

Efecto de la capsaicina en el metabolismo de células de hepatocarcinoma

Alicia C. Bort Bueno¹, María Cecilia Morell¹, Ágata Ramos Torres¹, Lorena Delgado Núñez¹, Inés Díaz-Laviada¹, Nieves Rodríguez Henche¹

¹ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen

Los fitoquímicos son compuestos presentes en los vegetales, que pueden ser beneficiosos para el ser humano. En los últimos años han ganado relevancia gracias a su poder terapéutico en el tratamiento de determinadas enfermedades humanas. Algunos poseen propiedades antitumorales como es el caso de la capsaicina (CAP), el agente responsable de las propiedades picantes de los pimientos. El objetivo de este trabajo ha sido valorar el efecto de la capsaicina sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de hígado HepG2 y su relación con el metabolismo celular. Los resultados obtenidos muestran que CAP disminuye la viabilidad celular en HepG2 de manera dosis dependiente, y regula negativamente la proteína AMPK, enzima reguladora del metabolismo, activando ACC. Los resultados obtenidos en los ensayos de tinción de lípidos neutros muestran que CAP produce un acúmulo, lo cual podría estar correlacionado con la activación de ACC y el aumento de expresión de PPAR γ .

Palabras clave: Cáncer de hígado (HepG2); Metabolismo; Capsaicina; AMPK; ACC; Lípidos neutros; PPAR γ .

Cita: Bort AC, Morell MC, Ramos A, Delgado L, Díaz-Laviada I, Rodríguez-Henche N (2014) Efecto de la capsaicina en el metabolismo de células de hepatocarcinoma. *Dianas* 3(1): e20140909. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140909 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 18 de junio de 2014

Copyright: © 2014 Alicia C. Bort Bueno et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: alicia.bort@edu.uah.es



Introducción

El hígado es el órgano de mayor tamaño de la cavidad abdominal que desempeña funciones muy importantes para mantener la homeostasis del organismo. Su actividad metabólica, relacionada con la síntesis de proteínas plasmáticas, el almacenamiento de glucógeno y de vitaminas, metabolismo de los nutrientes procedentes de la dieta, entre otras, le convierte en un reservorio metabólico y de almacenamiento. Además, protege el organismo de agentes perjudiciales mediante una gran variedad de procesos de desintoxicación. Es considerado una glándula mixta al tener tanto carácter endocrino como exocrino. El cáncer de hígado o carcinoma hepatocelular es un cáncer de alta incidencia dentro de los cánceres primarios hepáticos y el sexto tipo de cáncer más frecuente [1-2]. Se trata de un cáncer asintomático en sus estadios iniciales, lo cual provoca que se diagnostique en estados intermedios o tardíos en los que los tratamientos disponibles no son tan eficaces y el principal tratamiento es la cirugía. Esto ha generado la necesidad de buscar marcadores identificadores de los estadios tempranos de la enfermedad, y de realizar estudios que amplíen el conocimiento a nivel celular y molecular, al existir multitud de fenómenos que pueden estar alterados y pueden ser nuevas dianas terapéuticas para la enfermedad [3].

Capsaicina

El interés actual por los productos naturales se fundamenta en el papel regulador que juegan en diferentes respuestas celulares, utilizándose como fármacos terapéuticos en distintas patologías. Dentro de estos productos naturales destaca la capsaicina (CAP, 8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) responsable de las propiedades picantes de los pimientos. Este compuesto pertenece a la familia química de los vanilloides, ya que presenta un grupo metoxifenol en su estructura, Figura 1. Resultados previos en nuestro laboratorio indican que la capsaicina suprime el crecimiento de células de carcinoma de próstata humano in vitro e in vivo [4-6] y otros laboratorios han demostrado que la capsaicina tiene efecto antitumoral en el cáncer de hígado [7].

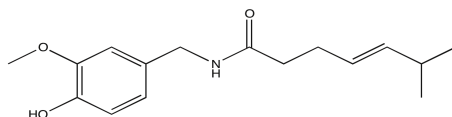


Figura 1.- Estructura química de la capsaicina.

Enzimas relacionadas con el metabolismo

La adenosín monofosfato quinasa (AMPK) es una serín-treonín quinasa formada por tres subunidades: una catalítica (α) y dos reguladoras (β y γ) que actúa como sensor de la energía celular, activándose cuando los niveles de energía bajan. Se activa alostéricamente por AMP (adenosín monofosfato) que se une a la subunidad γ y permite la fosforilación de la subunidad α . Una vez que AMPK está activa, estimula procesos catabólicos que generan ATP (adenosín trifosfato) e inhibe procesos anabólicos, favoreciendo se obtiene energía para la supervivencia de la célula. Esto hace que tenga un papel importante en procesos tumorales, incluso se ha propuesto como diana de diferentes productos naturales con efectos en enfermedades metabólicas y en cáncer [8-10]. Una de las rutas regulada por AMPK es la síntesis de lípidos. La acetil CoA carboxilasa (ACC), enzima reguladora de la síntesis de lípidos, es sustrato directo de AMPK. Cuando ACC está desfosforilada se encuentra activa y participa en la síntesis de lípidos y detiene la oxidación de ácidos grasos a través de malonil-CoA. La acumulación de lípidos en las células hepáticas, puede producir muerte por lipotoxicidad [11] hecho que podría estar relacionado con la actividad de ACC.

La familia PPAR son receptores nucleares que están compuestos por tres proteínas: PPAR α , PPAR δ (β), y PPAR γ . Se localizan en distintos tejidos, poseen distintas funciones y ligandos. PPAR α se encuentra principalmente en hígado entre otros tejidos y es importante en la captación y oxidación de ácidos grasos y en el metabolismo de lipoproteínas. PPAR δ (β) se encuentra en muchos tejidos y tiene un papel importante en el metabolismo de ácidos grasos. PPAR γ , se localiza en tejido adiposo y es fundamental para la diferenciación de adipocitos [12]. Al ser proteínas tan relacionadas con el metabolismo lipídico es interesante observar su expresión y como las afecta el tratamiento con capsaicina [13-14].

Resultados previos de nuestro laboratorio con la capsaicina sugieren que tiene un efecto antitumoral, por ello, teniendo en cuenta los antecedentes descritos, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la capsaicina en células tumorales de hígado centrándonos en el análisis de la expresión y actividad de estas proteínas y analizar su efecto en el metabolismo lipídico.

Materiales y métodos

Materiales empleados en cultivos celulares

Los materiales empleados en la realización de cultivos celulares fueron los siguientes: placas y frascos de cultivo, de dos marcas comerciales: Falcon® Becton Dickinson Labware (New Jersey, USA) y Nunc™ Brand Products (Roskilde, Dinamarca). Medio DMEM estéril de la casa comercial Lonza Group Ltd (Basilea, Suiza), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) también de Sigma (St. Louis, MO, USA) y 1% de solución de antibiótico (penicilina G 100 UI/ml, sulfato de estreptomycin 100 μ g/ml y anfotericina B 0,25 μ g/ml) de Sigma (St. Louis, MO, USA). Solución de tripsina de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA). La capsaicina (CAP) es de TOCRIS (Bristol, UK) y el ácido oleico (OA), la albumina de suero bovino (BSA) y el oil red O de Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular tumoral epitelial de hígado humana HepG2 (ATCC N° BH-8065) obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA). Es una línea celular que proviene de un varón caucásico de 15 años de edad. La línea celular se descongela en países bajos, y se mantiene hasta un máximo de 25 pases. Las células se cultivaron de manera rutinaria en frascos de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de solución de antibiótico, a 37°C en un ambiente húmedo y con un 5% de CO₂. El medio se cambiaba cada cuatro días y cuando las células llegaban a un 70 % de confluencia, se les añadía tripsina/EDTA para levantarlas y se recogían con medio para volver a sembrar.

Para los tratamientos con capsaicina, las células se sembraron a una densidad de 40.000 células/cm², se dejaron en adherencia durante 24 horas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS y 1% de solución de antibiótico. Transcurrido ese tiempo, el medio se reemplazó por otro suplementado con 0,5% de FBS y 1% de solución de antibiótico, se añadió la capsaicina y las células se mantuvieron en cultivo durante 20 ó 48 horas. En los experimentos en los que se indujo la acumulación de lípidos con ácido oleico (OA), las células se pre-incubaron con capsaicina durante 30 min y, además, el medio de cultivo se suplementó con BSA al 0,25%.

Medida de la viabilidad celular mediante MTT

La viabilidad celular se determinó mediante un método colorimétrico que consiste en analizar la actividad metabólica de las células valorando su capacidad para reducir la sal de tetrazolio MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol) de Sigma (St. Louis, MO, USA), a un complejo formazán de color morado producido por las deshidrogenasas mitocondriales en las células vivas.

Después de los tratamientos, las células se incubaron con 100 μ L de MTT durante 1 h a 37°C, tiempo en el que, si la célula es viable, aparece un precipitado de color morado que corresponde a la formación de cristales de formazán. Posteriormente, este precipitado se solubilizó con isopropanol 800 μ L; se agitaron suavemente las placas para obtener una coloración homogénea y se midió la absorbancia a 570 nm con un espectrofotómetro de placas (ELX 800 Bio-TekIntruments, INC). Para determinar la viabilidad, se comparó la absorbancia de los distintos tratamientos con la observada en las células control, dato correspondiente al 100% de viabilidad.

Obtención del extracto celular y cuantificación de proteínas

Después de los tratamiento y para obtener las proteínas celulares, las células se lisaron con tampón de homogeneización (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, triton X100, Na₃VO₄ 1 mM, β -glicerofosfato 10 mM, NaF 5 mM, leupeptina 2 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml, PMSF 0,1 mM) y se recuperaron mediante el raspado de las placas en hielo. Posteriormente, las muestras recogidas se dejaron a 4°C durante 15 min. Inmediatamente después se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 min a 4°C, recogiendo el sobrenadante, donde se encuentran las proteínas solubilizadas. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford [15] utilizando un reactivo comercial de BioRad (Richmond, CA, USA) y una curva estándar de 1 μ g/ μ l de solución de BSA de Sigma (St. Louis, MO, USA).

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e inmunodetección de proteínas

De las diferentes muestras, se pipetearon 25 μ g de proteínas solubilizadas, se mezclaron con tampón de carga [(SBL: Sample Buffer Laemmli) (Tris 0,06 M, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,001%)] y se sometieron a desnaturalización por calor a 95 °C durante 5 min. Las muestras se cargaron en geles del 8% y 10% de acrilamida/bisacrilamida y se sometieron a electroforesis de tipo vertical en un sistema de BioRad (Richmond, CA, USA) a temperatura ambiente, durante 120 min, en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS). El tampón de electroforesis utilizado estaba compuesto por Tris 25 mM, pH 8,3, Glicina 0,2 M y SDS 0,1%. Se utilizaron marcadores de bajo peso molecular de LonzaGroupLtd (Basilea, Suiza).

Tras la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de BioRad (Richmond, CA, USA) mediante la aplicación de un campo eléctrico de 100 V durante 120 min a 4 °C. El tampón de transferencia estaba compuesto por Tris 25 mM, Glicina 192 mM y metanol 20%. Finalizada la transferencia, y para eliminar los restos de tampón, las membranas se lavaron con tampón TBS-Tween al 0,1% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario específico de la proteína objeto de estudio, diluido con el tampón TBS-Tween al 1%, durante toda la noche a 4 °C. Tras esta incubación, se realizó un lavado rápido de las membranas con tampón TBS-Tween al 0,1%. A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa, también diluido en TBS-Tween al 0,1% durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min en idénticas condiciones a las descritas anteriormente. Por último se incuban las membranas con el reactivo ECL (Tris 100 mM, luminol 125 mM, p-cumárico 0,2 mM y H₂O₂ 0,03%) durante 3 min. La luz emitida durante la reacción se detectó tras un breve tiempo de exposición a películas fotográficas HyperfilmTM ECL de AGFA (México D.F., México). Los anticuerpos primarios utilizados han sido: p-AMPK, AMPK, p-ACC, ACC, PPAR γ (CellSignalingTechnology, MA, USA), β -tubulina, β -actina (Sigma, St. Louis, MO, USA). Como anticuerpos secundarios se han utilizado los siguientes anticuerpos conjugados con peroxidasa: IgG *anti-rabbit* de Cell Signaling (CellSignalingTechnology, MA, USA), IgG *anti-mouse* (Sigma, St. Louis, MO, USA). El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las placas fotográficas se realizó con el programa Scion Image (Scion Corporation, Maryland, USA).

Tinción de lípidos neutros con Oil Red

Posteriormente al tratamiento con capsaicina durante 20 ó 48 horas, en ausencia o presencia de OA, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min y, una vez fijadas, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en oscuridad durante 30 min con una solución de Oil Red O (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 0,3% en isopropanol. A continuación, se lavaron de nuevo 3 veces con PBS y finalmente el Oil Red unido a los lípidos neutros intracelulares se solubilizó con 200 μ L de isopropanol y agitación suave. Una vez obtenida una coloración homogénea se midió la absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro de placas (ELX 800 Bio-TekIntruments, INC). Para determinar el nivel

de lípidos neutros, se comparó la absorbancia de los distintos tratamientos con la observada en las células control, dato correspondiente al 100% [16].

Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los datos se realizó con el programa Office Excel. Los valores están indicados como la media de los valores obtenidos \pm desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la *t* de Student, al comparar dos valores entre los que sólo varía un parámetro y el resultado se considero significativo cuando $p < 0,05$ ó $p < 0,01$, dependiendo de los ensayos.

Resultados

Para conocer el efecto de la capsaicina sobre el crecimiento de las células tumorales de hígado, se valoró la viabilidad mediante ensayo MTT, Figura 2. Las células se trataron con concentraciones crecientes de capsaicina (5, 10, 20, 40 y 75 μM) durante 20 y 48 horas. La capsaicina disminuyó la viabilidad celular de manera dosis dependiente, obteniéndose un efecto mayor a 48 h de tratamiento y un valor de IC_{50} igual a 40 μM . Para los dos tiempos ensayados, el efecto de la capsaicina resultó significativo a concentraciones de 20, 40 y 75 μM , por consiguiente, se seleccionaron estas concentraciones y ambos tiempos para continuar el estudio.

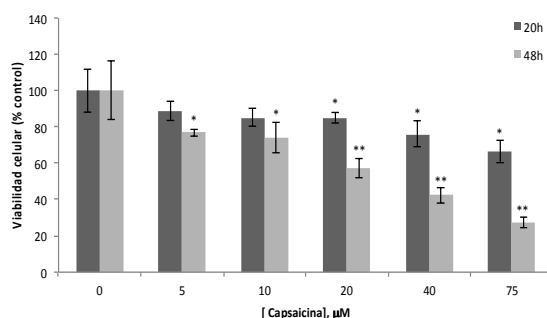


Figura 2.- Efecto de la capsaicina sobre la viabilidad celular de HepG2. Las células se incubaron con distintas concentraciones de capsaicina durante 20 y 48 horas. Transcurrido ese tiempo se midió la viabilidad celular mediante ensayo de MTT como se describe en Materiales y Métodos. El tratamiento de 0 μM (sólo vehículo) se considero el 100% de células vivas, los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. La grafica representa la medida \pm C.V. de dos ensayos realizados por cuadruplicado.

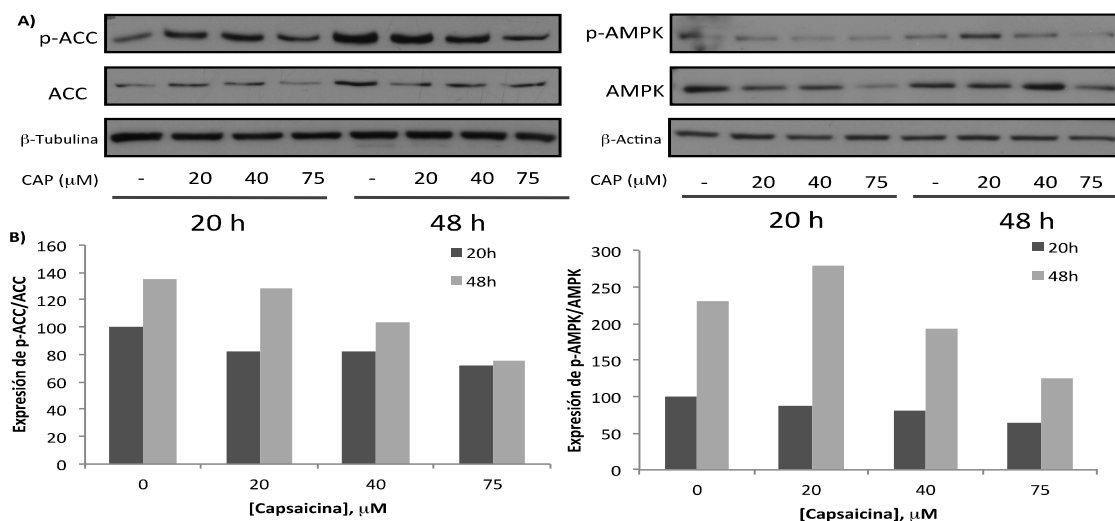


Figura 3.- Efecto de la capsaicina sobre la expresión de AMPK y ACC en células HepG2. Las células se incubaron con las dosis de capsaicina que se indican durante 20 y 48h, después las células se lisaron y se valoró la expresión de A: ACC, pACC, AMPK y pAMPK determinados mediante Western blot, como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de β -tubulina y de β -actina se muestran como control de carga. B: Cuantificación de los resultados de los Western blot. Los valores de expresión están normalizados con los niveles de β -tubulina o de β -actina. Los datos representan la media de 3 experimentos.

A continuación analizamos si la capsaicina producía algún efecto sobre el nivel de expresión y/o la activación de AMPK, enzima central en la regulación del metabolismo celular, lo que permitiría pensar

que AMPK participa en el efecto de muerte celular producido por este fitoquímico. Las células se incubaron con capsaicina a las dosis y tiempos establecidos anteriormente y, mediante Western blot, se determinaron los niveles de expresión de AMPK y de su forma activa pAMPK, así como los de ACC y pACC, enzima reguladora de la síntesis de ácidos grasos y diana de AMPK, Figura 3. La capsaicina activó la desfosforilación de pACC y de pAMPK, Figura 3A, siendo el tratamiento de 75 μM durante 48 horas el que produjo un efecto más acusado. Además se observó que la capsaicina disminuye la expresión de ambas proteínas y la relación pACC/ACC y pAMPK/AMPK, Figura 3B.

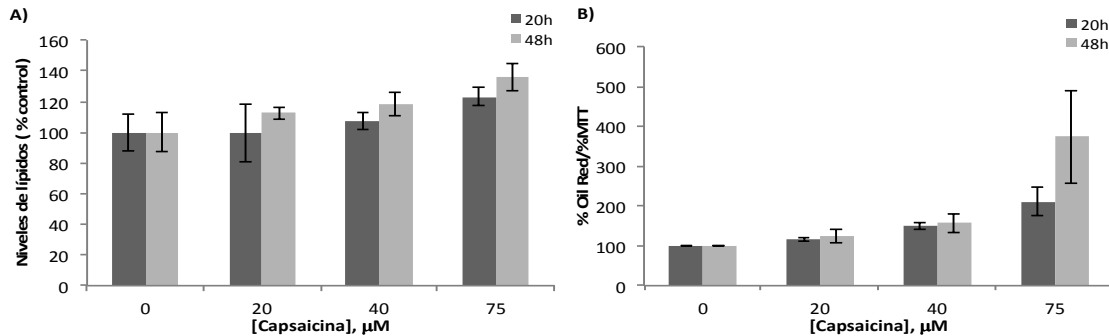


Figura 4.- Incremento de los niveles intracelulares de lípidos neutros tras el tratamiento con capsaicina. Después del tratamiento durante 20 y 48 horas con capsaicina, las células se tiñeron con Oil Red O tal y como se describe en Materiales y Métodos. A: El contenido de Oil Red O fue medido por colorimetría. B: El contenido de Oil Red O fue medido por colorimetría y el valor se normalizó con el porcentaje de células vivas medidas mediante MTT. El tratamiento de 0 μM (solo vehículo) se consideró como el 100% y los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. Los datos presentan la media \pm C.V. de dos ensayos realizados por duplicado.

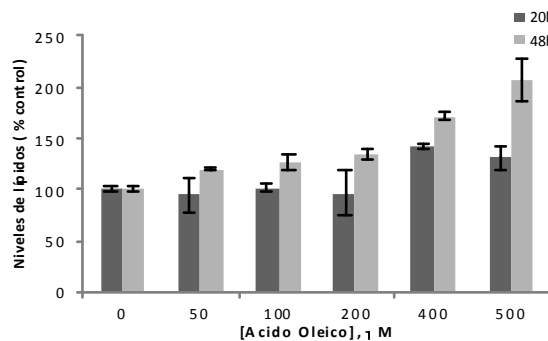


Figura 5.- Incremento de los niveles intracelulares de lípidos neutros tras el tratamiento con ácido oleico (OA). Después del tratamiento durante 20 y 48 horas con OA y BSA al 0,25% como transportador en el medio, las células se tiñeron con Oil Red O tal y como se describe en Materiales y Métodos. El contenido de Oil Red O fue medido por colorimetría. El tratamiento de 0 μM (solo vehículo) se consideró como el 100% y los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. Los datos presentan la media \pm C.V. de un ensayo realizado por duplicado.

Dado que el tratamiento con capsaicina activó la desfosforilación de las proteínas ACC y AMPK, nos planteamos estudiar si este efecto se podía correlacionar con la actividad metabólica de las células, por eso decidimos analizar si la capsaicina estaba afectando a la síntesis de lípidos. Como aproximación experimental pasamos a cuantificar la acumulación de lípidos neutros, en células tratadas con las concentraciones de capsaicina y los tiempos establecidos, mediante su tinción con Oil Red O, Figura 4. Se puede apreciar que la capsaicina aumentó el contenido intracelular de lípidos de manera dosis dependiente, Figura 4A. Este efecto se vio incrementado cuando el valor del contenido de lípidos se normalizó con el de viabilidad celular, sobre todo para el tratamiento de capsaicina 75 μM durante 48 horas, Figura 4B.

Realizamos este mismo tipo de ensayo utilizando ácido oleico (OA) como inductor de la acumulación de lípidos neutros, Figura 5. Este ácido graso estimuló la acumulación de lípidos neutros de manera dosis dependiente, siendo la dosis de 500 μM durante 48 horas el tratamiento que produjo mayor efecto. A continuación quisimos analizar si la capsaicina era capaz de modificar el efecto del OA sobre la acumulación de lípidos neutros. Para ello, establecimos 500 μM de OA como dosis para analizar la acumulación de lípidos y continuamos tratando las células con las concentraciones de capsaicina y los tiempos establecidos, Figura 6. Los resultados obtenidos indican que la capsaicina aumentó ligeramente la acumulación de lípidos inducida por el OA, Figura 6A, y este efecto se vio incrementado cuando el valor del contenido de lípidos se normalizó con el de viabilidad celular, sobre todo para el tratamiento de capsaicina 40 y 75 μM durante 48 horas, Figura 6B. Este efecto de la capsaicina se pudo apreciar al microscopio óptico de contraste de fase como se muestra en la Figura 7. En las fotografías vemos un claro

aumento de la acumulación de lípidos entre el control y el control con OA y, aunque menos apreciable, otro aumento entre las células tratadas con CAP y OA frente al control de OA.

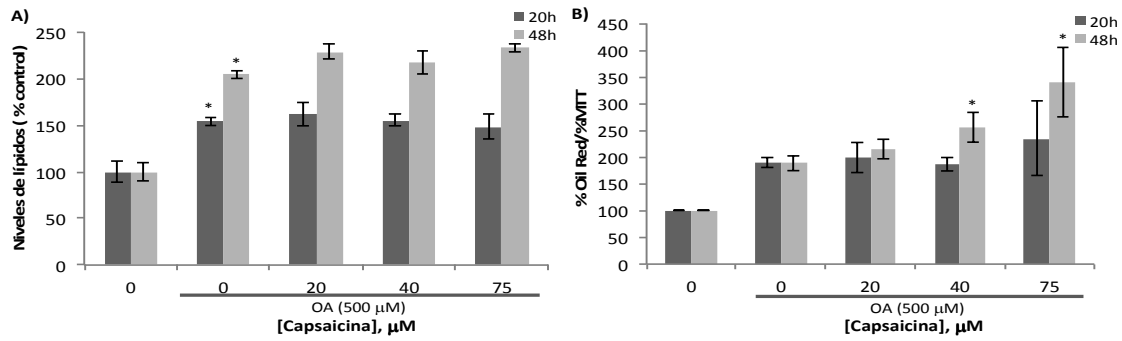


Figura 6.- Incremento de los niveles intracelulares de lípidos neutros tras el tratamiento con capsaicina y OA. Después del tratamiento durante 20 y 48 horas con capsaicina, OA y BSA 0,25% como transportador en el medio, las células se tiñeron con Oil Red O tal y como se describe en Materiales y Métodos. A: El contenido de Oil Red O fue medido por colorimetría. B: El contenido de Oil Red O fue medido por colorimetría y el valor se normalizó con el porcentaje de células vivas medidas mediante MTT. El tratamiento de 0 μM sin OA (solo vehículo) se consideró como el 100% y los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. Los datos presentan la media ± C.V. de dos ensayos realizados por duplicado.

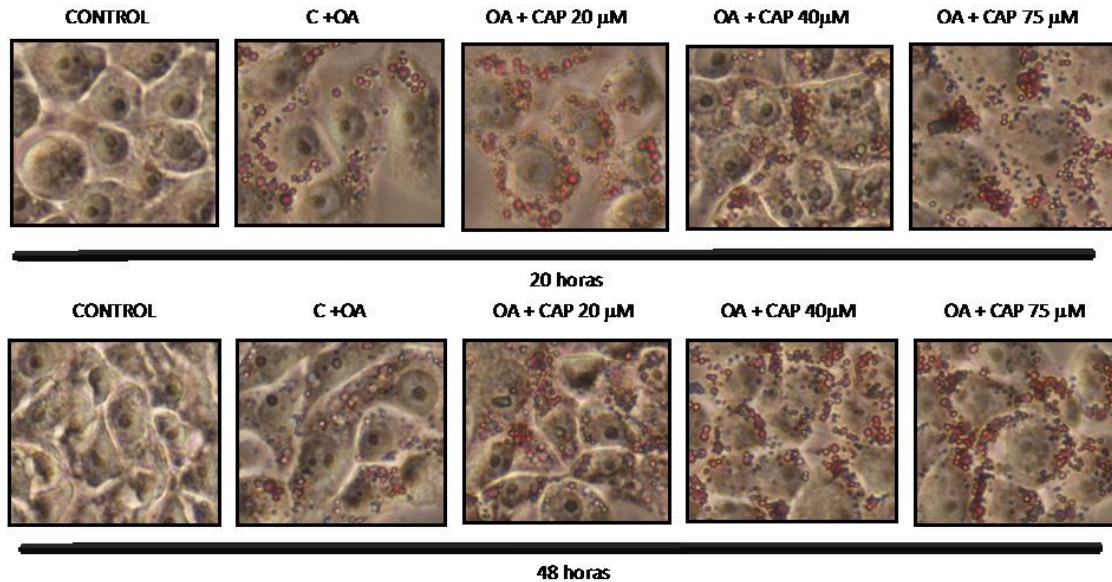


Figura 7.- Incremento de los niveles de lípidos intracelulares observados al microscopio óptico tras teñirlos con Oil Red O (color rojo) en células HepG2 tratadas con OA, CAP y BSA 0,25% como transportador en el medio. Después del tratamiento durante 20 y 48 horas a distintas concentraciones de capsaicina, las células se tiñeron con Oil Red O, como se describe en Materiales y Métodos para observarlas al microscopio óptico de contraste de fase a un aumento de 20X.

Para continuar con el estudio, analizamos de nuevo el nivel de expresión de ACC y AMPK y de sus formas fosforiladas, ahora incluyendo OA en el tratamiento, Figura 8. En presencia de OA, el efecto de la capsaicina sobre la desfosforilación de pAMPK no es evidente, y sobre pACC se observa disminución con el tratamiento de 75 μM durante 48 horas, similar al obtenido en ausencia de OA, Figura 3. Los resultados proceden de un único experimento, por lo que no podemos alcanzar ninguna conclusión.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la capsaicina aumenta el acúmulo de lípidos neutros, esto nos ha llevado a estudiar si el receptor nuclear PPAR γ pudiese estar implicado en dicho efecto, al estar descrito que estimula la adipogénesis en el tejido adiposo. En la Figura 9 se muestra el efecto de la capsaina sobre la expresión de PPAR γ . En ausencia de OA, la capsaicina aumenta la expresión de PPAR γ de manera dosis dependiente. En presencia de OA, el efecto de la capsaicina no es claro, habría que realizar más experimentos.

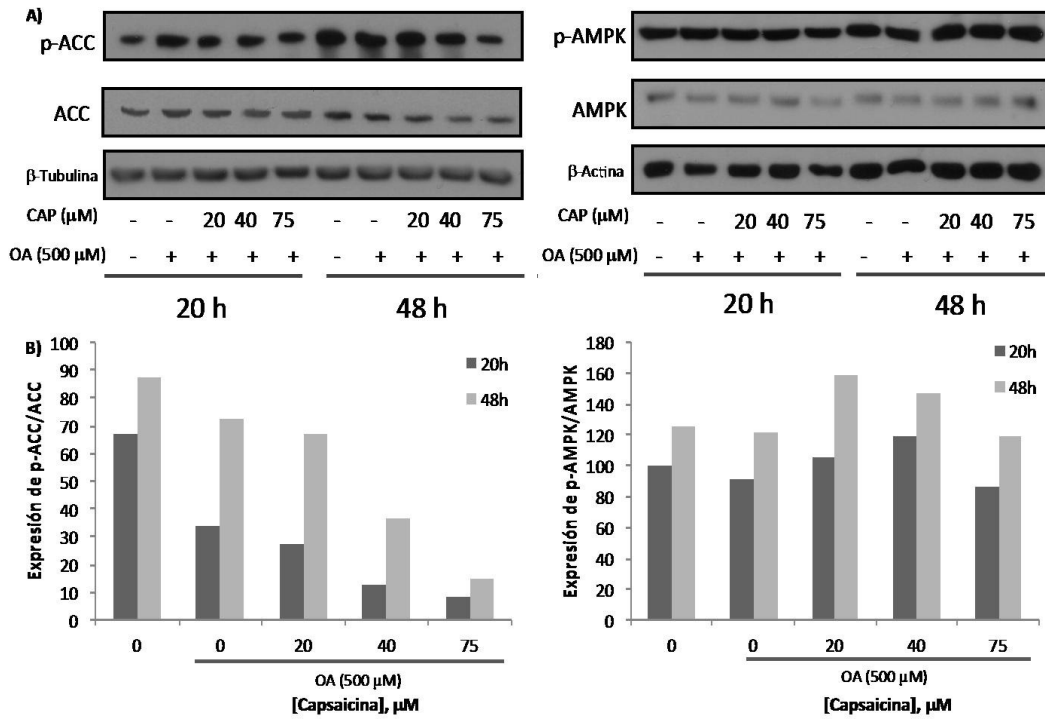


Figura 8.- Efecto de la capsaicina sobre la expresión de AMPK y ACC en células HepG2. Las células se incubaron con las dosis de capsaicina que se indican y con 500 μM de OA y BSA 0,25%, durante 20 y 48h, después las células se lisaron y se valoró la expresión de A: ACC, pACC, AMPK y pAMPK mediante Western blot, como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de β-tubulina y de β-actina se utilizan como control de carga. B: Cuantificación de los resultados de los Western blot. Los valores de expresión están normalizados con los niveles de β-tubulina o de β-actina.

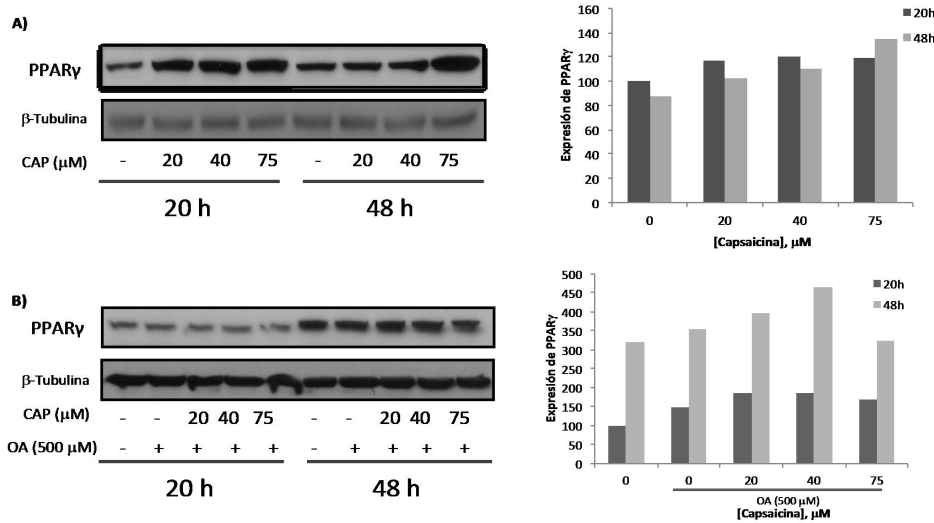


Figura 9.- Efecto de la capsaicina sobre la expresión de PPARγ en las células HepG2. Las células se incubaron con las dosis de capsaicina que se indican durante 20 y 48h, A: Después las células se lisaron y se valoró PPARγ mediante Western blot como se describe en Materiales y Métodos. Los niveles de β-tubulina se muestran como control de carga, las imágenes mostradas corresponden a los resultados de un experimento representativo de otros dos realizados y la gráfica corresponde a las medias de tres experimentos. B: Después del tratamiento con CAP y con 500 μM de OA y BSA 0,25%, las células se lisaron y se valoró PPARγ mediante Western blot como se describe en Materiales y Métodos. Las imágenes son las correspondientes a un experimento. Los niveles de β-tubulina se muestran como control de carga y la gráfica corresponde a los valores del experimento.

Discusión

Como hemos comentado en la introducción, el hepatocarcinoma celular es el sexto tipo de cáncer más frecuente y existen estudios que indican que aumentará su incidencia en países occidentales en la próxima década. Se trata de un tipo de cáncer primario asintomático, difícil de detectar hasta estadios avanzados de la enfermedad, por eso las estrategias terapéuticas disponibles son escasas y crea la necesidad desarrollar nuevas [3]. Numerosos estudios han demostrado el efecto antitumoral de la capsaicina [6]

entre los que se encuentra el cáncer de próstata e hígado [5,7]. En este trabajo hemos pretendido averiguar si, en células de cáncer de hígado, la capsaicina tiene efecto sobre enzimas clave del metabolismo como son la quinasa regulada por AMP, AMPK, la acetil CoA carboxilasa, ACC, enzima clave de la síntesis de lípidos y diana de AMPK y el receptor nuclear PPAR γ . Para ello usamos la línea celular HepG2.

El primer resultado del trabajo, donde observamos como la capsaicina reduce la viabilidad de las células HepG2 de manera dosis dependiente, corrobora el efecto antiproliferativo de la capsaicina demostrado en distintos tipos de células tumorales [6]. El mecanismo a través del cual la capsaicina induce apoptosis es variado. En el caso de las células HepG2, se ha demostrado la participación de niveles aumentados de Ca²⁺ intracelular, la producción de especies reactivas de oxígeno o la activación de caspasas [6]. En otros sistemas celulares, como son el osteosarcoma [17] o cáncer de colon [18], se ha demostrado la participación AMPK. En nuestro caso observamos que la capsaicina inhibe la actividad AMPK, como lo demuestra la disminución de los niveles de pAMPK y pACC. La desactivación de AMPK, sensor energético de la célula, y la activación de ACC, sugieren que la capsaicina podría estar activando la síntesis de lípidos. Este resultado nos sorprendió, porque en otros estudios está descrito que la capsaicina de la dieta impide la adipogénesis y la obesidad [19] y la enfermedad del hígado graso [20], en este último caso a través de la activación del canal TRPV1. Es posible que la discrepancia con nuestros resultados sea debida a que en este último estudio utilizan dosis de capsaicina más bajas. Continuamos el estudio evaluando el efecto de la capsaicina sobre el acúmulo de lípidos neutros intracelulares en HepG2. Se observa que la capsaicina aumenta los niveles de lípidos neutros de manera dosis y tiempo dependiente. Si este efecto de la capsaicina se normaliza con el valor de viabilidad celular en cada caso, el efecto de la capsaicina queda realzado, sugiriendo que la muerte celular causada por la capsaicina podría ser debida a un fenómeno de lipotoxicidad, situación descrita antes en HepG2 [11].

A continuación decidimos utilizar OA como inductor de la síntesis de lípidos para poder observar al microscopio el acúmulo de lípidos y cuantificar mejor el efecto de la capsaicina. Realizamos primero una curva dosis respuesta con OA, para determinar la dosis adecuada, eligiendo 500 μ M por ser la concentración que induce el mayor acúmulo de lípidos, de todas las ensayadas. En presencia de OA la capsaicina aumenta ligeramente el acúmulo de lípidos inducido por el ácido graso, sin embargo, este efecto sólo es significativo cuando se corrige el resultado con el de viabilidad celular. Este efecto es observable al microscopio óptico. Estos resultados apoyan los anteriores, volviendo a indicar que la capsaicina aumenta el acúmulo de lípidos. Por último pasamos a determinar si el OA modificaba la expresión y/o la actividad de las enzimas metabólicas AMPK y ACC. Los resultados no son concluyentes por tratarse de un único experimento, sin embargo parecen indicar que el efecto de la capsaicina es similar al obtenido en ausencia de OA.

El efecto de la capsaina sobre la expresión de PPAR γ podría indicar la vía a través de la cual la capsaicina produce el acúmulo de lípidos en HepG2, está descrito que este receptor en adipocitos estimula la adipogénesis. Este trabajo se podría continuar buscando las vías metabólicas concretas, relacionadas con la síntesis y degradación de lípidos, que son modificadas por la capsaicina y dan como resultado la acumulación de lípidos. Además, sería interesante profundizar en el efecto de la capsaicina sobre el receptor nuclear PPAR γ ya que su expresión está disminuida en muestras de adenocarcinoma humano [6] y podría ser una posible diana a través de la cual la capsaicina sea utilizada como terapia del adenocarcinoma hepático humano.

Referencias

1. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127, 2893-2917.
2. Netter, F.H. 1994. Colección Ciba de ilustraciones médicas. Sistema digestivo Tomo III parte 3. Barcelona: Masson-Salvat Medicina, 198.
3. Villanueva, A., and Llovet, J. M. 2011. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 140, 1410-1426.
4. Diaz-Laviada, I. 2010. Effect of capsaicin on prostate cancer cells. *Future Oncol.* 6(10):1545-50.
5. Sánchez, A. M.; Sánchez, M. G.; Malagarie-Cazenave, S.; Olea, N.; Diaz-Laviada, I. 2006. Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. *Apoptosis* 11(1):89-99.
6. Diaz-Laviada, I. and Rodríguez-Henche, N. 2014. The potential antitumor effects of capsaicin. *Prog Drug Res* 68, 181-208.
7. Huang S.P., Chen J.C., Wu C.C., Chen C.T., Tang N.Y., Ho Y.T., Lo C., Lin J.P., Chung J.G., Lin J.G. 2009. Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Res* 29, 165-174.
8. Hardie, D.G., Ross, F.A., Hawley, S.A. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:251-62.
9. Hardie, D.G. 2013. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *Diabetes* 62:2164-72.
10. Zadra, G., Photopoulos, C., Scaglia, N. Et al. 2014. A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO Molecular Medicine*, 1-20.
11. Yao, H. R., Liu, J. at el. 2011. Lipotoxicity in HepG2 cell triggered by free fatty acids. *Am J Transl Res* 3, 284-291.
12. Abbott, B. D. 2009. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol* 27, 246-257.

13. Vara, D.; Morell, C.; Rodríguez-Henche, N.; Díaz-Laviada, I. 2013. Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 4(5):618.
14. Díaz-Laviada, I., Velasco, G., Rodríguez-Henche, N., Salazar, M., Cecilia Morell, M., Ramos-Torres, A., and Domingo, A. 2014. Emerging Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Hepatocellular Carcinoma. *J Carcinogen & Mutagen* 5: 167.
15. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
16. Kang O.H., Kim, S.B., Seo, Y.S., Joung, D.K., Mun, S.H., Chol, J.G., Lee, Y.M., Kang, D.G., Lee, H.S., Kwon, D. Y. 2013. Curcumin decreases oleic acid-induced lipid accumulation via AMPK phosphorylation in hepatocarcinoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17, 2578-2586.
17. Ying, H., Wang, Z., Zhang, Y., Yang, T.Y., Ding, Z.H., Liu, S.Y., Shao, J., Liu, Y., Fan, X.B. 2013. Capsaicin induces apoptosis in human osteosarcoma cells through AMPK-dependent and AMPK-independent signaling pathways. *Mol Cell Biochem* 384:229-37.
18. Kim, Y.M., Hwang, J.T., Kwak, D.W., Lee, Y.K., Park, O.J. 2007. Involvement of AMPK signaling cascade in capsaicin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.*1095:496-503.
19. Zhang, L.L., Yan Liu, D., Ma, L.Q., Luo, Z.D., Cao, T.B., Zhong, J., Yan, Z.C., Wang, L.J., Zhao, Z.G., Zhu, S.J., Schrader, M., Thilo, F., Zhu, Z.M., Tepel, M. 2007. Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circ Res.* 100:1063-70.
20. Li, Q., Li, L., Wang, F., Chen, J., Zhao, Y., Wang, P., Nilius, B., Liu, D., Zhu, Z. 2013. Dietary capsaicin prevents nonalcoholic fatty liver disease through transient receptor potential vanilloid 1-mediated peroxisome proliferator-activated receptor δ activation. *Pflugers Arch.* 465:1303-16.