

EFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TNF- α EN CÉLULAS MONONUCLEARES. ESTUDIO PILOTO

Diana Vergara N¹, Iván Lozada-Requena², José Aguilar O²

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la acción antiinflamatoria de la capsaicina en la producción del factor de necrosis tumoral de tipo alfa (TNF- α) en células mononucleares de sangre periférica de rata (CMSP), previamente estimuladas con lipopolisacáridos (LPS). **Materiales y métodos:** Las CMSP provinieron de ratas hembras de la cepa *Sprague-Dawley* de 8-14 semanas, se obtuvieron por gradiente de centrifugación y se estimularon o no con LPS (100 ng/mL) por 24 h considerándolas como grupos control positivo y negativo de la producción de TNF- α , respectivamente. Dos horas antes de la estimulación con LPS otros grupos de CMSP fueron tratados con capsaicina (pureza mínima de 97%, SIGMA) a concentraciones de 0,01 μ M; 0,1 μ M y 1 μ M (grupos de evaluación). Los niveles de TNF- α se determinaron por ELISA en el sobrenadante del cultivo celular. El análisis estadístico se realizó por ANOVA y prueba de Tukey para comparaciones múltiples. **Resultados:** Los niveles de TNF- α a las concentraciones de capsaicina de 0,01 μ M y 0,1 μ M no mostraron cambios significativos respecto al control positivo; sin embargo, a 1 μ M se produjo una disminución de 21,9% ($p < 0,05$) de esta citokina. **Conclusión:** La capsaicina evidencia un efecto antiinflamatorio al disminuir los niveles de TNF- α una citokina pro inflamatoria en un modelo *in vitro* en cultivos celulares.

Palabras Clave: Agentes Antiinflamatorios, Capsaicina, *Sprague-Dawley*, TNF- α (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: Anti-inflammatory actions of capsaicine for the production of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in lipopolysaccharide (LPPS)-stimulated mononuclear cells from peripheral blood of rats. **Material and methods:** The aforementioned cells were obtained from Sprague-Dawley female rats, 8 to 14 weeks old, they were obtained using a centrifugation gradient and some of them were stimulated with LPPS (100 ng/mL), and some were not, so they were classified as positive and negative control groups according to TNF- α production. Two hours before stimulation with LPPS, other groups of mononuclear cells from peripheral blood of rats were treated with capsaicine (minimal purity, 97, SIGMA) in 0,01 μ M, 0,1 μ M, and 1 μ M concentrations (groups for assessment). TNF- α levels were determined using an ELISA test in the supernatant of the cell culture. Statistical tests were performed using ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons. **Results:** TNF- α levels at 0,01 and 0,1 μ M capsaicine concentrations did not show significant changes with respect to positive controls; however, at 1 μ M there was a 21,9% reduction ($p < 0,05$) in TNF- α levels. **Conclusion:** There is evidence showing that capsaicine exerts an anti-inflammatory effect when TNF- α levels are reduced, being the latter a pro-inflammatory cytokine in an *in vitro* model using cell cultures.

Key Words: Anti-Inflammatory Agents, Capsaicin, *Sprague-Dawley*, TNF- α (source: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

Capsicum annum, es una planta que pertenece a la familia *Solanacea*, conocida comúnmente como "ají de trueno", un tipo de pimiento que es frecuentemente usado en la preparación de comidas de uso común en la selva de Bagua, en la región nororiental del Perú, pero, además es usada tradicionalmente en fitoterapia en forma de loción de uso tópico. Uno de sus principales componentes es la capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida; C₁₈H₂₇NO₃), sustancia que pertenece a la familia de los vaniloides^{1,2}.

La capsaicina estimula los termorreceptores y nociceptores polimodales como el receptor de neuronas sensoriales cutáneas (Vanilloid Receptor 1, VR1), incrementando la liberación masiva de neuropéptidos, incluyendo la sustancia P, responsable de la transmisión de señales de dolor^{1,3}.

Por tanto, inicialmente la capsaicina causaría dolor; sin embargo, este síntoma tiende a disminuir con aplicaciones sucesivas, las que reducen drásticamente los neuropéptidos y la inflamación⁴⁻⁶. Asimismo, la capsaicina ha demostrado un efecto antiinflamatorio al disminuir

¹ Centro Nacional de Control de Calidad. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú

² Sección Inmunología, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú

la producción de moléculas pro inflamatorias como la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), prostaglandina (PGE2), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), también causa alteraciones en las concentraciones de I κ B, molécula que está implicada en la transcripción mediada por NF κ B en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS⁷. Sin embargo, su acción sobre citocinas pro o antiinflamatorias no ha sido previamente evaluada.

En este estudio demostramos que el tratamiento de células mononucleares de sangre periférica de ratas (CMSP) con capsaicina presenta un efecto antiinflamatorio al disminuir la producción de TNF- α una citocina pro inflamatoria, la cual tiene un papel importante en los procesos inflamatorios agudos y crónicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas hembras *Sprague-Dawley* de 8 - 14 semanas, cuyo peso vivo promedio fue $194 \pm 28,6$ g, las que se obtuvieron del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. El bioterio mantiene líneas de ratas con parámetros estándar en cuanto a su reproducción y características adecuadas de mantenimiento de la línea. Los animales fueron mantenidos en cajas de polipropileno en el bioterio en mención, y alimentados con suplemento balanceado y agua *ad libitum*. Los animales fueron tratados respetando los principios éticos adoptados en la norma bioética de la Asociación Médica Mundial sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica, adoptada por la 41^a Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, 1989⁸.

OBTENCIÓN DE CMSP

Las ratas fueron anestesiadas con Halatal[®], 1mL/2,5 kg por vía intravenosa en la base de la cola, para obtener 10 mL de sangre periférica por punción cardiaca con jeringa con EDTA⁹. La sangre obtenida fue diluida en solución de Hanks (Gibco, 14170-088). Las CMSP se separaron por gradiente de centrifugación con *Histopaque* (SIGMA 1083; 1,083 g/dL), por técnicas convencionales previamente descritas⁹.

CULTIVO CELULAR Y GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN

Las CMSP obtenidas fueron inmediatamente cultivadas en medio RPMI-1640 (GIBCO, 13018-015) con suero bovino fetal al 10% (Gibco, 10270106[®]). Se le adicionó penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 μ g/mL (Gibco, 15140-122). Se cultivó por triplicado 100 μ L de sus-

pensión para obtener una concentración final de 1×10^6 CMSP/pozo en placas de cultivo de fondo en U (Falcon BD[®]). Seguidamente se agregaron 25 μ L de fitohemaglutinina 10 μ g/mL (SIGMA, L9017[®]) y se incubaron a 37 °C, con 5% CO₂ por 72h, al cabo de las cuales se establecieron los siguientes grupos:

Grupo 1. CMSP tratadas con el diluyente de capsaicina (etanol) y no estimuladas con LPS (100 ng/mL) (control negativo);

Grupo 2. CMSP tratadas con el diluyente de capsaicina y estimuladas con LPS (control positivo de producción de TNF- α);

Grupo 3. CMSP tratadas con capsaicina 0,01 μ M, estimuladas con LPS;

Grupo 4. CMSP tratadas con capsaicina 0,1 μ M, estimuladas con LPS;

Grupo 5. CMSP tratadas con capsaicina 1 μ M, estimuladas con LPS.

TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS Y ESTIMULACIÓN CON LPS

La capsaicina fue de SIGMA-ALDRICH St. Louis Mo, USA, M-2028, con una pureza mínima de 97%. Se preparó una solución *stock* (0,1 mg/mL) usando como diluyente al etanol¹⁰. Luego de la colocación de las CMSP en placas de microtitulación de fondo en U, los diferentes grupos fueron tratados por 2h con capsaicina o su diluyente, como se indicó previamente. En todos los casos, el volumen de diluyente o capsaicina fue de 1% del volumen total por pozo. Luego se realizó la estimulación durante 24h a 37 °C y 5% CO₂ con o sin LPS 100ng/mL (25 μ L) de *E. coli* 055:B5 (SIGMA, L2880). Al finalizar el tiempo de incubación se tomaron los sobrenadantes de los respectivos grupos y se almacenaron a -20 °C hasta el día del ensayo de ELISA para la medición de TNF- α .

MEDICIÓN DE CITOKINAS POR ELISA

En cada grupo se analizaron los sobrenadantes del cultivo celular para la medición de los niveles de TNF- α por enzima inmuno ensayo tipo sándwich (Opt EIA Rat TNF- α ELISA kit - Pharmingen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Previamente, los estándares de TNF- α y los sobrenadantes de cultivo fueron agregados a los respectivos pocillos revestidos con anticuerpos monoclonales específicos para TNF- α de rata, cualquier TNF- α presente se unirá al anticuerpo inmovilizado. Luego de un período de incubación los pocillos fueron lavados y se les adicionó un segundo anticuerpo biotinilado anti-TNF- α de rata, produciéndose una reacción anticuerpo-antígeno-anticuerpo (*sandwich*). Después de un segundo lavado se adicionó un conjugado conformado

por una enzima peroxidasa de rábano picante unida a avidina. Los pozos se lavaron nuevamente y se adicionó la solución sustrato TMB, la que produce una coloración azul directamente proporcional a la cantidad de TNF- α presente en los estándares y sobrenadantes, tras detener la reacción con una solución de ácido sulfúrico 1N se obtuvieron las lecturas a 450 nm en un espectrofotómetro (*BioRad Microplate Reader*).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados son presentados como el promedio \pm EEM (error estándar de la media). El análisis estadístico fue realizado con el *software* SPSS 11.0.1, se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Las comparaciones entre grupos fueron hechas por el análisis de varianza ANOVA de una vía, si se encontraban diferencias significativas se realizaron las comparaciones de medias a través de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

RESULTADOS

En la figura 1, se puede observar que en el grupo 1 se produce en forma espontánea sólo niveles basales de TNF- α . En el caso del grupo 2, en el cual se usó el vehículo diluyente de capsaicina (etanol absoluto), pero se le adicionó LPS, que es un potente estimulador de la producción de TNF- α , se apreció un aumento en la producción de esta citokina lo cual evidencia el funcionamiento del sistema experimental.

En los demás grupos, los resultados demuestran que la capsacina a concentraciones de 0,01 μ M y 0,1 μ M

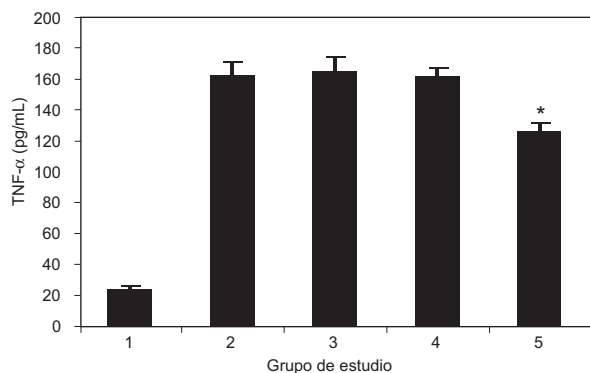


Figura 1. Producción de TNF- α en células mononucleares de sangre periférica de rata estimuladas con lipopolisacárido (LPS) según concentración de capsaicina. 1: Control sin LPS; 2: Control con LPS; 3: Capsaicina 0,01 μ M con LPS; 4: Capsaicina 0,1 μ M con LPS; 5: Capsaicina 1 μ M con LPS. Los valores son el promedio \pm EEM de tres réplicas por grupo. * $p < 0,05$ comparadas con grupo control con LPS(2), ANOVA y Test de Tukey.

no inhibe la producción de TNF- α cuando las CMSP se enfrentan a LPS. Sin embargo, a la concentración de 1 μ M se puede apreciar una disminución leve (21,9%, $p < 0,024$) de los niveles de TNF- α , comparado con el grupo control estimulado con LPS (162,0 pg/mL vs 126,6 pg/mL respectivamente).

DISCUSIÓN

Utilizando nuestro modelo *in vitro*, hemos observado el efecto de capsaicina, uno de los principales componentes del *Capsicum annum* un producto natural de uso tradicional. Algunas propiedades antiinflamatorias de capsaicina ya habían sido previamente evaluadas por Kim *et al.*⁷, quienes demostraron que la capsaicina a través de su acción sobre la vía del NF- κ B evita la translocación de este factor de transcripción, con lo cual no es posible que se activen los genes que dan origen a moléculas pro inflamatorias como prostaglandinas, o enzimas con actividad pro inflamatoria como ciclooxigenasas, óxido nítrico sintetasa inducible, entre otras. Sin embargo, el efecto sobre la producción de TNF- α no ha sido previamente evaluado, lo cual es altamente probable que suceda, teniendo en cuenta que usa similares vías de activación que las anteriores moléculas.

Una alternativa para el estudio de procesos inflamatorios crónicos es el uso de modelos *in vitro* e *in vivo*. Sandoval *et al.* usaron células RAW264.7 para estudiar *in vitro* la inhibición de la síntesis o liberación de TNF- α inducida por LPS de un producto natural (uña de gato)¹¹.

El modelo en ratas MHC-susceptibles a la inducción de artritis por colágeno semeja características histológicas e inmunológicas propias de este proceso en el humano, como la formación de panus, erosión del cartílago e infiltración celular y la elevada producción de citocinas y moléculas pro inflamatorias, respectivamente^{12,13}.

Asimismo, Aguilar *et al.* usaron el modelo del edema plantar agudo con carragenina en ratones BALB/c para estudiar la actividad antiinflamatoria de extractos naturales¹⁴. Mediante el uso de LPS (un antígeno de origen bacteriano) hemos reproducido el elevado nivel de la citokina TNF- α característico de los procesos inflamatorios crónicos. Sería importante que estudios posteriores puedan demostrar el efecto antiinflamatorio de *capsicum* en estos modelos.

El tratamiento de los grupos control con el vehículo diluyente (etanol absoluto) nos permite concluir que no ejerce aumento en la producción de esta citokina por lo que resulta inocuo su uso como tal. Asimismo, es importante indicar que tanto la capsaicina a las con-

centraciones mencionadas y su diluyente a un volumen que represente el 1% del volumen usado por pocillo de cultivo celular evitará los efectos tóxicos producidos por el etanol absoluto usado a mayor volumen.

Se estudió tres concentraciones de capsaicina (0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M) para evaluar su efecto sobre la producción de TNF- α en CMSP. Hemos encontrado que a la concentración de 1 μ M se obtiene una disminución de 21,9% de la producción de TNF- α en CMSP estimuladas con LPS. Podría argumentarse que este efecto se deba a la acción de capsaicina sobre la vía del NF-KB; sin embargo, no se descarta su acción sobre otras vías que intervienen en la producción de esta citokina como Fosfatidilinositol 3-kinasa, *Protein kinase C*, *Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase*, ERK (*Extracelular signal-Regulated Kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), p38, BMK1/ERK5.

Nuestro estudio evaluó concentraciones de capsaicina en un rango relativamente estrecho, por lo cual es necesario investigar que es lo que ocurre a mayores concentraciones, también es preciso descartar el hecho que a concentraciones mayores esta disminución se podría deber a algún efecto citotóxico del compuesto (capsaicina) y finalmente, además, sería importante trabajar con el extracto proveniente del *Capsicum annum*, según la medicina tradicional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Welch JM, Simon SA, Reinhart PH.** The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicine involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(25): 13889-94.
2. **Johnston JJ, Goldade DA, Chipman RB.** Capsaicin migration through maple sap collection tubing. *Crop Protection* 2002; 21(10): 1109-12.
3. **Tominaga M, Wada M, Masu M.** Potentiation of capsaicin receptor by metabotropic ATP receptors as a posible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(12): 6951-56.
4. **Prescott J, Swain-Campbell N.** Responses to repeated oral irritation by capsaicin, cinnamaldehyde and ethanol in PROP tasters and non-tasters. *Chem Senses* 2000; 25(3): 239-46.
5. **Kaufman PB, Carlson TJ, Kaufman KB, Brielmann HL, Warber S, Cseke LJ, et al.** Natural products from plants. Florida: CRC Press LLC; 1999.
6. **Surh Y.** Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 1999; 428(1-2): 305-27.
7. **Kim CS, Kawada T, Kim BS, Han IS, Choe SY, Kurata T, et al.** Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signal* 2003; 15(3): 299-306.
8. **Asociación Médica Mundial [página de internet].** Fernel-Voltaire, Francia: Declaración de la Asociación Médica Mundial sobre el uso de animales en la investigación biomédica. [fecha de acceso: abril de 2005]. Disponible en: www.wma.net/s/policy/a18.htm.
9. **Coligan J E, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W.** Current protocols in immunology. New York: John Wiley and Sons; 2002.
10. **United States Pharmacopeia.** United States Pharmacopeia 29 & National Formulary 24. Rockville: USP; 2000.
11. **Sandoval M, Charbonnet R, Okuhama N, Roberts J, Krenova Z, Trentacosti M, et al.** Cat's claw inhibits TNF- α production and scavenges free radicals: Role in cytoprotection. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(1): 71-78.
12. **Vingsbo C.** Chronic arthritis in rats. Pathogenesis and genetic factors [Doctoral thesis]. Sweden: Faculty of Medicine, Lund University; 1997.
13. **Vingsbo C, Larsson P, Andersson M, Holmdahl R.** Association of pepsin with type II collagen (CII) breaks control of CII autoimmunity and triggers development of arthritis in rats. *Scand J Immunol* 1993; 37(3): 337-42.
14. **Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reiningger E, et al.** Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol* 2002; 81(2): 271-76.

Correspondencia: Q.F. Diana Vergara Núñez. Dirección Ejecutiva de Certificación, Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.
 Dirección: Avenida Defensores del Morro No. 2268 (ex Avenida Huaylas), Chorrillos, Lima 9.
 Teléfono: (511) 467-6696 anexo 589
 Correo electrónico: dvergara@ins.gob.pe