores de transcripción pro-adipogénicos como PPAR γ y C/EBP α (Zhang y col., 2007) (Figura 11).

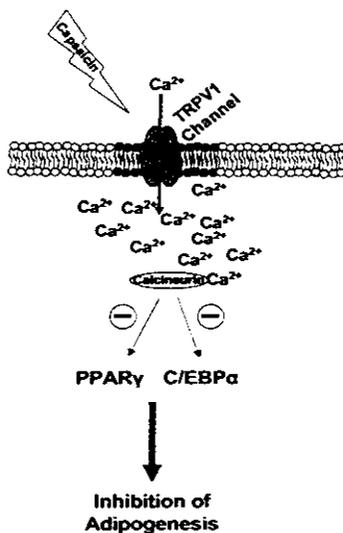


Figura 11. Mecanismo de acción de la capsaicina propuesto por Zhang y col. en el 2007. La imagen fue tomada de Cioffi, 2007.

2.7.3.2 Vía de la caspasa-3

La capsasa-3 es un tipo de enzima miembro de la familia de las caspasas que al activarse, dirige a las células hacia la apoptosis (muerte celular programada). Además, se ha comprobado que la activación de esta enzima, provoca la escisión de una gran cantidad de proteínas celulares clave, una de las cuales es la proteína PPAR- γ (Porter y Janicke, 1999). En este sentido, se ha demostrado que la capsaicina estimula la expresión de la caspasa-3 en una manera dosis-dependiente, que conlleva a la escisión de PPAR- γ . La proteína PPAR- γ se encuentra presente en gran cantidad en los preadipocitos y es esencial para que la adipogénesis se lleve a cabo; por lo que la escisión de esta proteína provocaría su inactivación, y por consiguiente, la inhibición de la adipogénesis (Hsu y Yen, 2007).

3

JUSTIFICACIÓN

La obesidad es el trastorno metabólico más frecuente y uno de los mayores desafíos de Salud Pública a nivel mundial, considerada una enfermedad debido a que disminuye la longevidad, la calidad de vida y la productividad económica de las personas que la padecen, sobre todo en los casos de obesidad mórbida. México como otros países en vías de desarrollo, experimenta una transición epidemiológica y nutricional, ya que el porcentaje de personas obesas se ha incrementado drásticamente en los últimos años, si se compara con un pasado de menor disponibilidad de alimento y una mayor demanda de actividad física cotidiana, cuando sólo el 10 % de los individuos padecían obesidad. Actualmente México ocupa el segundo lugar en obesidad en adultos y el primer lugar en obesidad infantil a nivel mundial (OMS, 2012), y la mayor parte de las estrategias para su manejo y control se enfocan en fomentar la actividad física e informar a la población sobre una dieta correcta que disminuya el consumo de azúcares y grasas. Sin embargo estas medidas no siempre son bien aprovechadas o simplemente no se cumple con el seguimiento adecuado, ya que es muy difícil la modificación del estilo de vida de una persona.

Un método para favorecer la pérdida de peso en pacientes con obesidad es el tratamiento farmacológico; actualmente existen muy pocos fármacos que ayudan a disminuir de peso y calmar la saciedad, es por eso que es de suma importancia la búsqueda de nuevas moléculas que aporten un efecto benéfico a las personas que padecen esta enfermedad, ya que a pesar de todo aún no existe un fármaco que pueda ser considerado como un tratamiento eficaz y sobre todo mantener el efecto a largo plazo. La capsaicina es una molécula natural ampliamente estudiada y su introducción en la farmacología científica es reciente, ya que ha tenido resultados positivos, sobre todo como analgésico, y más recientemente se ha demostrado un

efecto en la inhibición de la lipogénesis y adipogénesis en los adipocitos, sin embargo, debido a su alta pungencia, dificulta su uso farmacológico para el tratamiento para la obesidad. Actualmente la modificación química de este tipo de moléculas ha tenido gran impacto, ya que se generan moléculas derivadas de la original con nuevas propiedades: en el caso de la capsaicina, se generan compuestos derivados medianamente o nada pungentes. Por tanto, es de suma importancia comprobar si los derivados de la capsaicina menos pungentes, como olvanil y VAMC8 mantienen el efecto de la propia capsaicina, ya que de ser así, podrían ser utilizados como posibles fármacos naturales para favorecer la disminución de peso y mejorar la calidad de vida de las personas que padecen obesidad.

4

HIPÓTESIS

Los derivados de la capsaicina inhiben el proceso de lipogénesis en cultivo de adipocitos 3T3-L1 independientemente del nivel de pungencia.

5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar *in vitro* si la capacidad de inhibición de la lipogénesis de la capsaicina y sus derivados se relaciona con su nivel de pungencia.

5.2 Objetivos particulares

- 1.- Obtener adipocitos maduros a partir de preadipocitos 3T3-L1 y establecer la dosis de los derivados de la capsaicina sobre la lipogénesis.
- 2.- Determinar *in vitro* la viabilidad celular en los cultivos de adipocitos estimulados con los compuestos a diferentes concentraciones.
- 3.- Evaluar el efecto de cada compuesto sobre el proceso de lipogénesis en los cultivos de adipocitos.
- 4.- Cuantificar el contenido de lípidos totales, triglicéridos intracelular y glicerol libre en las muestras con tratamiento y las muestras control.

6

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo y propagación de las células 3T3-L1

La línea de fibroblastos 3T3-L1 se adquirió de la ATCC No. de Cat. CL-173. Las células se sembraron en frascos de cultivo con medio DMEM 1x (DMEM SIGMA No. de Cat. D6429, suero de Ternera al 10 % HYCLONE No. de Cat. SH30073, 1 % Penicilina/Estreptomicina GIBCO No. de Cat. 10378 y 2 % Solución Hepes SIGMA No. de Cat. H3537). El cultivo se incubó a una temperatura constante de 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %, y se cambió medio cada 78 h. Cuando el cultivo llegó a una confluencia entre el 70-80 %, las células se desprendieron con Tripsina-EDTA al 0.5% (GIBCO No. de Cat. 25 300-054) y se resembraron en placas de cultivo de doce y 24 pocillos según el experimento correspondiente.

Las células se criopreservaron con medio DMEM 1x, 5 % DMSO y se almacenaron en un contenedor con nitrógeno líquido.

6.2 Diferenciación *in vitro* de las células 3T3-L1

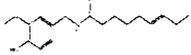
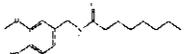
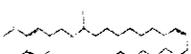
Se sembraron 4.000 células 3T3-L1 por pozo en placas de doce pocillos y 2.000 en placas de 24 pocillos. Se mantuvieron en medio DMEM 1x hasta que alcanzaron 100 % de confluencia. 2 días después (Día 0) se cambió el medio utilizando el medio de diferenciación 1 (DMEM 1x, 10 % Suero Fetal Bovino (SFB), 3-isobutil -1-metilxantina 0.5 mM, dexametasona 0.25 µM, insulina 5 µg/mL). 3 días después (Día 3) se cambió nuevamente el medio con el medio de diferenciación 2 (DMEM 1x, 10 % SFB, insulina 5 µg/mL). A partir del día cinco, se cambió medio cada dos días. Las células se consideraron totalmente diferenciadas y con fenotipo de adipocito maduro a partir del día 9 (Green y Kehinde, 1975; Tang y Lane, 2012).

6.3 Preparación de las moléculas de estudio

Los compuestos que se utilizaron para este estudio fueron: VAMC8, olvanil y capsaicina (**Cuadro 5**), se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso.

Los cultivos de adipocitos se estimularon al día nueve de diferenciación a las concentraciones de 50, 100 y 200 μM de cada molécula con un tiempo de exposición de 48 h (Hsu y Yen, 2007). Todos los tratamientos se hicieron por triplicado, incluyendo una muestra sin ningún tratamiento como control negativo y una muestra con DMSO al 2 % para descartar posible interferencia con los resultados obtenidos.

Cuadro 5. Características y propiedades de la capsaicina y derivados sintetizados de capsaicina.

Compuesto (Nombre común)	Fórmula (PM) [Pureza]	Estructura	Propiedades
8-metil-N-vanilil-6-nonamida (Capsaicina)	$\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ (305.41 g/mol) [95% TLC]		Compuesto pungente, 15×10^6 unidades Scoville; polvo blanco sólido.
N-vanililoctanoamida (VAMC8)	$\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_3$ (279.37 g/mol) [95% TLC]		Compuesto con pungencia de 0.7 relativa a la capsaicina en unidades Scoville; Aceite ámbar.
N-vanililoleamida (Olvanil)	$\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{NO}_3$ (417.6 g/mol) [95% TLC]		Compuesto no pungente, polvo blanco sólido.

6.4 Evaluación biológica de las muestras

6.4.1 Determinación del porcentaje de viabilidad celular por el método de MTT

La diferenciación celular se realizó en placas de 24 pocillos. La determinación *in vitro* del porcentaje de células viables se llevó a cabo por el sistema 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2.5 bromuro difeniltetrazolio (MTT), para lo cual se utilizó un Kit (SIGMA No. de Cat. TOX1-1KT), el cual mide la actividad de las células vivas a través de las deshidrogenasas mitocondriales. Las deshidrogenasas mitocondriales de células viables se unen a un anillo de tetrazolio, produciendo cristales púrpuras de

formazán. Los cristales se disuelven en isopropanol y la solución púrpura resultante se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570 nm. Se midió también la absorbancia de fondo de la placa de 96 pocillos a 690 nm y se restó de la medición de 570 nm, para finalmente calcular la viabilidad celular de cada muestra, comparando la absorbancia de las mismas con la del control negativo, el cual corresponde a las células sin tratamiento.

6.4.2 Determinación del contenido de lípidos totales mediante la tinción de Rojo Oleoso

La diferenciación celular se realizó en placas de doce pocillos. Una vez pasadas las 48 h de exposición a las moléculas, las células se fijaron con solución de formaldehído al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente y se lavaron con isopropanol al 60 %. Posteriormente, se les adicionó solución de Rojo Oleoso (SIGMA No de Cat. 09755; 5 mg/mL de isopropanol) por 20 min. Por último, la placa se lavó dos veces con solución salina y se observaron al microscopio para su registro fotográfico. La extracción del colorante rojo se realizó con isopropanol al 60 % (2 mL por pocillo) y se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 520 nm. El contenido de lípidos totales se expresa por medio del cociente de la absorbancia de la muestra sobre el blanco multiplicado por cien, para obtener el porcentaje de lípidos presentes en cada muestra.

6.4.3 Cuantificación del contenido de Triglicéridos intracelular

La diferenciación de las células 3T3-L1 se llevó a cabo en placas de doce pocillos. Una vez estimuladas las células, se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se colectó en microtubos Eppendorf® de 1.5 mL. Se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Después se adicionó 1 mL de solución de Tritón X-100 al 5 % en agua destilada a cada pocillo y se desprendieron todas las células. Una vez que se tenían las células lisadas, se colectaron en microtubos y se calentaron a 80-100 °C para obtener todo el triglicérido posible. Las muestras se centrifugaron a 2.500 rpm a 22 °C por 5 min, y se hicieron diluciones 1:20 con agua destilada de todas las muestras. Una vez listas las diluciones de las muestras, se llevó a cabo el ensayo de acuerdo al manual de instrucciones que provee el kit.

Para esta prueba se utilizó el kit cuantificación de triglicéridos ABCAM® (No. de Cat. ab65336), en el cual los triglicéridos son convertidos en ácidos grasos y glicerol al momento de adicionar la enzima lipasa. Los reactivos incluidos en este kit, están diseñados para que el glicerol sea oxidado y reaccione con un reactivo que genera color. dicha reacción se cuantificó a 570 nm en el espectrofotómetro. La concentración de triglicéridos se expresa en nmol/ μ L.

6.4.4 Cuantificación del contenido de Glicerol libre

Para este ensayo se utilizó el sobrenadante de cada pocillo que se colectó con anterioridad para cuantificar el glicerol que las células liberaron al medio. De igual manera, se hicieron diluciones 1:20 de cada muestra con agua destilada. Para este ensayo, se utilizó el kit de cuantificación de glicerol ABCAM® (No. de Cat. Ab65337), en el cual el glicerol es enzimáticamente oxidado para reaccionar con un reactivo que genera color, la reacción se cuantificó a 570 nm en el espectrofotómetro. Todo el procedimiento del ensayo se llevó a cabo de acuerdo al manual de instrucciones que provee el kit. La concentración de glicerol se expresa en nmol/ μ L.

6.4.5 Análisis de datos

Todos los datos se presentan como promedio \pm desviación estándar. Los resultados de las pruebas se analizaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía mediante el paquete estadístico GraphPad Prism®, considerando un valor de $p \leq 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa. Cuando las diferencias significativas fueron $p < 0.05$, se determinaron con la prueba estadística de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer.

7

RESULTADOS**7.1 Establecimiento y diferenciación de las células 3T3-L1**

Se obtuvieron adipocitos maduros a partir de un cultivo de preadipocitos. Los adipocitos 3T3-L1 son considerados maduros a partir del día 8 de diferenciación *in vitro*, ya que es posible observar los cambios secuenciales en su morfología, que va de un fibroblasto con múltiples prolongaciones membranales (**Figura 12**), hasta convertirse en un adipocito con todas sus características distintivas.

Entre las características más evidentes se distinguen su forma redonda debido a que las prolongaciones se contraen y en su citoplasma se observa la acumulación de triglicéridos almacenados en vesículas, así como el incremento en el tamaño del adipocito conforme la célula madura (**Figura 13**).

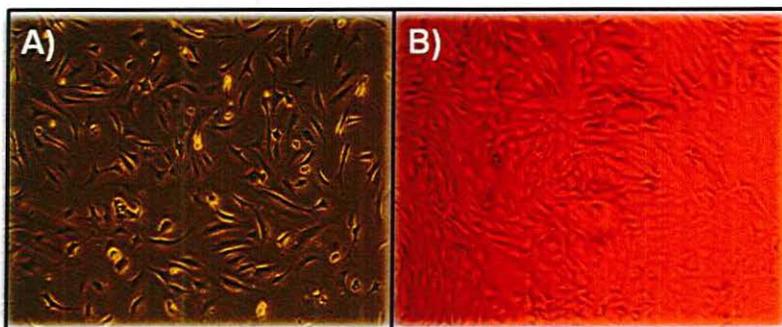


Figura 12. Fibroblastos 3T3-L1 en fase exponencial de crecimiento. Fotografías tomadas durante la proliferación celular en medio de crecimiento (DMEM 1x). a) El cultivo de preadipocitos tiene un 70 % de confluencia. b) Se observa un 100 % de confluencia en el cultivo. Ampliación 10x.

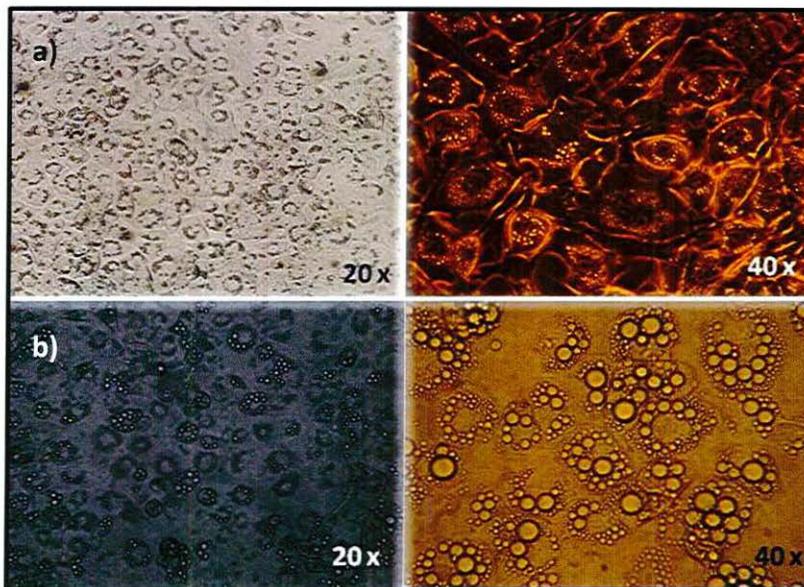


Figura 13. Caracterización morfológica de adipocitos 3T3-L1 durante la diferenciación *in vitro*. a) adipocitos al día 5 de diferenciación, se aprecia que las células comienzan a contraerse y acumulan triglicéridos (gotitas de grasa). b) adipocitos al día 8 de diferenciación, las células aumentan de tamaño, así como la cantidad de triglicéridos almacenados. Es posible observar claramente las vesículas de triglicéridos de mayor tamaño en el citoplasma. Se muestran imágenes en dos ampliaciones: 20x y 40x.

7.2 Efecto de las moléculas sobre la viabilidad celular

Una vez que se obtuvo el cultivo de adipocitos maduros, al día nueve de diferenciación, las células se estimularon con diferentes concentraciones de cada compuesto (50, 100 y 200 μM) y mantuvieron en incubación por 48 h. Este experimento se llevó a cabo para evaluar la citotoxicidad de las moléculas en estudio, la cual se determinó mediante el método MTT. Las tres moléculas en estudio disminuyeron significativamente el porcentaje de células viables en una manera dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración menor número de células viables, respecto al grupo control (**Figura 14**). Sin embargo, se observó un mayor efecto citotóxico con el estímulo por capsaicina en las tres concentraciones, que disminuyó la viabilidad celular hasta en un 30 % en la concentración mas alta de 200 μM . En tanto que, el olvanil y el VAMC8 disminuyeron también en alrededor del 20% en la misma concentración.

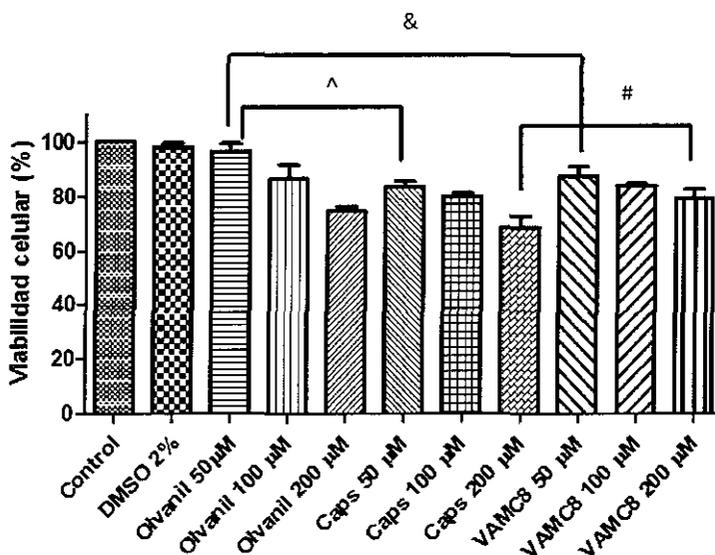


Figura 14. Efecto citotóxico de olvanil, VAMC8 y capsaicina sobre el porcentaje de viabilidad celular en adipocitos 3T3-L1. Las células fueron tratadas con 0 (Control), 50, 100 y 200 μM de los compuestos, e incubadas por 48 h. Se incluyó un control vehículo que contenía la solución de DMSO al 2%. La citotoxicidad de los análogos de capsaicina fue dependiente de la concentración. Los datos se muestran en media \pm DE (triplicados).

7.3 Tinción de las vesículas lipídicas de los adipocitos 3T3-L1. Contenido de lípidos totales acumulados en las células

Una vez que los adipocitos fueron estimulados por 48 h, los cultivos fueron fijados y teñidos con una solución saturada de rojo oleoso, el cual se une específicamente a triglicéridos (Figura 15). Se determinó el porcentaje de lípidos totales presentes en las células de cada tratamiento. Existe una disminución en el porcentaje de colorante cuantificado (Figura 16), y por tanto, en la acumulación de triglicéridos en el citoplasma con 100 y 200 μM de los tres compuestos, sin embargo se observa una mayor disminución de triglicéridos en las células tratadas con capsaicina, la cual es dependiente de la concentración.

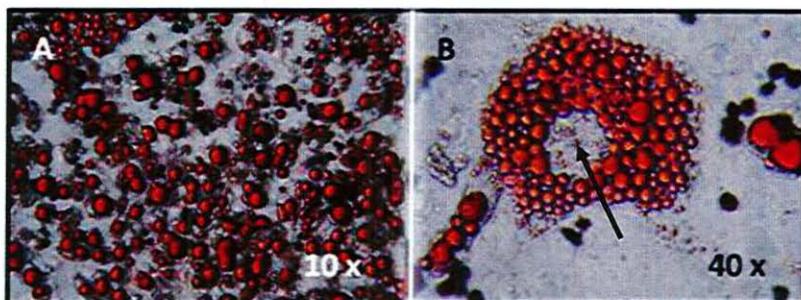


Figura 15. Tinción intracelular de lípidos. Adipocitos teñidos en cultivo *in vitro* al día 8 de diferenciación. a) se observan grandes cantidades de triglicéridos empaquetados en el citoplasma (gotas teñidas de rojo). b) fotografía en la que se observa claramente el núcleo desplazado hacia la periferia y gotas de triglicéridos distribuidos en todo el citoplasma. Todas las imágenes fueron tomadas después de ser teñidas. Ampliación: 10 x y 40 x.

CUANTIFICACIÓN DE COLORANTE EXTRAÍDO DEL INTERIOR DE LAS CÉLULAS

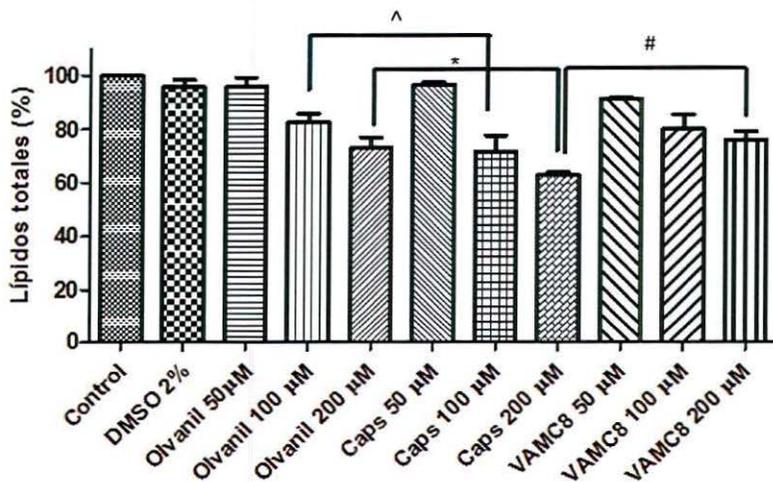


Figura 16. Cuantificación de la acumulación de triglicéridos en los adipocitos tratados con olvanil, capsaicina y VAMC8 a diferentes concentraciones. Los tres tratamientos disminuyeron la acumulación de triglicéridos de manera dependiente de la concentración. Las tres moléculas mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, sin embargo, el mayor efecto se observa con capsaicina a 200 µM, que disminuyó hasta en un 35 % los triglicéridos acumulados. Los datos se muestran en media \pm DE (triplicados).

7.4 Efecto de las moléculas sobre la acumulación de triglicéridos en adipocitos 3T3-L1

La **Figura 17**, muestra el efecto de los tres compuestos, capsaicina, olvanil y VAMC8, en la inhibición del contenido de triglicéridos intracelular acumulados en los adipocitos. Los resultados demuestran que la inhibición ocurre en una manera dependiente de dosis cuando las células son expuestas a las moléculas a las concentraciones de 0-200 μM . Nuevamente, el mayor efecto se observa en el tratamiento con capsaicina, disminuyendo el contenido de triglicéridos hasta en un 50 % con respecto al grupo control, ya que el promedio del contenido de triglicéridos en las células sin tratamiento (control) fue de 4.20 nmol, mientras que el del tratamiento con capsaicina a 200 μM fue de 2.12 nmol de triglicéridos.

Por otro lado, los tratamientos con olvanil y VAMC8, mostraron también grandes diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, lo que significa que ambas moléculas también disminuyen, aunque en menor grado, la cantidad de triglicéridos acumulados en los adipocitos.

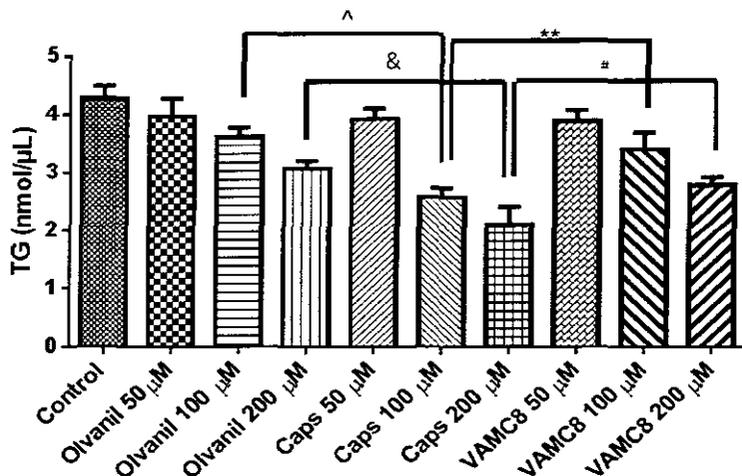


Figura 17. Efecto de olvanil, VAMC8 y capsaicina en la inhibición del contenido de triglicéridos intracelular en adipocitos 3T3-L1. Se observa claramente que la disminución de triglicéridos acumulados en las células, es dependiente de la concentración de las moléculas. Dicho efecto se comienza a observar a una concentración de 100 μM y aumenta en los tres casos a una concentración de 200 μM . Los datos se muestran en media \pm DE (triplicados).

7.5 Efecto lipolítico de las moléculas en los adipocitos 3T3

Se examinó el efecto lipolítico de olvanil, capsaicina y VAMC8 midiendo la liberación de glicerol en el medio. Para este experimento, se colectó el sobrenadante de cada pozo de la placa y se hicieron diluciones 1:10 de cada muestra con agua destilada. La cantidad de glicerol en el medio incrementó de manera dependiente de dosis, a mayor concentración del compuesto, mayor glicerol liberado al medio (**Figura 18**). Los tres compuestos tuvieron un efecto significativo a una concentración de 200 μM con respecto al grupo control. El tratamiento con capsaicina incrementó el contenido de glicerol en el medio casi el doble con respecto al grupo control: en cuanto olvanil y capsaicina, ambas moléculas tuvieron un efecto similar una con otra y en menor grado con respecto a la capsaicina.

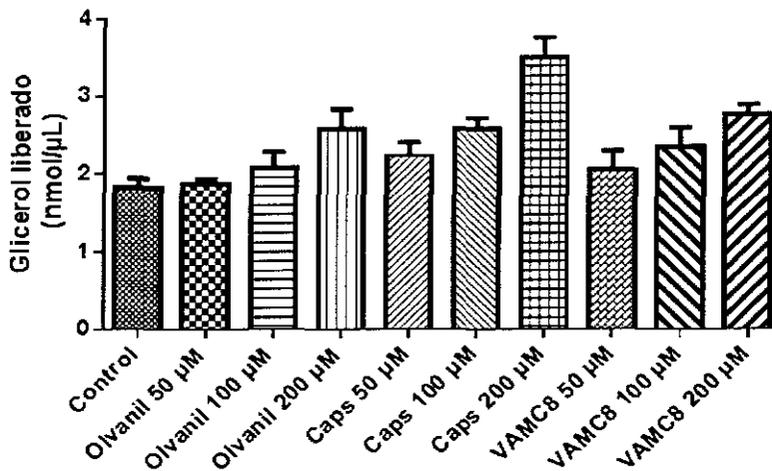


Figura 18. Efecto de olvanil, capsaicina y VAMC8 a diferentes concentraciones sobre el proceso de lipólisis. Los adipocitos fueron tratados por 48 h con 50, 100 y 200 μM de los tres compuestos, y un grupo control sin estímulo. Se observa que el efecto es dependiente de la concentración. El tratamiento con las tres moléculas resultó en un incremento significativo en la cantidad de glicerol liberado al medio, lo cual nos indica que hubo una estimulación de la lipólisis. Los datos se muestran en media \pm DE (triplicados).

8

DISCUSIÓN

En los últimos años, la obesidad se ha convertido en una epidemia tanto en países desarrollados como en desarrollo, la cual es caracterizada por un incremento en el tejido adiposo, en donde los adipocitos juegan un papel central. La obesidad está asociada con altos riesgos a la salud para las personas que la padecen. Kennedy y colaboradores (2010), propusieron que disminuir la proliferación de preadipocitos, así como el proceso de lipogénesis en adipocitos son alternativas para contrarrestar la obesidad. En base a estos antecedentes, en este estudio se evaluó el efecto de dos derivados de capsaicina con menor grado de pungencia (olvanil y VAMC8) en la inhibición de la lipogénesis en adipocitos maduros 3T3-L1 y se comparó dicho efecto con el de la capsaicina, para finalmente demostrar si la pungencia de estos compuestos tiene relación con su actividad biológica en un modelo de obesidad.

8.1 Evaluación de la citotoxicidad de olvanil y VAMC8

La prueba de MTT es uno de los métodos utilizados para evaluar el daño que provocan ciertos compuestos a las células. En el presente estudio el mayor efecto se observó a la mayor concentración utilizada (200 μM): tanto olvanil como VAMC8 disminuyeron el porcentaje de células viables en adipocitos 3T3-L1, sin embargo, dicha citotoxicidad es menor si se compara con el de la capsaicina. Estos resultados concuerdan con el estudio de Hsu y Yen, quienes demostraron que un tratamiento con altas concentraciones de capsaicina, desde 50 a 250 μM , disminuyen hasta un 50 % de la población celular 3T3-L1 e inducen apoptosis en las células en las que se observa un incremento de la enzima capsasa-3 y la inhibición de la proteína PPAR – y que se desencadena cuando la molécula se une a su receptor TRVPI (Hsu y Yen, 2007). Los resultados demuestran que a pesar de que la capsaicina demostró ser más tóxica, un tratamiento con olvanil y VAMC8 también disminuye el número de células viables, lo cual representa un resultado positivo ya que ambas moléculas son menos pungentes.

8.2 Evaluación del efecto de las moléculas en la inhibición de la lipogénesis

Los datos obtenidos en la cuantificación de triglicéridos intracelular, comprobaron que la exposición de los adipocitos 3T3-L1 a determinada concentración de capsaicina generó una disminución significativa en el contenido de triglicéridos acumulados, concordando con los resultados reportados en trabajos anteriores (Lee y col., 2010). Nuevamente, se observó que tanto olvanil como VAMC8 tienen también un efecto de disminución de lípidos en los adipocitos, cuando estos se exponen por 48 h a partir de una concentración de 100 μ M. Si estos datos se comparan con el grupo control, la reducción de la cantidad de triglicéridos acumulados en los tres tratamientos es un indicador de una disminución de la lipogénesis, siendo mayor en el tratamiento con capsaicina. Lo anterior se puede deber a que, a nivel genético, PPAR γ , principal gen que regula el crecimiento y la diferenciación del adipocito mediante una cascada que controla la expresión de numerosos genes esenciales para la acumulación de lípidos, se encuentra inhibido debido a la unión de los compuestos a su receptor TRPV1, y por lo tanto, la célula se ve afectada en la acumulación normal de triglicéridos (Kersten, 2001; Evans y col., 2004).

8.3 Olvanil y VAMC8 promueven la lipólisis en adipocitos 3T3-L1

Se evaluó el efecto de las moléculas sobre el proceso de lipólisis, cuantificando el contenido de glicerol liberado al medio. Los resultados obtenidos demostraron que la disminución de la acumulación de triglicéridos que se observó en los adipocitos expuestos a las moléculas, se puede relacionar con el aumento de glicerol liberado al medio, es decir, que existe una estimulación de la lipólisis en los tres tratamientos, siendo mayor en el tratamiento con capsaicina, ya que el contenido de glicerol en el medio es el doble si se compara con los resultados del grupo control. Estos datos se ven reforzados con lo publicado por Lee y colaboradores (2011), que también logra ver un efecto estimulador de la capsaicina sobre la lipólisis en cultivos *in vitro* de adipocitos 3T3-L1, sin embargo, la concentración utilizada fue de 10 μ M, lo cual es menor que la utilizada en este estudio. Con estos resultados se pudo demostrar que la diferencia en la concentración de los triglicéridos en los diferentes grupos tratados con respecto al grupo control, pudiera ser por la estimulación por parte de las

moléculas, de la hidrólisis y liberación de glicerol al exterior; así como por la citotoxicidad de los compuestos que causó la muerte de un determinado número de células.

Una ventaja de una mayor estimulación de la lipólisis, es que los adipocitos reducirían su tamaño, y por consiguiente el tejido adiposo también, ya que parte de los triglicéridos acumulados en las células se hidrolizarían por acción de las lipasas con una liberación de glicerol y ácidos grasos libres al exterior, lo cual podría beneficiar a remover la grasa en algunas zonas específicas del cuerpo. Una desventaja de que esto suceda, es que se acumularían los ácidos grasos libres, los cuales al circular por el torrente sanguíneo aumentarían los niveles de triglicéridos en sangre pudiendo desencadenar graves consecuencias a la salud; sin embargo, si esta estimulación es combinada con ejercicio físico, gran parte de los ácidos grasos libres serían aprovechados por el tejido muscular y de esta manera se mantendría un equilibrio.

En resumen, en el presente trabajo se demostró que el tratamiento con olvanil y VAMC8 durante 48 h disminuye el proceso de lipogénesis, y aumenta la hidrólisis de lípidos en adipocitos maduros 3T3-L1. Aunque la capsaicina logra tener un mayor efecto tanto citotóxico como lipolítico, los resultados obtenidos en este trabajo comprueban que el nivel de pungencia no determina el grado de acción de estas moléculas, ya que olvanil a pesar de que es una molécula no pungente, tuvo un efecto parecido al de VAMC8, la cual es medianamente pungente. Esto, nos lleva a pensar que existe una parte en la estructura química de las moléculas, diferente a la responsable de estimular la sensación de pungencia, que es crucial para que éstas puedan unirse a su receptor y causar el efecto ya conocido, sin embargo faltan muchos estudios que ayuden a comprender mejor el mecanismo por el cual estas moléculas influyen sobre el metabolismo lipídico en el modelo estudiado (células 3T3-L1).

9

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró que existe una correlación entre la concentración de capsaicina y sus derivados (VAMC8 y olvanil), con el porcentaje de células 3T3-L1 viables, es decir, la citotoxicidad de las tres moléculas ocurre en una manera dosis-dependiente. Así mismo, se determinó que dicho efecto se aprecia a partir de una concentración de 100 μ M.

Un tratamiento con olvanil y VAMC8 a 100 μ M, reduce la acumulación de triglicéridos e incrementa la hidrólisis de lípidos en adipocitos 3T3-L1.

A pesar de que olvanil es una molécula sin pungencia, sí hubo un efecto significativo en la reducción de triglicéridos acumulados en las células 3T3-L1.

Los resultados indican que el efecto de disminución de triglicéridos intracelular que se observó, es una consecuencia de la estimulación de la hidrólisis de lípidos (lipólisis) que se desencadenó cuando las células fueron tratadas con las tres moléculas.

El efecto observado en el tratamiento con VAMC8 es muy similar al de olvanil, lo cual nos lleva a concluir que olvanil resulta ser una molécula de mayor interés científico y tecnológico, ya que muestra un efecto biológico sin tener un efecto pungente, a comparación de VAMC8, que a pesar de que tiene efectos biológicos significativos, es una molécula medianamente pungente comparada con capsaicina.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos llevan a concluir que el nivel de pungencia en dichas moléculas no influye totalmente en su efecto lipolítico, y pareciera ser que se trata de un efecto multifactorial. Sin embargo, aún faltan muchos estudios que ayuden a descubrir cuales otros factores influyen para que dichas moléculas tengan un efecto sobre el metabolismo de los adipocitos 3T3-L1.

10

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos a partir de los estudios presentados en esta tesis resultan relevantes y promisorios, sin embargo aún quedan cuestiones por resolver, entre las que se pueden mencionar:

- Probar el efecto de olvanil y VAMC8 en el proceso de adipogénesis, estimulando las células al inicio y durante de la diferenciación.
- Describir el mecanismo por la que estas moléculas logran un efecto sobre el metabolismo lipídico de los adipocitos, por ejemplo cuantificar el gen PPAR γ en los diferentes tratamientos y ver si este se encuentra inhibido en comparación con células tratadas.
- Estudiar los genes que participan en el proceso de lipólisis de los adipocitos y determinar si se encuentran sobre-expresados cuando las células 3T3-L1 se exponen a los diferentes análogos de la capsaicina.
- Probar otros compuestos análogos de la capsaicina con diferentes modificaciones estructurales y estudiar si el efecto se modifica, con el fin de describir la relación estructura- efecto biológico y poder realizar estudios *in vivo*.

REFERENCIAS

- Aguirre, J. P. (2012). El reto de la obesidad infantil en México. **Centro de Estudios Sociales y de Opinión Pública**. Versión preliminar. 133: 2-44.
- Al, Z. A., Y. B. Hadj, M. Abdelaty y A. Abdel (2011). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. **Molecules**. 16: 8919 -8929.
- Aleixandre, A. y M. Miguel (2008). Ratas Zucker como modelo experimental para el estudio de diferentes enfermedades. **Endocrinol Nutr**. 55(5): 217-222.
- Ayvaz, G. y A. R. Çimen (2011). Methods for body composition analysis in adults. **Open Obes J**. 3: 57-64.
- Barrera, A., A. Rodríguez y M. Molina (2013). Escenario actual de la obesidad en México. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**. 51(3): 292-299.
- Benavides, F. J. y J. L. Guénet (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Universidad de Alcalá. Henares.
- Bosland, W. y J. Votava (2000). Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. CABI publishing, New York, USA.
- Caballero, J. (2006). Tratamiento farmacológico de la obesidad. **Rev Pacña Med Fam**. 3(3): 26-32.
- Carmona, A. (2010). Modelos animales y experimentales de obesidad. 367-400. **En: Morales, J.A. Obesidad: Un enfoque multidisciplinario**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
- Chinn, M. S., R. Ratna, S. Shivappa y J. L. Cotter (2010). Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from Capsicum chinense. **Food Bioprod Process**. doi:10.1016/j.fbp.2010.08.003.
- Cioffi, D. L. (2007). The Skinny on TRPV1. **Circ Res**. 100: 934-936.
- Clavijo, M. A., D. Gómez y C. Gómez (2007). Adipogénesis in vitro de células 3T3-L1. **Rev Med**. 15(002): 170-176.
- Collins, M., L. Mayer y P. Bosland (1995). Improved method for quantifying capsaicinoids in Capsicum using High-performance Liquid Chromatography. **HortScience**. 30(1): 137-139.
- Díaz, E. (2010). Anatomía e histología del tejido adiposo. 27-31. **En: Morales, J. A. Obesidad: Un enfoque multidisciplinario**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
- Díaz, A. (2011). La Obesidad en México. **Fundación Este País**. 239: 61-64.

- Dolinoy, D. (2008). The Agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. **Nutr Rev.** 66(1): S7-S11.
- Esquivel, C., J. Esquivel, M. García, E. O. Madrigal y J. A. Morales (2010). Fisiología del tejido adiposo. 33- 40. **En: Morales, J. A. Obesidad: Un enfoque multidisciplinario.** Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
- Evans, R. M., G. D. Barish y Y. X. Wang (2004). PPARs and the complex journey to obesity. **Nat Med.** 10(4): 1-7.
- Freshney, R. I. (2005). Culture of Animal Cells: A manual of basic technique. John Wiley & Sons.
- Fonseca, M. H., J. Takada, M. I. Cardoso y F. B. Lima (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **J Pediatr.** 83(5): S192- 203.
- García, C. (2011). Los alimentos chatarra en México, regulación publicitaria y autorregulación. **Derecho a Comunicar.** 2: 171-195.
- Gerhold, D. L., F. Liu, G. Jiang, Z. Li, J. Xu, M. Lu, J. R. Sachs, A. Bagchi, A. Fridman, *et al.* (2002). Gene expression profile of Adipocyte Differentiation and its regulation by peroxisoma proliferator-activated receptor- γ agonists. **Endocrinology.** 143: 2106-2118.
- Gómez, A., J. C. Melucci, P. Ortega y E. Mandrile (1995). Capsaicina. **Acta Farm. Bonaerense.** 14(1): 63-70.
- González, J. (2002). Obesidad: problema de salud pública en México. **Rev. Nutr. Clín.** 5(4): 213- 218.
- González, D. R. (2010). Tratamiento quirúrgico del paciente con obesidad. 227- 237. **En: Morales, J.A. Obesidad: Un enfoque multidisciplinario.** Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
- Green, H. y O. Kehinde (1975). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. **Cell.** 1:113-116.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas y H. S. Sul (1998). Understanding Adipocyte Differentiation. **Phys Rev.** 78(3): 783-809.
- Guyton, A. C. y J. E. Hall (2006). Metabolismo de los Lípidos. 840-851. **En: Guyton, A. C., J. E. Hall. Tratado de Fisiología Médica.** Ed. Elsevier. España.
- Haanpaa, M. y R. Treede (2012). Capsaicin for Neuropathic Pain: Linking Traditional Medicine and Molecular Biology. **Eur Neurol.** 68: 264-275.
- Hsu C. L. y G. C. Yen (2007). Effects of Capsaicin on Induction of Apoptosis and Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. **J. Agric. Food Chem.** 55: 1730-1736.
- Joo, J., D. H. Kim, J. Chol y J. W. Yun (2010). Proteomic Analysis for Antiobesity Potential of Capsaicin on White Adipose Tissue in Rats Fed with a High Fat Diet. **J Proteome Res.** 9(6): 712-714.
- Kang, J., G. Tsuyoshi, I. Han, T. Kawada, Y. Kim y R. Yu (2010). Dietary Capsaicin reduces obesity-induced Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Obese Mice Fed a High-fat Diet. **Obesity.** 18: 780-787.

- Kennedy, A., K. Martínez, S. Schmidt, S. Mandrup, K. LaPoint y M. McIntosh (2010). Antiobesity Mechanisms of Action of Conjugated Linoleic Acid. **J Nutr Biochem.** 21(3): 171-179.
- Kersten, S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO reports.** 2(4): 282-286.
- Kim, K. H., Y. Park (2011). Food components with ant-obesity effect. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** 2: 237-57.
- Large, V., O. Peroni, D. Letexier, H. Ray y M. Beylot (2004). Metabolism of lipids in human white Adipocyte. **Diabetes Metab.** 30: 294-309.
- Lazo de la Vega, M. L. y C. Fernández (2010). Bases moleculares de la Obesidad. 101-123. **En: Morales, J. A. Obesidad: Un enfoque multidisciplinario.** Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
- Lee, M. S., C. T. Kim, I. H. Kim y Y. Kim (2011). Effects of Capsaicin on Lipid Catabolism in 3T3-L1 Adipocytes. **Phytother Res.** 25: 935-939.
- Legin, G. Y. (1996). Drugs. Capsaicin and its analogs: properties, preparation and applications (a review). **J Pharm Chem.** 30(1): 60-68.
- Lehninger, N. D. y M. M. Cox (2006). Principios de Bioquímica. Editorial Omega. Barcelona, España.
- Lépori, L. R. (2006). Miniatlas Obesidad. CLYNA. Buenos Aires, Argentina.
- López J. C. y L. T. González (2001). Enfermedades asociadas a la obesidad. **Rev Endocrinol Nutric.** 9: 77-85.
- López, G. O. (2003). Chilli: La especia del nuevo mundo. **Ciencia.** 069: 66-75.
- Martin, G. y S. Antón (2002). Tratamiento farmacológico de la obesidad. **Inf Ter Sist Nac Salud.** 26: 117-127.
- Martínez, J. A., M. J. Moreno, I. Marqués y A. Martí (2002). Causas de obesidad. **ANALES Sis San Navarra.** 25: 17-27.
- Moreno, M. J y J. A. Martínez (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. **ANALES Sis San Navarra.** 25(1): 29- 39.
- Ntambi, J. M. y Y. Cheul (2000). Adipocyte Differentiation and Gene Expression. **J Nutr.** 130: 3122S- 3126S.
- Nuez, F., R. Gil y J. Costa (2003). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Grupo Mundi-Prensa. Madrid, España.
- OECD, Health Data (2010). Obesity and overweight in OECD and non-OECD countries (adults).
- Olaiz, G., J. Rivera, T. Shamah, R. Rojas, S. Villalpando, M. Hernández y J. Sepúlveda (2006). Encuesta Nacional de salud y nutrición 2006. **INSP.** Cuernavaca, México.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2012). Obesidad y Sobrepeso. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>. (Revisado: 24 de febrero de 2012).

- Osuna, I., B. Hernández, J. C. Campuzano y J. Salmerón (2006). Índice de masa corporal y percepción de la imagen corporal en una población adulta mexicana: la precisión del autorreporte. **Salud Pública Mex.** 48: 94-103.
- Parra, J. A. (2010). Tratamiento farmacológico del paciente con obesidad. 219-225. En: Morales, J. A. **Obesidad: Un enfoque multidisciplinario**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
- Peng, B., J. Wang, Z. Peng, S. Zhou, F. Wang, Y. Ji, Z. Ye, X. Zhou, T. Lin y X. Zhang (2012). Studies on the synthesis, pungency and anti-biofouling performance of capsaicin analogues. **Sci China Chem.** 55(3): 435- 442.
- Pimienta, E. (2008). Desarrollo Vegetal. Universidad de Guadalajara. México.
- Pi-Sunyer, F. X. (2002). The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. **Obes Res.** 10 (2): 97S-104S.
- Porter, A. G., R. U. Janicke (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death Differ.** 6, 99-104.
- Quintero, M. S. (2013). Efecto de allin sobre la expresión y síntesis de citocinas proinflamatorias en adipocitos 3T3-L1. Tesis doctoral. Universidad de Guadalajara.
- Rayalam, S., M. A. Della y C. A. Baile (2008). Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. **J Nutr Biochem.** 19: 717-726.
- Reyes, M. P y E. O. Madrigal (2010). Beneficios del ejercicio en el tratamiento de la obesidad. 173- 185. En: Morales, J. A. **Obesidad: Un enfoque multidisciplinario**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
- Reyes, M. L., E. G. González y E. Vázquez (2011). Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. **Molecules.** 16: 1253-1270.
- Rodríguez, A., H. Kollmannsberger, J. Prohens, S. Nitz y A. Fita (2010). Comparative Analysis of Pungency and Pungency Active Compounds in Chile Peppers (*Capsicum* spp.). **Bulletin UASVM Horticulture.** 67(1): 270-273.
- Rosen, E. D. y O. A. MacDougald (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. **Nat Rev Mol Cell Bio.** 7: 885-896.
- Ruiz, N., F. Medina y M. Martínez (2011). El chile habanero: su origen y usos. **Ciencia.** 70-77.
- Sandoval, E. M. (2010). Obesidad: definición, clasificación, sintomatología y diagnóstico. 145-156. En: Morales, J. A. **Obesidad: Un enfoque multidisciplinario**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
- Sassi, F. (2010). Obesity and the Economics of Prevention: Fit not Fat. OECD Publishing. Disponible en: http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/obesity-and-the-economics-of-prevention_9789264084865-en.
- SIAP (2010). Un panorama del cultivo del chile. **Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.** pp 3-20.
- Strem, B., K. C. Hicok, M. Zhu, I. Wulur, Z. Alfonso, R. E. Schreiber, J. K. Fraser y M. H. Hedrick (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med.** 54(3): 132- 141.

- Szallasi, A. y P. Blumberg (1999). Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. **Pharmacol Rev.** 52(2): 159-211.
- Tang, Q. Q. y M. D. Lane (2012). Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. **Annu Rev. Biochem.** 81: 715- 736.
- Tapia, J. C., E. Escamilla y A. Bonilla (2008). Aislamiento de capsaicinoides directamente del fruto de Capsicum. **AFINIDAD LXV.** 536: 307-313.
- Tortora, G. B. y B. Derrickson (2006). Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial Médica Panamericana. pp 124-127.
- Trayhurn, P. (2007). Adipocyte biology. **Obes Rev** 8(1):41–44.
- Vázquez, F., M. L. Miranda, M. Monforte, G. Gutiérrez, C. Velázquez y Y. Nieto (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. **Rev Fitotec Mex.** 30(4): 353-360.
- Vidal - Puig, A. (2007). Methods in molecular biology. Adipose Tissue Protocols, Humana Press, Canada.
- Wang, B., F. Yang, Y. F. Shan, W. Qiu y J. Tang (2009). Highly efficient synthesis of capsaicin analogues by condensation of vanillylamine and acyl chlorides in a biphase H₂O/ CHCl₃ system. **Tetrahedron.** 65: 5409- 5412.
- Wang, J., Z. Peng, S. Zhou, J. Zhang, S. Zhang, X. Zhou, X. Zhang y B. Peng (2011). A study of Pungency of Capsaicinoid as Affected by their Molecular Structure Alteration. **Pharmacology & Pharmacy.** 2: 109-115.
- Weisell, R. C. (2002). Body mass index as an indicator of obesity. **Asia Pac J Clin Nutr.** 11(8): p. S681-684.
- Whitaker, R. C. C. Deeks, A. Baughcum y B. Specker (2000). The relationship of childhood adiposity to parent body mass index and eating behavior. **Obes Res.** 8(3): 234-240.
- Wong, G. Y. y N. R. Gavva (2008). Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. **Brain Res Rev.** 60: 267- 277.
- World Health Organization (2004). Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Yang, F. y B. Jarrett (2009). 3T3 Fibroblast Cell Line Care Manual. **OZ Lab.** 2-8.
- Zhang, L. L., D. Y. Liu, L. Q. Ma, Z. D. Luo, T. B. Cao, J. Zhong, Z. C. Yan, L. J. Wang, Z. G. Zhao, S. J. Zhu, M. Schrader, F. Thilo, Z. M. Zhu y M. Tepel (2007). Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. **Circ Res.** 100: 1063-1070.