



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Activación del canal iónico TRPV1 expresado  
en células de riñón de embrión humano por  
agentes irritantes que modifican cisteínas.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

**ITZEL ALEJANDRA LLORENTE GIL**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

**TUTORA  
DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR**

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**Activación del canal iónico TRPV1 expresado  
en células de riñón de embrión humano por  
agentes irritantes que modifican cisteínas.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

**ITZEL ALEJANDRA LLORENTE GIL**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

**TUTORA  
DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR**

2007

## Hoja de datos del jurado

<b>1. Datos del alumno</b>	
Apellido paterno	Llorente
Apellido materno	Gil
Nombre (s)	Itzel Alejandra
Teléfono	5630-9470
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Número de cuenta	30020682-3
<b>2. Datos del tutor</b>	
Grado	Dra.
Nombre (s)	Tamara Luti
Apellido paterno	Rosenbaum
Apellido materno	Emir
<b>3. Datos del sinodal 1</b>	
Grado	Dr.
Nombre (s)	León David
Apellido paterno	Islas
Apellido materno	Suárez
<b>4. Datos del sinodal 2</b>	
Grado	M. en I. B. B.
Nombre (s)	Alette
Apellido paterno	Ortega
Apellido materno	Gómez
<b>5. Datos del sinodal 3</b>	
Grado	M. en C.
Nombre (s)	Enrique
Apellido paterno	Moreno
Apellido materno	Saenz
<b>6. Datos del sinodal 4</b>	
Grado	I. B. Q.
Nombre (s)	Héctor
Apellido paterno	Quezada
Apellido materno	Pablo
<b>7. Datos del trabajo escrito</b>	
Título	Activación del canal iónico TRPV1 expresado en células de riñón de embrión humano por agentes irritantes que modifican cisteínas.
Número de páginas	73
Año	2007

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir por haberme dado su confianza al abrirme las puertas de su laboratorio (mi segunda casa), por su apoyo incondicional, su paciencia y dedicación; así como su guía para la realización de esta tesis. Gracias por haberme brindado tu amistad, por alentarme a seguir adelante y ayudarme en muchas otras cosas más!!!

Agradezco a mis sinodales Dr. León David Islas Suárez, I. B. Q. Héctor Quezada Pablo, M. en C. Enrique Moreno Saenz y M. en I. B. B. Alette Ortega Gómez por haberse tomado el tiempo para darme sus valiosas sugerencias y comentarios para mi trabajo escrito.

Al I. B. Q. Héctor Quezada Pablo por su ayuda, consejos; así como su paciencia y dedicación para enseñarme las técnicas necesarias para la realización de esta tesis.

A los integrantes del laboratorio BL-303 del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM Andrés Jara Oseguera, Héctor Salazar García y Felix Sierra Ramírez por darme ánimos y su valioso apoyo para realizar dicha tesis; así como su grandiosa amistad.

Agradezco a toda mi familia en especial a mis abuelos Juan de Dios Llorente Saldaña y Olivia Gil Castañeda; así como a mi mamá Llibia Alejandra Llorente Gil y mi hermano René Santoyo Llorente por haberme dado su apoyo incondicional, por haberme sabido guiar en los momentos necesarios y por dejarme tomar mis decisiones.

A todos mis amigos que han estado conmigo en las buenas y en las malas, que me han apoyado, reprendido y aplaudido; mil gracias por estar aquí!!!

“Tu obligación como hombre de ciencia es decir la verdad, sin que te importen ni los prejuicios religiosos, ni los prejuicios políticos, ni los prejuicios sentimentales.”

Alfonso Caso

**Este trabajo fue apoyado por CONACYT con el proyecto que lleva por número 46004A –1 y por DGAPA con el proyecto IN–201705/16 con una beca para su autor.**

# Índice

<b>Resumen</b> -----	10
<b>Introducción</b> -----	12
1) Canales iónicos.-----	13
2) Canales TRP.-----	15
2.1) El canal TRPV1: Nuestro modelo experimental -----	19
2.2) Regiones estructurales importantes para la regulación de la función del canal TRPV1.-----	20
2.3) Regulación de la función del canal TRPV1 por Ca <sup>2+</sup> .-----	23
2.4) Importancia del canal TRPV1 en procesos inflamatorios.-----	24
2.5) Activación del canal TRPV1 por agentes irritantes y agentes que modifican cisteínas.-----	24
3) Estrategias experimentales que se han diseñado para el estudio de las relaciones existentes entre la estructura y la función de los canales iónicos.-	26
<b>Objetivo general</b> -----	30
<b>Objetivos particulares</b> -----	30
<b>Hipótesis</b> -----	31
<b>Metodología</b> -----	32
a) <i>Cultivo celular.</i> -----	32
b) <i>Generación de mutantes.</i> -----	33
c) <i>Transfección de células.</i> -----	36



d) <i>Electrofisiología.</i> -----	37
e) <i>Soluciones de registro.</i> -----	39
<b>Resultados</b> -----	41
<b>1) Efecto de los agentes MTS sobre el canal TRPV1 silvestre.</b> -----	41
a) <i>Los agentes MTS funcionan como agonistas.</i> -----	41
b) <i>El efecto que tiene el MTSEA sobre el canal TRPV1 silvestre puede ser reversible.</i> -----	43
<b>2) Generación de un canal sin cisteínas.</b> -----	46
a) <i>El canal TRPV1 sin cisteínas o TRPV1 – 18cys.</i> -----	46
b) <i>La cisteína 157 es la responsable del efecto de los MTS sobre el canal TRPV1 silvestre.</i> -----	48
<b>3) Los extractos de ajo y la cebolla activan al canal TRPV1 silvestre.</b> -----	52
a) <i>Extracto de ajo y cebolla activan al canal TRPV1 silvestre.</i> -----	53
b) <i>El canal TRPV1 – 18cys no es activado por los extractos de cebolla y ajo.</i> -----	57
c) <i>La cisteína 157 es la responsable de la interacción con los extractos.</i> ---	58
<b>4) La “alicina”, componente activo del ajo, activa al canal TPV1.</b> -----	60
a) <i>La alicina y el canal TRPV1.</i> -----	60
b) <i>En el canal TRPV1 – 18cys la alicina no tiene ningún efecto.</i> -----	61
c) <i>La alicina interactúa con la cisteína C157.</i> -----	63
d) <i>La presencia de la cisteína 157 es suficiente para la activación del canal TRPV1 por la alicina.</i> -----	64

<b>Discusión</b> -----	66
<b>Conclusión</b> -----	69
<b>Referencias</b> -----	70

## Resumen

El canal TRPV1 o *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*, por sus siglas en inglés, pertenece a la familia de canales llamada TRP. Estos canales son importantes para la detección de estímulos tanto físicos como químicos que provienen del medio ambiente. El canal TRPV1 es un canal catiónico no selectivo activado por capsaicina, el compuesto irritante presente en los chiles de género *Capsicum*, por temperaturas altas en los rangos nocivos y por pH ácido, entre otros estímulos. El canal TRPV1 además de ser activado por estos estímulos nocivos, está involucrado en la percepción del dolor causado por varios procesos de inflamación. Comparado con otros canales iónicos, se sabe poco acerca de la relación que existe entre la estructura y la función de este canal. Tomando en cuenta la evidente importancia de esta proteína para los organismos en los que se encuentra, se decidió estudiar los mecanismos moleculares que subyacen a la función de la misma. En particular, en este trabajo se estudió el papel que juegan los residuos de cisteínas en la activación del canal TRPV1 por agentes irritantes que se encuentran en algunas plantas como lo son el ajo y la cebolla. Dado que el canal presenta 18 cisteínas en su estructura primaria, no sería raro que si dichos agentes irritantes son compuestos que promueven la modificación de las cisteínas, estos promovieran algún cambio funcional en el canal TRPV1.

El primer paso para abordar las preguntas que se plantearon en este proyecto fue estudiar el efecto de los extractos de cebolla y ajo que se sabe que contienen compuestos como la alicina que reaccionan con residuos de cisteína. Una vez establecido el efecto de estos extractos, se procedió a examinar a fondo el efecto de la alicina, el compuesto activo que se encuentra mayoritariamente en estos extractos vegetales, así como de otros agentes que modifican cisteínas como los metanotiosulfonatos (MTS) sobre la actividad del canal TRPV1. Más aún, para determinar el mecanismo molecular que subyace a los efectos de estos agentes, se utilizaron técnicas de biología molecular para introducir mutaciones puntuales en el canal TRPV1 y determinar el papel de cada una de las cisteínas presentes en su secuencia de aminoácidos sobre la activación del canal por los diferentes agentes que se probaron. Finalmente, se generó un canal TRPV1 sin cisteínas funcional que permitió evaluar, por medio de la reintroducción de cada una de las cisteínas en su posición original, el papel de las mismas sobre la actividad del canal de manera más fina. Se encontró que tanto los agentes MTS como la alicina, modifican la probabilidad de apertura del canal, la sensibilidad

de éste ante capsaicina y que dichos agentes funcionan como activadores del canal *per se*. Los resultados demuestran que esto se debe a la interacción que tienen estos compuestos con una cisteína específica que se encuentra en la posición 157 en la región amino-terminal (N – terminal) del canal TRPV1.

## **Introducción**

Una de las características adaptativas más importantes de los organismos es la capacidad para detectar y responder a estímulos del medio ambiente. La eficiencia con la que un organismo es capaz de modificar su respuesta ante distintos estímulos es esencial para su supervivencia.

Dichos estímulos son detectados por células neuronales que se encuentran en el sistema nervioso periférico del organismo. Estas células generan una señal eléctrica o potencial de acción (PA, cambio transitorio en el potencial de membrana que desplaza el voltaje hasta un valor positivo para posteriormente regresar a su valor inicial) en respuesta a ciertos tipos de estímulos. La excitabilidad de estas células se debe a su capacidad para permitir el movimiento de iones, tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ , considerados como los principales generadores de la actividad eléctrica en las células (Hille, 2001).

La célula funciona como un capacitor ya que tiene la capacidad de separar iones a través de la membrana citoplasmática generando una distribución diferencial de las cargas eléctricas a ambos lados de la misma. Como resultado de dicha separación se generan gradientes iónicos (químicos) y de cargas (eléctricos) entre el interior y el exterior de la célula, dando origen a una fuerza impulsora conocida como gradiente electroquímico. Esta fuerza determina la dirección de los iones e influye sobre la velocidad de los mismos cuando son transportados a través de proteínas especializadas que se encuentran en la membrana plasmática. Dichas proteínas transmembranales reciben el nombre de canales iónicos; los cuales son complejos multiproteicos que forman poros hidrofílicos en las membranas por los que pueden ser transportados diferentes tipos de iones. Así, los canales iónicos permiten que las células generen diferentes tipos de actividad eléctrica espontánea; así como en respuesta a diferentes estímulos ambientales.

### 1) Canales iónicos.

Existen diferentes tipos de canales iónicos, algunos responden a cambios en el potencial de membrana de la célula ( $V_m$ ), otros se activan por la acción de un ligando y otros más por cambios en la presión, temperatura, y algunos compuestos de plantas o vegetales, etc. En general, estos canales son, en mayor o menor grado, selectivamente permeables a diferentes tipos de iones (Aidley, 1989). Debido a que los iones presentan una carga eléctrica neta, su movimiento a través de los canales genera corrientes eléctricas que se traducen en cambios del  $V_m$ , lo cual eventualmente puede originar un PA.

Además de su clara participación e importancia en la generación de señales eléctricas, los canales iónicos también participan en diferentes procesos fisiológicos relacionados con la secreción de hormonas y neurotransmisores, contracción muscular, regulación metabólica y expresión genética (Catterall, 2000).

Existe una clara relación entre la estructura y la función de los canales iónicos. Las diferentes regiones que conforman y dan lugar a los canales iónicos funcionales juegan también papeles importantes en la respuesta de estos canales iónicos ante los estímulos del medio ambiente y, por ende, para su función fisiológica.

Por ejemplo, los canales iónicos activados por voltaje; tales como los de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , son capaces de responder a cambios en el potencial eléctrico establecido a través de la membrana plasmática de la célula. La capacidad del canal para responder a cambios en el potencial eléctrico depende de una estructura denominada sensor de voltaje, que contiene aminoácidos cargados positivamente y que son los que interactúan con el campo eléctrico. Varias líneas de evidencia que incluyen estudios funcionales y de homología de secuencias sugieren que en todos los canales activados por voltaje, el sensor de voltaje se encuentra localizado en el segmento S4 (**Figura 1**) (Islas, 1999; Sands, *et al* 2005).

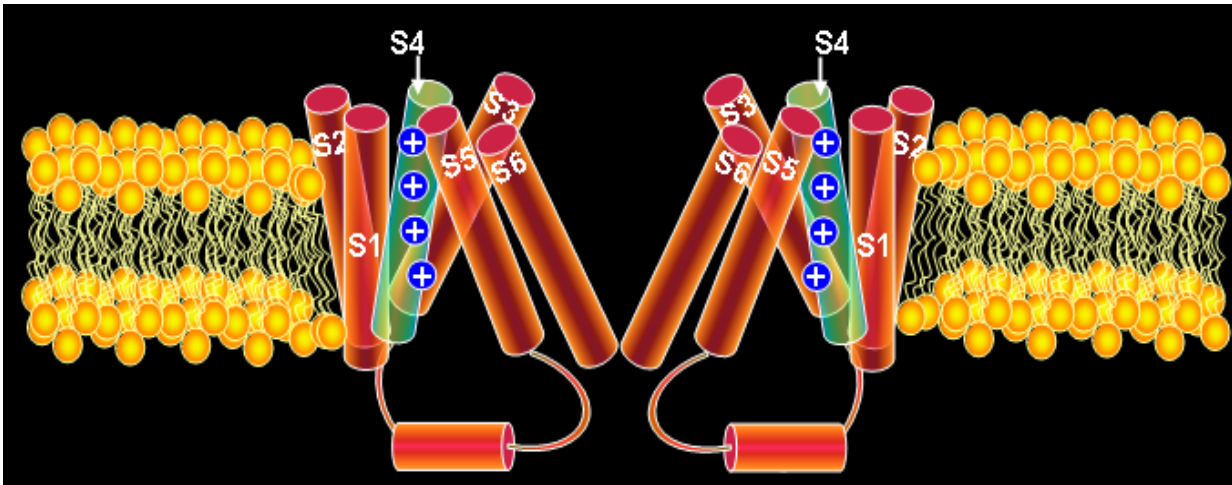
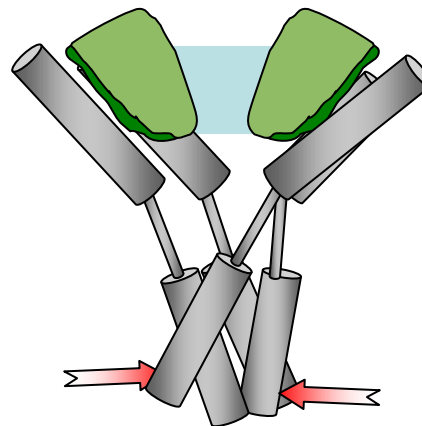


Figura 1) Modelo de la estructura de un canal iónico activado por voltaje. Se muestran dos subunidades contiguas: cada una de ellas a un lado del poro. La región del poro se encuentra conformada por los segmentos S5 y S6. Los segmentos S4 se muestran con cargas positivas conferidas por la presencia de aminoácidos como la arginina. El segmento S4 detecta los cambios en el potencial de membrana y sufre un cambio conformacional que se traduce al resto de la proteína promoviendo los cambios en las regiones que forman al mecanismo de compuerta (segmentos S5 y S6) que llevan a la apertura o cierre del canal.

Se ha especulado que el segmento transmembranal S4 realiza una translación vertical sobre su mismo eje en respuesta al cambio en el voltaje membranal y dicho cambio conformacional que moviliza carga, conlleva a la activación del canal iónico (Sands, *et al* 2005).

Además, para que la conducción iónica pueda ocurrir en cualquier tipo de canal, éste debe de sufrir un cambio en su estructura para poder pasar de un estado abierto a un estado cerrado o viceversa; a dicho movimiento se le llama “*gating*” o “*propiedades de compuerta*”. A la estructura que sufre el cambio conformacional que lleva a la apertura o al cierre del canal se le llama compuerta de activación. Por ejemplo, en los canales de  $K^+$  activados por voltaje se han obtenido estructuras cristalizadas para los canales tanto en el estado abierto como en el estado cerrado y se ha sugerido que la compuerta de activación se encuentra en la parte interna del canal (**Figura 2**). En el caso particular de los canales de potasio, la compuerta está compuesta por la interacción de las alfa hélices que forman a los segmentos transmembranales S6 (Sands, *et al* 2005).

**Figura 2) Caricatura para la compuerta de activación de un canal de potasio; la cual se encuentra en la región intracelular del segmento transmembranal S6 (indicado por las flechas)**



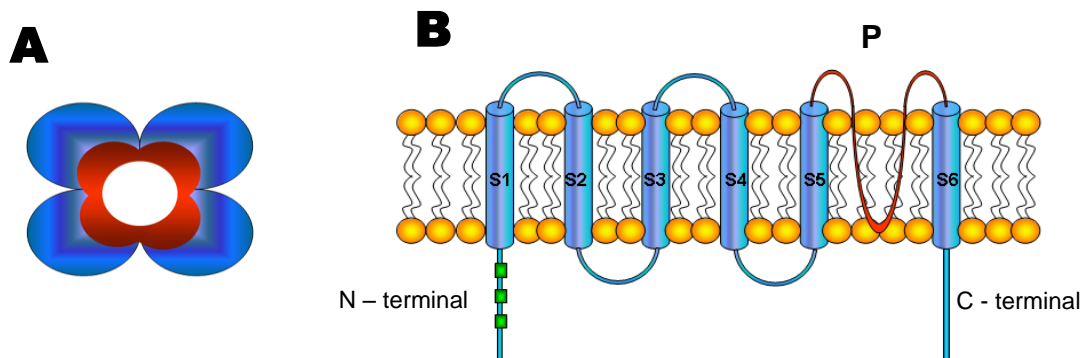
Pese a que existe mucha información en la literatura acerca del papel de los canales iónicos en la fisiología de los organismos, no fue hasta poco menos de una década que se identificaron los mecanismos moleculares que subyacen a la detección de estímulos del medio ambiente, tales como, cambios en la temperatura, en el pH y otros estímulos que pueden ser nocivos. Estas proteínas resultaron ser canales iónicos que permiten que las células del sistema nervioso periférico y central respondan a éstos estímulos. En el año de 1977 se describió una mutante de la mosca *Drosophila* que exhibía una respuesta a la luz que se caracterizaba por ser transitoria en vez de sostenida; por lo que se le llamo TRP, que por sus siglas en inglés, significa *Transient Receptor Potential*. (Cosens, et al, 1969; Minke, 1977). En las últimas 2 o 3 décadas, el número de canales que se han incluido dentro de la familia de los TRP, ha aumentado considerablemente. A continuación se describen las características generales de esta familia de proteínas.

## 2) Canales TRP.

Los TRP son canales catiónicos no selectivos, aunque la permeabilidad para diferentes cationes monovalentes o divalentes varía enormemente entre las diferentes isoformas. Aunque se parecen estructuralmente a los canales activados por voltaje, estas proteínas presentan poca sensibilidad a los cambios en el voltaje transmembranal. La estructura terciaria propuesta para los canales TRP se basa en predicciones a partir de su secuencia de aminoácidos; la cual sugiere la presencia de un dominio amino- terminal (N- terminal) y un dominio carboxilo- terminal (C- terminal) en la región intracelular de los canales y seis segmentos transmembranales en cada subunidad. Por su homología con algunos canales de



potasio, se ha sugerido que la región formada por los segmentos S5 y S6 forman el poro o vía de conducción iónica; además, se piensa que la asociación de cuatro de estas subunidades forma un tetrámero, constituyendo así al canal funcional (**Figura 3**) (Clapham, 2001, 2003).



**Figura 3) Estructura terciaria de un canal TRP. A) La combinación de cuatro subunidades forma un tetrámero. B) Esquema de una subunidad del canal TRPV1; la cual posee seis segmentos transmembranales con regiones amino y carboxilo terminales intracelulares y el poro (P) que se forma entre los segmentos S5 y S6.**

Los canales TRP son activados por un ancho rango de estímulos; los cuales pueden ser divididos en tres categorías:

- a) *Activación por un Receptor.* Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y los receptores de tirosina cinasa que activan fosfolipasas C pueden modular la actividad del canal TRP por medio de tres vías: 1) hidrólisis de fosfatidil inositol (4, 5) bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), 2) producción de diacilglicerol (DAG) o 3) producción de inositol (1, 4, 5) trifosfato (IP<sub>3</sub>) y la subsecuente liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular almacenado (Clapham, 1995).
- b) *Activación por ligando.* Los ligandos que activan a los canales TRP pueden ser clasificados como 1) moléculas orgánicas exógenas, incluyendo componentes sintéticos y productos naturales (capsaicina, icilina, 2 – APB); 2) lípidos endógenos o productos del metabolismo de lípidos (diacilglicerol, fosfoinositol, eicosanoides,

anandamida); 3) nucleótidos purínicos (adenina y guanina) y sus metabolitos [adenosin difosfato ribosa (ADP – ribosa),  $\beta$ NAD<sup>+</sup>]; o 4) iones inorgánicos como Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. (Ramsey, *et al.* 2006)

- c) *Activación directa*. Los cambios en la temperatura están acoplados a la apertura de ciertos miembros de los canales TRP y el mecanismo por el cual actúan es aún desconocido. Entre los activadores directos se incluyen los estímulos mecánicos, la temperatura y los cambios en el pH (Vriens, 2004).

Los más de 20 miembros de la familia de los TRP hasta ahora descritos se encuentran agrupados en siete subfamilias (**Figura 4**): canónicos (*TRPC*), de tipo vaniloide (*TRPV*), los melastatina (*TRPM*), las mucolipinas (*TRPML*) los polycistinas (*TRPP*), la proteína 1 transmembranal anquirina (ANKTM1 o *TRPA*) y el TRPN (mecanoreceptor C) (Clapham, 2003).

De las distintas familias de canales TRP que existen, la mejor descrita en cuanto a sus funciones fisiológicas y a la naturaleza de sus activadores es la subfamilia **TRPV** (“vaniloide”). Dentro de esta subfamilia se encuentran los canales TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 y TRPV6. Entre estos canales catiónicos no selectivos, encontramos que el TRPV 1, 2, 3 y 4 son termosensibles (Benham, 2002). De manera general, se expresan en células de la raíz del ganglio dorsal (DRG), en el Trigémino (TG), nervios periféricos, en la espina dorsal, al igual que en múltiples tipos de células, en algunas regiones del cerebro, en varios tejidos incluyendo células del músculo liso, el riñón, intestino, etc.

Entre las peculiaridades que presentan dichos canales encontramos que, el TRPV2 presenta el 50% de homología en su secuencia de aminoácidos con el TRPV1, que es activado por temperaturas nocivas (>53°C) y que también se activa por factores de crecimiento; tales como el factor de crecimiento de insulina 1 (IGF – 1).

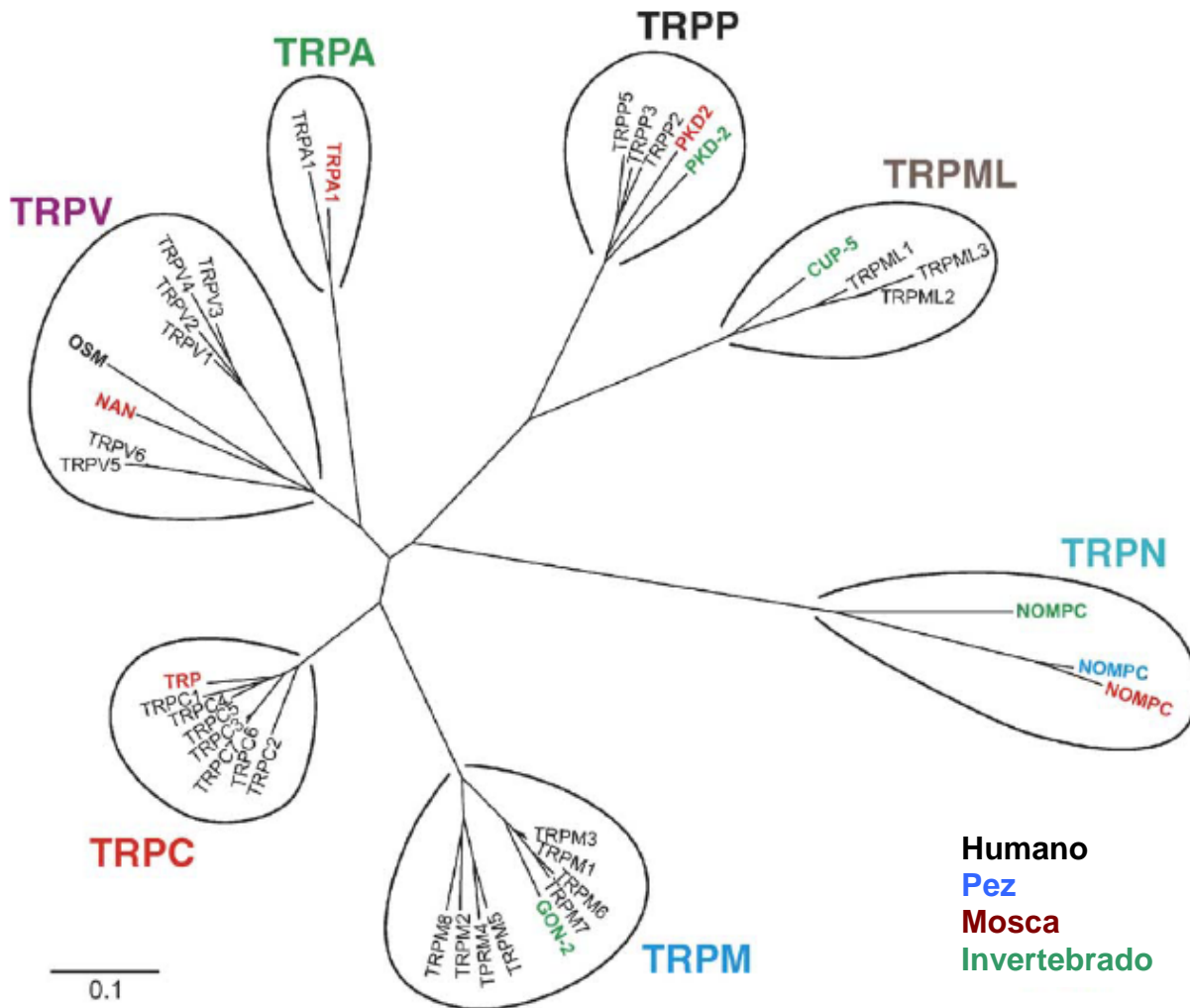


Figura 4) Árbol filogenético de la familia de TRP. La distancia evolutiva se muestra por el largo de las ramas que fue calculado por análisis filogenéticos de mutaciones puntuales (PAM). Tomada de Stine et al. 2005

El TRPV2 se ha descrito como un canal activado por estiramiento; regula la hipotonicidad y el estiramiento incrementado por el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de las células del músculo liso vascular. Juega un papel importante en el músculo esquelético, en la degeneración del músculo cardíaco y en la vía del dolor (Kanzaki, 1999).

El TRPV3 se expresa en neuronas DRG, en el TG, cerebro, queratinocitos, en la lengua y en testículos, se activa por temperaturas inocuas, alrededor de 30 – 33°C, y por productos naturales, tales como el linimento (preparación de aceites); el cual es un ungüento que se

aplica en la piel. Dicho canal puede coensamblarse con el TRPV1 y formar un heterómero funcional (Smith, *et al* 2002).

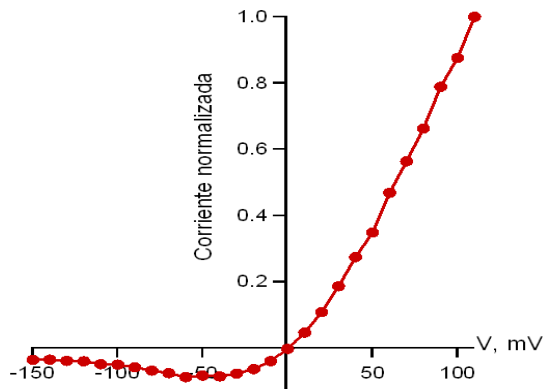
El TRPV4 se expresa en el cerebro, en las neuronas DRG y en múltiples tipos de células periféricas excitables y no excitables. Se activa por diversos estímulos, incluyendo la temperatura, alrededor de  $>24^{\circ}\text{C}$ , por la hinchazón de las células, estrés, endocannabinoides y ácido araquidónico. Las funciones fisiológicas del TRPV4 incluyen la termosensación central y periférica, la mecanosensación (incluyendo la respuesta que proviene de células endoteliales), osmosensación y la homeostasis basal del  $\text{Ca}^{2+}$ . (Watanabe, *et al* 2002).

EL TRPV5 y 6 se expresan mayoritariamente en el riñón y en el intestino, respectivamente, donde juegan una función importante en la reabsorción de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ambos canales son regulados por el  $\text{Ca}^{2+}$  ya que son inactivados por este ión extracelular a potenciales hiperpolarizantes. Conducen al  $\text{Ca}^{2+}$  por debajo de las concentraciones fisiológicas normales, pero en ausencia del mismo en la parte extracelular, son capaces de conducir cationes monovalentes. Tanto el TRPV5 como el TRPV6 son dependientes del voltaje y se bloquean por  $\text{Mg}^{2+}$  extracelular. La calmodulina (CaM) se une directamente a ambos canales y se ha demostrado que puede estar involucrada en la activación del canal TRPV6 (Lambers, *et al* 2004).

### 2.1) El canal TRPV1: Nuestro modelo experimental.

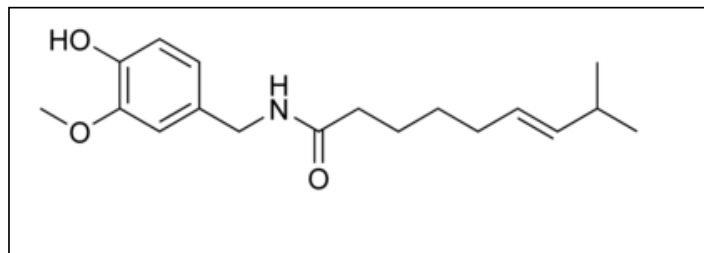
De ahora en adelante, me enfocaré en un miembro de la subfamilia de los canales TRPV, el canal TRPV1 (Caterina *et al.*, 1997). Este canal, además de responder a temperaturas altas en el rango nocivo, se encuentra involucrado en procesos de dolor e inflamación (Clapham, *et al*, 2003). El TRPV1 fue el primer miembro de la familia de los canales TRP en ser identificado en mamíferos, y uno de los que ha sido más estudiado. Se identificó por primera vez en neuronas DRG y TG, es expresado ampliamente en neuronas sensoriales periféricas, así como en varias células no neuronales, en algunas partes del cerebro y en el tracto gastrointestinal y en el páncreas. (Clapham, *et al* 2001).

El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo con preferencia al  $\text{Ca}^{2+}$ . Es un canal rectificador saliente (**Figura 5**) ya que la corriente en el cuadrante positivo del voltaje es mucho más prominente que la del cuadrante negativo del voltaje. La permeabilidad a cationes divalentes en el TRPV1 depende de un residuo, el ácido aspártico, que se encuentra en la región del poro de dicho canal (Garcia-Martinez, 2000).



**Figura 5)** El canal TRPV1 es un rectificador saliente. Relación corriente a voltaje obtenida a partir de un parche en la configuración de “inside-out” de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o patch-clamp. La corriente invierte a 0 mV dado que las soluciones de registro son isométricas. Nótese como la corriente en el cuadrante negativo del voltaje es menor con respecto a la corriente del en el cuadrante positivo del voltaje

El TRPV1 es activado por componentes vaniloides; tales como, la capsaicina que se encuentra en diversas variedades de plantas del género *Capsicum*; por el olvanil que es un análogo de la capsaicina (**Figura 6**) y por la



**Figura 6)** Estructura química de la Capsaicina

resiniferatoxina, que es un compuesto altamente irritante que se extrae del latex de la planta *Euphorbia resinifera*. Este canal también responde a los cambios en la temperatura ( $\geq 43^\circ\text{C}$ ). Más aún, el canal responde a bajo pH ( $\leq 5.9$ ) a la anandamida y a los eicosanoides (Montell., 2002).

## 2.2) Regiones estructurales importantes para la regulación de la función del canal TRPV1.

Como se mencionó anteriormente, se piensa que el canal TRPV1 funcional es un tetrámero y que cada subunidad está formada por seis segmentos transmembranales con regiones N – y

C – terminales intracelulares y un asa entre los segmentos S5 y S6 que forma el poro o vía de conducción iónica (**Figura 3**) (Clapham *et al.*, 2001). Dicha topología ha sido reportada en varios canales iónicos, incluyendo a los canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos, los canales de K<sup>+</sup> activados por voltaje (Shaker) y los canales activados por hiperpolarización. El TRPV1 contiene, por lo menos, 3 dominios de unión a anquirina en la región N –terminal con aproximadamente 33 residuos. Se ha reportado que la CaM se une a dichos dominios de anquirina; en especial al primer dominio (**Figura 7**) (Rosenbaum, *et al.* 2004).

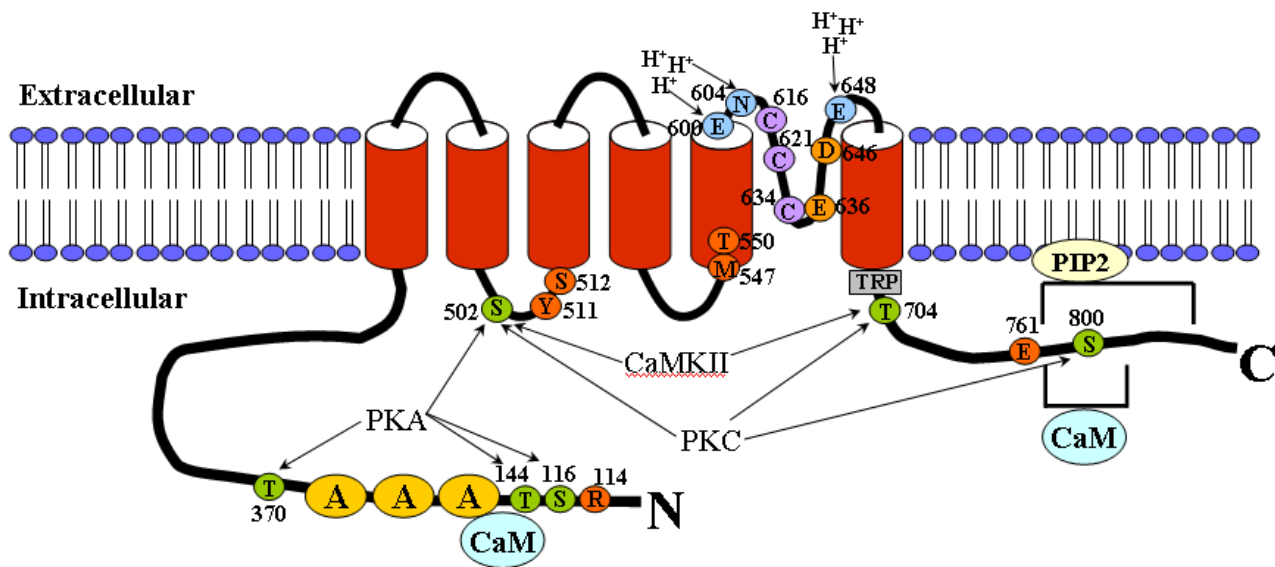


Figura 7) Topología del canal TRPV1. Esquema de una subunidad única; en la cual se muestran los repetidos de anquirina indicados por una "A", residuos susceptibles a la fosforilación en verde, dos regiones de unión a calmodulina en el C – terminal y N – terminal indicados por "CaM". Los residuos azules en la "asa – P" representan aminoácidos protonables, los residuos de cisteínas en esa misma asa, son susceptibles a la reducción y son indicados por el color morado. El sitio de unión a PIP<sub>2</sub> se encuentra en el C – terminal al igual que el dominio de la caja de TRP. *Modificada de Ferrer – Montiel et al. 2004 y Tominaga y Tominaga, 2005. En: TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signalling cascades.*

Se ha reportado que el dominio que confiere sensibilidad a los compuestos vaniloides se encuentra en el asa intracelular que conecta a los segmentos S2 y S3; los aminoácidos tirosina 511 (Y511) y serina 512 (S512), que se encuentran en dicha asa, se han identificado como los determinantes estructurales críticos para la unión de la capsaicina con el TRPV1.

Por otro lado, también se encontró en estudios que involucran deleciones en el TRPV1 y la construcción de quimeras entre el TRPV1 y el TRPV2, que la arginina 114 (R114), y el ácido glutámico 761 (E761) en el N- y C- terminales, respectivamente, están involucrados en el reconocimiento del agonista (Jung, *et al* 2002).

En la región del poro se encuentran los residuos ácidos, E636 y el ácido aspártico 646 (D646) que se encuentran en el asa (*P*) del TRPV1 y que son los responsables de las propiedades de permeabilidad del canal (García-Martínez *et al.*, 2000). Al igual que los residuos anteriores, la metionina 644 (M644) también modula las propiedades de permeabilidad del canal.

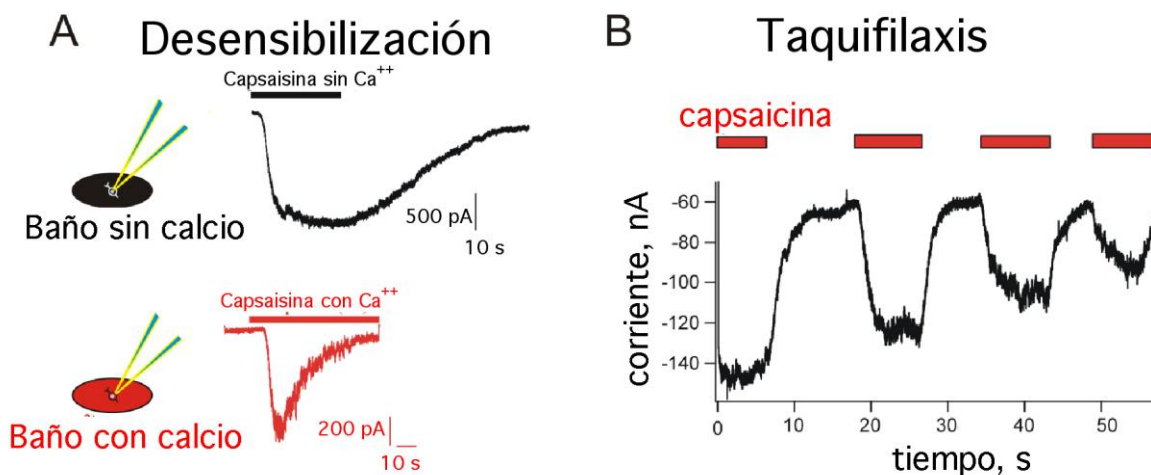
Además de que el poro funciona como la vía de conducción de iones, contiene cierto aminoácido que interactúa con los protones del medio externo, logrando con esto que el canal se active ante pH bajo. Análisis basados en mutaciones en el asa del poro en el TRPV1, han revelado que los aminoácidos E600 y E648, sirven como sitios reguladores para la activación del canal TRPV1 por los protones. La acidificación del medio extracelular tiene dos efectos primordiales sobre la función del TRPV1; el primero es que, los protones extracelulares incrementan la potencia de los agonistas (la temperatura y la capsaicina). El segundo es que, los protones extracelulares pueden, por si mismos, ser considerados agonistas del canal ya que la acidificación (por debajo de un pH<6) lleva a la apertura del canal a una temperatura ambiente. Los protones extracelulares, se cree que actúan, primordialmente, incrementando la probabilidad de apertura del canal, en lugar de alterar la conductancia unitaria o la interacción directa con el sitio de unión a compuestos vaniloides (Tominaga, *et al* 2004).

Otra región importante para la función del TRPV1 es la región del carboxilo terminal la cual se encuentra en la parte intracelular del canal, contiene un sitio de unión a PIP<sub>2</sub>; el cual juega un papel clave en la sensibilidad del receptor por la capsaicina y otros sitios que le permiten interactuar con la proteína cinasa C (PKC) y la cinasa CAM II (Julius, *et al* 2001). Estudios de

la relación que existe entre la estructura y la función le han atribuido al C- terminal un importante papel en la inducción de procesos de inflamación; así como de ser el responsable de la sensibilidad a la temperatura. (R. Latorre, *et al.* 2007)

### 2.3) Regulación de la función del canal TRPV1 por $\text{Ca}^{2+}$ .

El canal TRPV1 presenta un par de procesos biofísicos que han sido ampliamente estudiados: la *desensibilización aguda* y la *taquifilaxis*. La *desensibilización aguda* se caracteriza por que la respuesta del canal se reduce gradualmente ante estímulos prolongados con el agonista. Dicha desensibilización se da en presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular debido a la interacción que tiene el canal con la CaM que se activa por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Recientemente, se determinó que la calmodulina se encuentra constitutivamente unida al TRPV1 y al entrar el  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal, se promueve la activación de la CaM dando lugar a un cambio conformacional que produce el cierre del mismo (Rosenbaum *et al.* 2004) (**Figura 8, A**). La *taquifilaxis* se caracteriza por una disminución en la respuesta del canal ante aplicaciones cortas pero sucesivas del agonista (**Figura 8, B**). Este fenómeno también depende de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Caterina *et al.* 1997).



**Figura 8)** El canal TRPV1 presenta desensibilización aguda y taquifilaxis. **A)** Fenómeno de desensibilización aguda; ya sea con  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución del baño (arriba) o soluciones libres del mismo y EGTA (abajo). **B)** Taquifilaxis con  $\text{Ca}^{2+}$  en el baño.



#### 2.4) Importancia del canal TRPV1 en procesos inflamatorios.

Otro proceso de aspecto importante de la fisiología del canal TRPV1 es que participa en algunos procesos inflamatorios. Existen dos tipos de mecanismos esenciales de activación del TRPV1 por la inflamación. El primero es por mediadores inflamatorios tales como la bradiquina, el NGF (factor de crecimiento neuronal), el ATP o por la prostaglandina E2. Estos agentes activan a sus respectivos receptores expresados en terminales periféricas de neuronas sensoriales primarias. La activación de esos receptores induce la activación de mensajeros intracelulares; tales como proteína cinasa A (PKA), PKC y la fosfolipasa C (PLC), los cuales activan al canal TRPV1 a través de la reducción del umbral de la temperatura de dicho canal (Chiang, *et al* 2001b; Liang, *et al* 2001). El segundo mecanismo propuesto para la activación del TRPV1 por procesos inflamatorios es que hay ligandos endógenos que activan al receptor. Sin embargo, la eficiencia y potencia de los ligandos endógenos, es baja y se ha debatido si las concentraciones *in vivo* pueden ser concentraciones lo suficientemente altas para poder activar al TRPV1. No obstante, diferentes activadores del TRPV1 tales como la temperatura, los protones, y varios ligandos potencian el efecto de otros; por lo que, estudios recientes sobre la activación del TRPV1 por medio de anandamida sugieren que la acción de varios activadores podrían ser los responsables de la activación del TRPV1 en condiciones inflamatorias (Ahluwalia, *et al* 2003a). Dicha hipótesis es apoyada por datos que muestran que la concentración de ligandos endógenos del TRPV1; tales como la anandamida es incrementada en tejidos inflamados y que la inflamación activa a la PKC (Zhou, *et al* 2003).

#### 2.5) Activación del canal TRPV1 por agentes irritantes y agentes que modifican cisteínas.

Más recientemente, se han realizado estudios en los que se ha descubierto que ciertos compuestos como la alicina que se encuentra en el ajo y en la cebolla, activan al TRPV1 por un mecanismo que aún no se ha dilucidado completamente.

El compuesto “alin” que proviene del ajo se convierte en alicina por la enzima alinasa después de que el ajo es magullado, cortado o machacado. La alicina es un componente inestable; el cual se puede convertir fácilmente, a través del tiempo o después de haberla

calentado, a una gran variedad de componentes estables que contienen sulfuro; incluyendo el dialil-sulfuro, dialil-disulfuro y el dialil-trisulfuro (Amagase, *et al* 2001). Estudios recientes han demostrado que si se eliminan los compuestos pungentes del extracto del ajo calentándolo a cierta temperatura y por un tiempo determinado, este se vuelve incapaz de activar al TRPV1 (Macpherson, 2005).

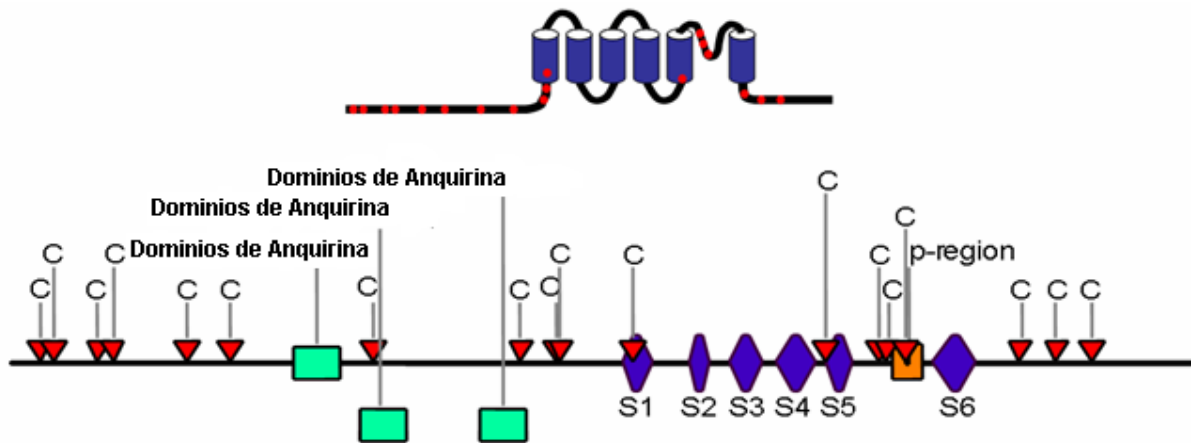
Existe muy poca información en la literatura acerca del mecanismo que permite que la alicina active al canal TRPV1. Recientemente, se describió que el mecanismo que usan los compuestos que se encuentran en la mostaza y en el ajo funcionan como agentes que modifican residuos de cisteínas para activar a algunos canales TRP (Macpherson, *et al.* 2005, 2007).

Como ya se ha mencionado, los canales TRP son sensores polimodales de estímulos físicos y químicos que se encuentran involucrados en numerosas funciones fundamentales de la célula. Sin embargo, pese a que los canales TRP tienen funciones muy importantes en los organismos vivos y a que juegan papeles esenciales en la respuesta a diversos estímulos del medio ambiente, casi no sabemos nada de su estructura ni de cuales son los mecanismos moleculares que permiten que sean capaces de traducir los estímulos del medio ambiente en una respuesta celular.

En comparación con lo que se sabe acerca de la estructura y la función de los otros canales iónicos, la información que se tiene acerca del poro, el filtro de selectividad, la compuerta de activación y el sensor de voltaje de los canales TRPV es muy limitada; por dicha razón se han utilizado técnicas tales como mutagénesis dirigida, agentes que modifican cisteínas, etc., para poder obtener información sobre los eventos celulares y moleculares que subyacen a la detección de estímulos como cambios en la temperatura y en la acidez del medio. Así mismo, estas herramientas han sido usadas para estudiar la naturaleza de los eventos moleculares que subyacen a los procesos de detección de estímulos dolorosos que son procesos indispensables para la supervivencia de los organismos.

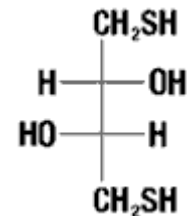
Se sabe que la oxidación y la reducción de los residuos de cisteínas pueden producir efectos fisiológicos importantes. Por ejemplo, algunos compuestos reductores modifican la actividad de los receptores NMDA (Aizenman, *et al* 1989), GABA<sub>A</sub> (Amato, *et al* 1999), canales

activados por nucleótidos cíclicos (Rosenbaum, *et al* 2002a) y varios canales activados por voltaje. Esto se vuelve interesante si tomamos en cuenta que el canal TRPV1 tiene 18 cisteínas en su secuencia de aminoácidos (**Figura 9**).



**Figura 9)** Esquema de la secuencia primaria del canal TRPV1 en donde las 18 cisteínas se representan con triángulos y con la letra C.

Esto ha llevado a algunos grupos de investigación a estudiar si la actividad de este canal puede ser regulada por dichas cisteínas cuando son tratadas con ditioneitol (DTT) (**Figura 10**), un agente que mantiene los grupos sulfhidrilo en el estado reducido.



**Figura 10)** Formula química del DTT.

Existen experimentos que muestran que el DTT facilita las corrientes membranales a través del canal en neuronas DRG debido a su interacción con tres residuos de cisteínas que se encuentran en el asa que forma al poro (Vyclicky, *et al* 2002).

3) Estrategias experimentales que se han diseñado para el estudio de las relaciones existentes entre la estructura y la función de los canales iónicos.

La cristalografía de proteínas y, en particular de proteínas multiméricas transmembranales, es una técnica difícil que no siempre se puede realizar con éxito para todos los canales

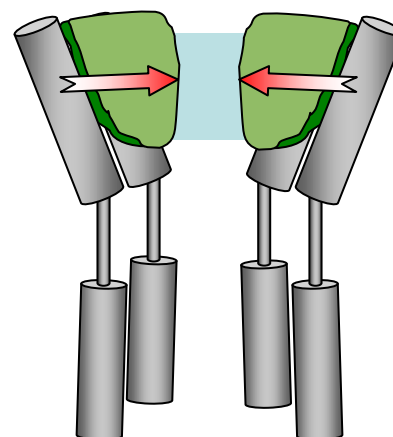
iónicos. Por esta razón, se han diseñado métodos de modificación química y de mutagénesis dirigida que nos han permitido determinar la contribución de cada región para la función del canal, y en conjunto han generado un avance considerable en el conocimiento de la relación estructura a función de algunos canales iónicos.

El uso de canales mutantes sin cisteínas aunada al uso de reactivos que promueven la modificación de las mismas, como por ejemplo los agentes MTS (de la familia de los metano-tiosulfonatos) han sido ampliamente utilizados para llevar a cabo experimentos para estudiar la relación entre la estructura y la función en los canales iónicos (Yellen, 2002).

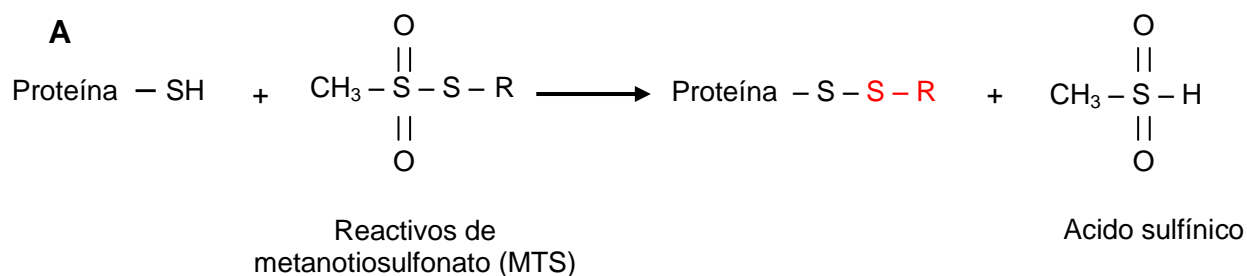
A continuación se menciona un ejemplo de la utilidad de esta técnica ya que el reemplazo de las cisteínas por otros aminoácidos y su inserción en diferentes sitios a lo largo del segmento transmembranal S6 ha permitido determinar dónde se encuentra específicamente la compuerta de activación de los canales activados por nucleótidos cíclicos. Los experimentos consistieron en aplicar los agentes MTS en presencia o en ausencia del ligando. Es decir, cuando el canal está cerrado o abierto. La idea es que si la accesibilidad de los agentes que modifican cisteínas cambia dependiendo de los estados abierto y cerrado del canal, entonces quiere decir que esa cisteína que fue insertada en el canal se encuentra en una región que sufre cambios conformacionales durante el proceso de activación del mismo volviéndola accesible o inaccesible a los compuestos conforme el canal se abre o se cierra.

Lo que se encontró en los canales activados por nucleótidos cíclicos fue que la accesibilidad a la modificación de estas cisteínas por agentes MTS no discrimina entre los estados abierto y cerrado del canal a lo largo del segmento S6 hasta antes del filtro de selectividad. Esto indica que, a diferencia de los canales de  $K^+$ , la región intracelular del S6 no se comporta como una compuerta de activación y que, muy probablemente, la compuerta de activación en los canales activados por nucleótidos cíclicos se encuentra en la región del filtro de selectividad (Flynn, 2003) **(Figura 11)**.

Figura 11) La compuerta de activación de los canales activados por nucleótidos cíclicos se encuentra en el filtro de selectividad (indicado por las flechas).



Típicamente, los agentes MTS más comúnmente utilizados son: el 2-aminoetil metanotiosulfonato (MTSEA); el 2 - trimetil - amonio etil metanotiosulfonato (MTSET) y el sodio 2-etilsulfonato metanotiosulfonato (MTSES) (**Figura 12, B**) (Holmgren, *et al.* 1996). Lo que hacen dichos agentes es interaccionar con los residuos de cisteína donde se forman puentes disulfuro entre el grupo sulfhidrilo de una cisteína, que se encuentra en el canal iónico y el grupo tiosulfonato del agente MTS (**Figura 12, A**). Además, dependiendo del tipo de agente MTS que se utilice, la carga y el volumen de dicha cisteína se ve afectada promoviendo que se modifique la rigidez de la región en la que se encuentra la cisteína. Si la cisteína modificada se encuentra en una región importante para la función del canal, entonces se promoverá un cambio en la actividad del mismo.



**Figura 12) Estructura química de los agentes MTS. (A) Reacción química de la formación de un puente disulfuro entre una cisteína y el agente MTS. (B) Estructuras químicas de los diferentes agentes MTS.**

Finalmente, cabe mencionar que para propósitos del trabajo de investigación que se presenta en esta tesis, en los últimos meses se ha generado en el laboratorio, un canal TRPV1 en el que las cisteínas de la secuencia primaria fueron reemplazadas por otros aminoácidos. Como se mencionará en las siguientes secciones, dicho canal sin cisteínas, no sólo ha proveído de información acerca de los residuos importantes para la respuesta del canal TRPV1 ante ciertos estímulos sino que será de gran utilidad para estudiar otros aspectos de la relación que existe entre la estructura y función del canal.

## **Objetivo general**

Pese a que los canales TRP tienen claras e importantes funciones en la fisiología de los organismos, se conoce muy poco acerca de los detalles estructurales de estas proteínas y de cómo se relaciona la estructura con la función de las mismas. De esta forma, el objetivo general de nuestro laboratorio es dilucidar algunas características funcionales y estructurales del canal TRPV1, al cual utilizamos como modelo de estudio de los canales TRP.

### *Objetivos particulares:*

1. Caracterizar en detalle los efectos de los agentes que modifican cisteínas (por ejemplo, los MTS) sobre la actividad del canal TRPV1.
2. Determinar cuáles son las cisteínas que se modifican por agentes MTS en el canal TRPV1.
3. Probar y caracterizar los efectos de extractos de cebolla y ajo, que contienen agentes que modifican cisteínas, así como los efectos del compuesto activo alicina sobre la función del canal TRPV1.
4. Determinar que cisteína(s) del canal TRPV1 se modifica(n) por la presencia de los extractos de ajo, cebolla y de la alicina.

## **Hipótesis**

Otros grupos han descrito que el canal TRPV1 responde a agentes reductores que modifican cisteínas. Los datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la aplicación de agentes MTS a parches de membrana que expresan al canal TRPV1 son capaces de promover cambios en la función del mismo. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que algunos compuestos que se encuentran en los extractos de algunos vegetales serán capaces de promover la activación del canal TRPV1 por medio de la modificación de cisteínas en su secuencia primaria importantes para su función.



## **Metodología**

### a) *Cultivo celular*

Se decidió utilizar a la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney-293 cells*) como modelo de expresión heteróloga porque poseen muy pocas corrientes iónicas endógenas que puedan hacer que los resultados sean difíciles de interpretar.

Las células se crecieron en monocapas sobre cajas de Petri de plástico de 100mm de diámetro (Corning) en las siguientes condiciones: atmósfera saturada de agua y compuesta por 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. La composición del medio de cultivo fue: 90% de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.5% de Penicilina–Estreptomina y 1% de aminoácidos no esenciales. Todos los productos químicos para el cultivo y mantenimiento de las células se obtuvieron de GIBCO–Invitrogen (Carlsbad, CA).

Dos veces por semana (cuando la monocapa de células se encontraba entre el 85 y 95% de confluencia), las células fueron despegadas agregándoles 1ml de una solución de tripsina–EDTA precalentada (GIBCO), y se disociaron mecánicamente mediante la utilización de pipetas serológicas de 5ml. Las células fueron sembradas a una densidad aproximadamente 50 veces menor en una caja de Petri nueva. A su vez, esta misma suspensión celular permitió sembrar las células sobre pequeños cuadros de vidrio estériles en cajas de Petri de plástico de 35mm de diámetro, empleados para el registro electrofisiológico. Las células sembradas en los cuadros de vidrio se mantuvieron en incubación, con las mismas condiciones que ya se mencionaron arriba. Al día siguiente, las células sembradas sobre vidrio, se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamina (Invitrogen), como se explica más adelante en esta sección de Métodos, y se utilizaron para el registro electrofisiológico después de 24 horas.

## b) Generación de mutantes

La técnica de mutagénesis dirigida (**Figura 13**) consiste en reemplazar o insertar uno o varios aminoácidos que se encuentran en la secuencia del canal por otro aminoácido nuevo. Para fines de esta tesis, se reemplazaron las cisteínas por otros aminoácidos similares con el fin de obtener un canal TRPV1 sin cisteínas (mutaciones acumulativas) y canales en donde solo se mutó una cisteína a la vez (mutaciones individuales).

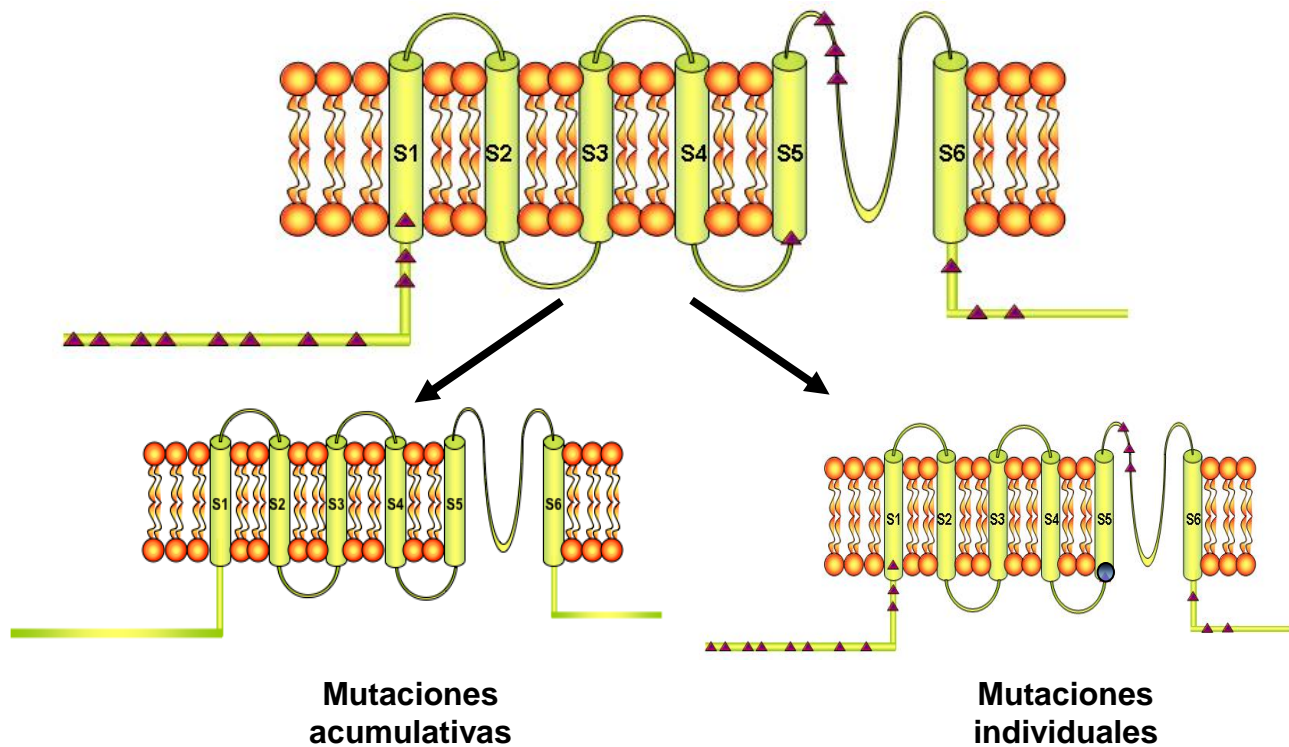


Figura 13) Esquema de la técnica de mutagénesis dirigida en donde se muestra que a partir de ella se pueden generar mutaciones acumulativas en donde se han substituido todas las cisteínas en un solo canal (panel inferior izquierdo) o bien mutaciones individuales o puntuales (panel inferior derecho).

Para generar cada mutante, se diseñaron un par de oligonucleótidos (uno directo y otro complementario) con ayuda del programa VectorNTI; los cuales contenían la secuencia de aminoácidos que, por medio de una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), insertaron tanto la mutación deseada en la secuencia silvestre del canal TRPV1 como un sitio de restricción nuevo que sirvió como diagnóstico para saber si la mutación fue insertada correctamente. Además, se diseñaron otro par de oligonucleótidos ubicados en los extremos de la región a amplificar para obtener cadenas de ADN con la mutante deseada. Una vez que se realizó dicha PCR se tomó una muestra de esa PCR, que contiene el ADN mutado, y se realizó una segunda PCR para amplificar el número de copias del ADN mutado (**Figura 14**).

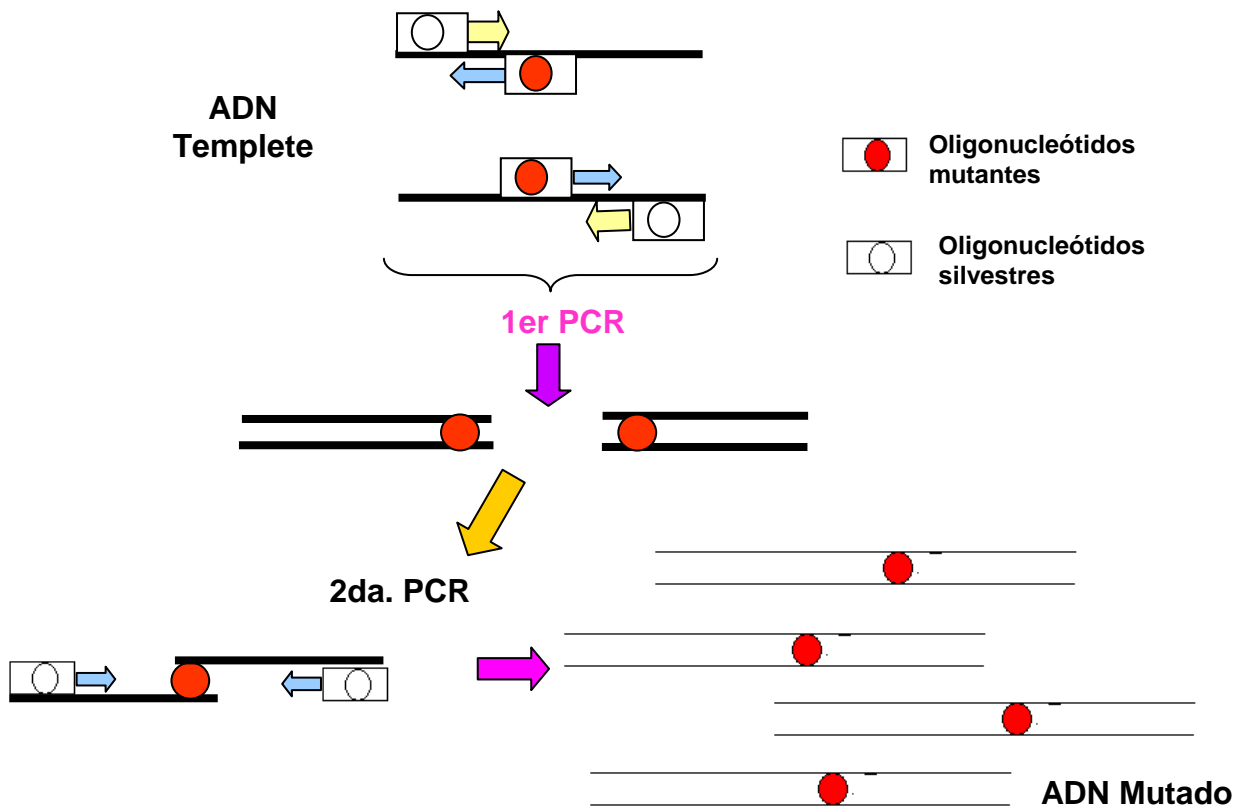


Figura 14) Técnica de mutagénesis. Por medio de la primer PCR, se insertó la mutación deseada y con la segunda PCR se obtuvieron varias copias de las hebras mutadas.

Una vez que se obtuvo el ADN mutado, se escogieron dos enzimas de restricción que cortaran solo en un sitio del canal en donde se insertaría la mutación. Una vez que se cortaron el ADN mutado obtenido por PRC y el canal silvestre (proceso que llamamos digestión), se separaron los fragmentos de la PCR con la mutación (inserto) y el fragmento del canal en el vector de expresión (vector) en un gel de agarosa al 0.8%. Ambos fragmentos se unieron con ayuda de una ADN ligasa a temperatura ambiente por toda la noche; con lo cual se obtuvo un plásmido con un canal mutante (**Figura 15**). Con este mismo protocolo se realizaron todas las mutaciones necesarias para obtener el canal TRPV1 sin cisteínas.

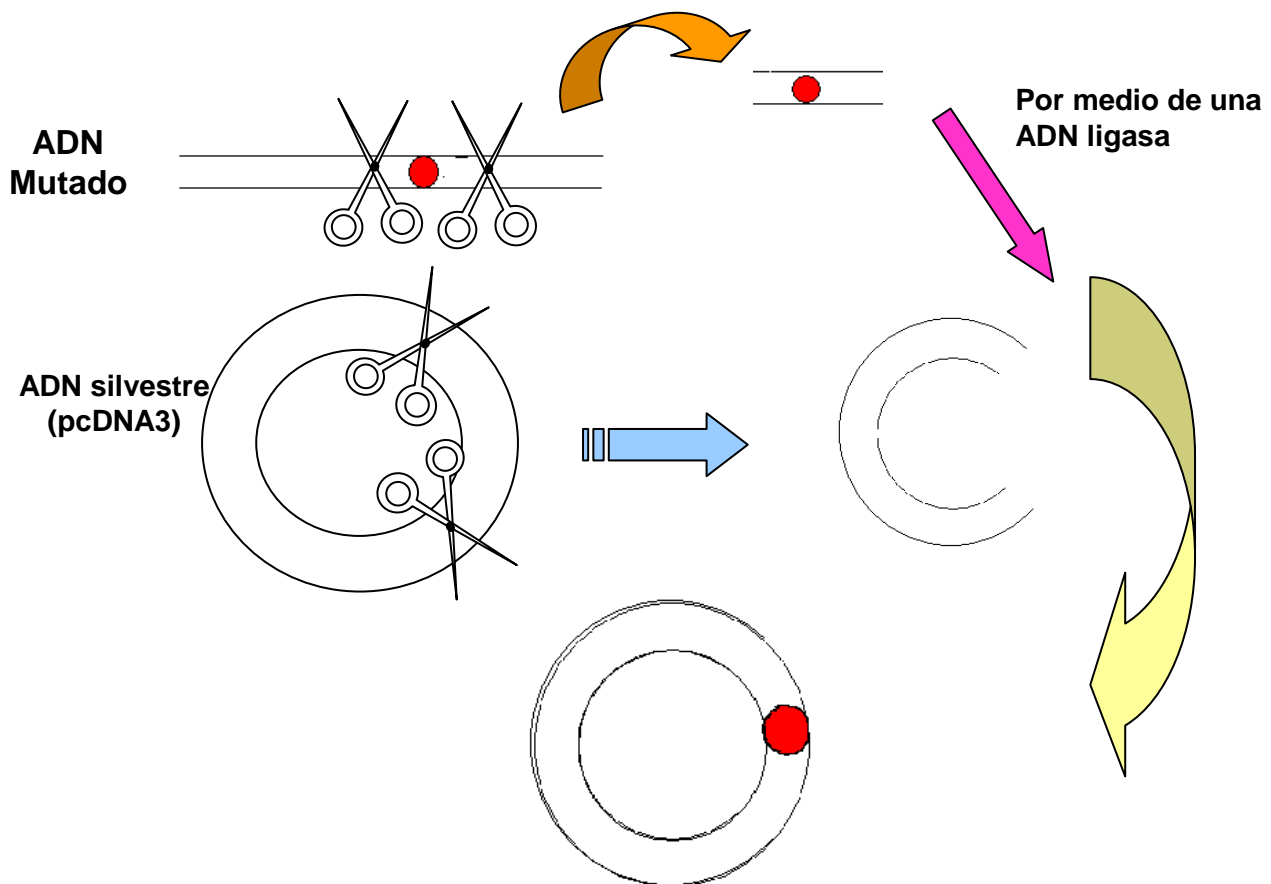


Figura 15) Digestión y ligación del ADN mutado y el ADN silvestre.

Una vez que se obtuvo el plásmido con el canal mutante, se transformaron células competentes (bacterias *E. coli*) por medio de un choque de calor. Las bacterias se sembraron

en cajas de agar con el antibiótico para selección y se cultivaron a 37°C toda la noche. En general, el vector de expresión que se usó poseía resistencia a ampicilina así que las cajas de agar contenían a este antibiótico para seleccionar aquellas colonias que hubieran adquirido al plásmido de interés. Finalmente, al día siguiente se crecieron colonias de bacterias en medio de cultivo LB (10 g. de Triptona, 5g. de extracto de levadura, 5 g. de NaCl, 1ml de 1N NaOH y 15 g. de agar) y se extrajo el ADN usando sistemas para extracción de ADN de la marca Qiagen.

Los diferentes tipos de ADN generados fueron transfectados en las células HEK293 como se describe a continuación.

### c) *Transfección de las células*

Se utilizó el reactivo Lipofectamina para transfectar transitoriamente a las células HEK293 con dos plásmidos de tipo pcDNA3: uno que contiene el ADN que codifica para el canal TRPV1 (o sus mutantes) y uno que contiene el ADN que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, BD Biosciences, San Jose, CA). La ventaja de transfectar con GFP es que aquellas células que presentan fluorescencia, normalmente también expresan al canal de interés (**Figura 16**). En general, se agregaron 500 ng del ADN que codificaba para el canal y 500 ng de ADN que codificaba para la GFP y se mezclaron con 5 µl de Lipofectamina en medio sin suero ni antibióticos (medio sin aditivos). La mezcla se incubó durante 45 minutos antes de agregarla a las cajas de Petri 35 mm en donde previamente se habían incubado las células en medio sin aditivos. La transfección se incubó a 37°C durante 6 horas y después se reemplazó el medio por medio con suero y antibióticos. Las células fueron registradas después de 24 horas de la transfección.



**Figura 16)** Transfección conjunta de proteína verde fluorescente en una célula HEK293 transfectada con GFP y TRPV1.

#### d) *Electrofisiología*

Los registros electrofisiológicos se realizaron con la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *Patch-Clamp*; la cual fue introducida por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976 y que les mereció el premio Nobel. No está la cita en las referencias.

Dicha técnica presenta varias configuraciones para el estudio electrofisiológico de canales iónicos en las células: Cell-attached o parche adherido (**Figura 17, A**), parche escindido (ya sea “Inside-out” o Outside-out”) (**Figura 17, C y D**) y célula completa o Whole-cell (**Figura 17, B**). Para nuestros experimentos usamos mayoritariamente la configuración de *inside-out* que consiste en formar un sello de alta resistencia entre la punta de una pipeta de vidrio, o microelectrodo y la membrana de la célula. Una vez que se tiene dicho sello se jala el microelectrodo de la célula y con esto se logra aislar un pedazo de membrana, o parche, del resto de la membrana de la célula (**Figura 17, D**). Esto tiene como resultado que la cara intracelular del canal quede expuesta a la solución del baño y la cara extracelular quede expuesta a la solución que contiene el microelectrodo. La ventaja que presenta esta configuración es que podemos controlar la naturaleza de las soluciones que se aplican a la cara intracelular del canal.

Todos los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo a temperatura ambiente (19-21°C) usando un amplificador EPC 10 (HEKA Elektronik GMBH, Pfalz, Germany), un microscopio invertido con epifluorescencia (Nikon TE2000), un micromanipulador motorizado MP-225 (Sutter Instruments) y un sistema de recambio de soluciones RSC – 200 (BioLogic, Claix, France). Los datos fueron adquiridos y analizados con el programa PULSE de adquisición de datos (HEKA Elektronik) y fueron graficados y analizados con el programa Igor Pro (Wavemetrics INC. Pórtland, OR).

Los microelectrodos se hicieron a partir de vidrio de borosilicato con una resistencia de entre 2 y 5MΩ.

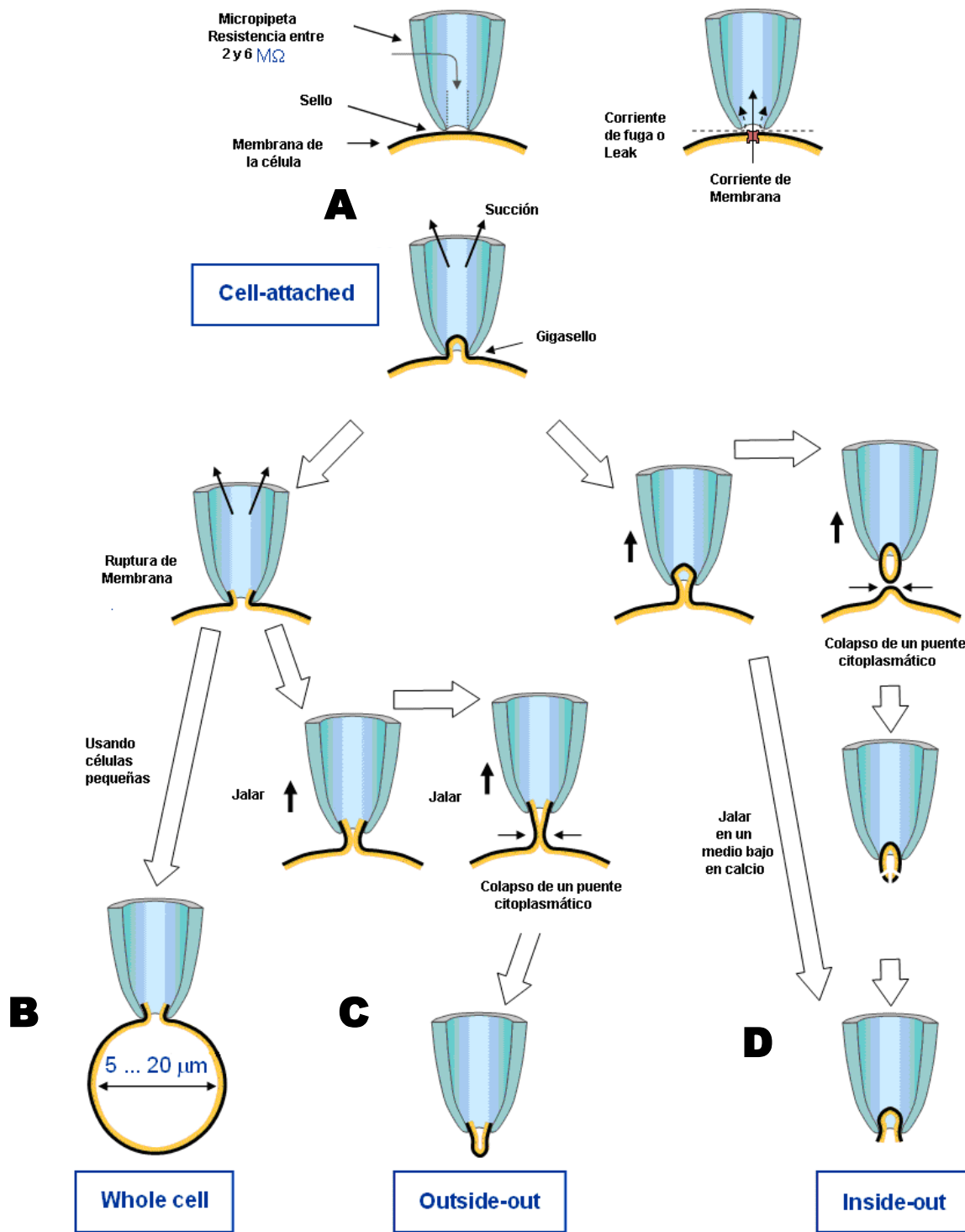


Figura 16) Técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *Patch – Clamp*.

Los protocolos de voltaje con los cuales se obtuvieron las corrientes macroscópicas para construir las curvas corriente a voltaje ( $I-V$ ) se generaron aplicando pulsos de voltaje desde -100 a +100mV, en intervalos de 20 mV con una duración de 100ms para cada pulso desde un potencial de mantenimiento de 0 mV.

También se realizaron experimentos para obtener curvas dosis a respuesta ante distintas concentraciones de capsaicina desde 10 nM hasta 4  $\mu$ M. Estas curvas se obtuvieron antes y después de la aplicación del agente MTS a una concentración de 2 mM; el cual se aplicó durante 2-5 min. Los datos obtenidos a +100 mV se graficaron en función de la concentración de capsaicina y las curvas se ajustaron a la ecuación de Hill:  $I = I_{\max}([capsaicin]^n / (K_D^n + [capsaicin]^n))$  donde  $I_{\max}$  es la corriente máxima,  $K_D$  es la constante de disociación y  $n$  es la cooperatividad que existe entre la unión de la capsaicina y el canal. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  E.S

#### e) *Soluciones de registro*

Todos los registros de Patch-Clamp se hicieron usando soluciones simétricas preparadas de la siguiente manera: solución baja en divalentes NaCl a 130mM, HEPES a 3 mM y EDTA a 1mM; con un pH 7.6.

La solución más concentrada de 4 mM capsaicina (Sigma-Aldrich) fue preparada en etanol puro, diluida a diferentes concentraciones, y aplicada en la parte intracelular del parche para producir la activación del canal.

La solución con los agentes MTSEA y MTSET (Toronto Research Chemicals Inc.) se utilizó a 2mM, a partir de una solución a una concentración de 100 mM preparada con agua. La solución con los agentes fueron preparadas antes de cada experimento ya que estos compuestos son muy inestables. La alicina fue donada por el Dr. R. Argüello-Garcia (CINVESTAV, México) y se utilizó a una concentración de 200  $\mu$ M.



Los extractos de cebolla se obtuvieron moliendo una cebolla entera y 10 gr de ajo con una licuadora manual en 200 y 50 ml de las soluciones de registro que se describen abajo, respectivamente. Las mezclas se centrifugaron a 1600 rpm durante 20 minutos, y el sobrenadante se diluyó en solución de registro (1:100) y se utilizó para activar las corrientes del canal TRPV1 en la configuración de *inside-out*.

La solución del agente reductor ditioneitol o DTT (Sigma – Aldrich) se utilizó a 20 mM a partir de un stock de 1 M y el rojo de rutenium se utilizó a 10  $\mu$ M a partir de un stock a 10 mM.

## **Resultados**

### 1) Efectos de los agentes MTS sobre el canal TRPV1 silvestre.

#### a) *Los agentes MTS funcionan como agonistas.*

Para caracterizar los efectos de los agentes MTSEA y MTSET sobre el canal TRV1 silvestre, se utilizaron parches de membrana de células HEK293 que expresaban al canal y se realizaron curvas dosis a respuesta para la activación del canal por capsaicina. Dichos experimentos consistieron en registrar las corrientes obtenidas al aplicar diferentes concentraciones de capsaicina que iban desde 10 nM hasta 4  $\mu$ M a distintos voltajes. Después de lavar la capsaicina del medio de registro, se les aplicó 2 mM de MTSEA o MTSET, por alrededor de 2–5 min. Y se volvieron a registrar las corrientes obtenidas por las diferentes concentraciones del agonista. Finalmente, se graficó la corriente máxima normalizada obtenida a 100mV antes y después de la aplicación de MTSEA o MTSET en función de distintas concentraciones de capsaicina (**Figura 17**).

Los datos de un compañero de nuestro laboratorio, Andrés Jara Oseguera, indican que el aumento en la corriente promovido por los agentes MTS se debe a un aumento en la probabilidad de apertura del canal en ausencia de la capsaicina (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 18, la aplicación de los agentes MTS no promueve cambios significativos en el grado de rectificación de las curvas corriente a voltaje ( $I - V$ ). Esto implica que el canal retiene su sensibilidad al voltaje (**Figura 18**) ya que el grado de rectificación básicamente no cambia cuando comparamos la curva en presencia de capsaicina antes y después del agente MTS.

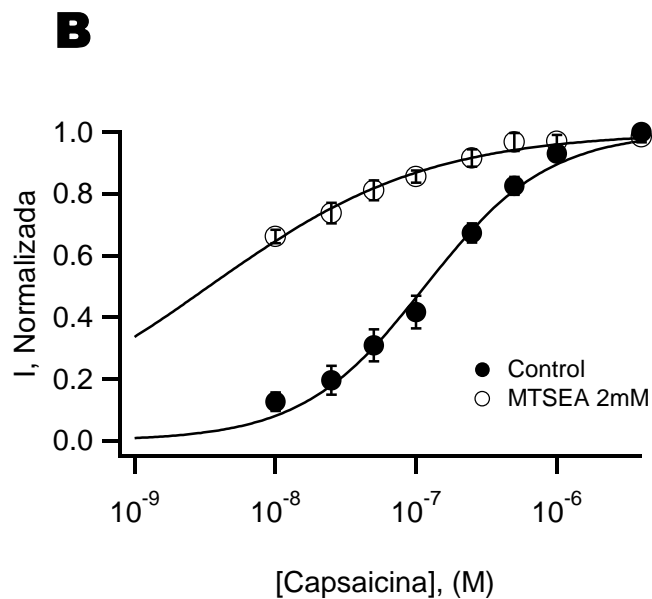
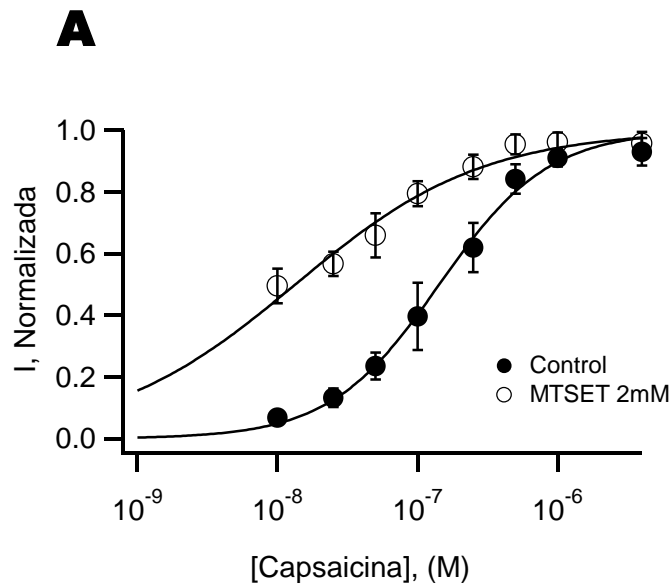
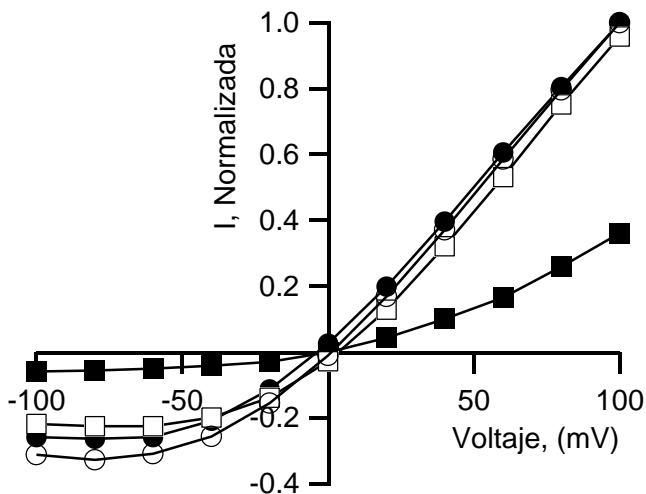


Figura 17) Efecto de los agentes MTS sobre la curva dosis a respuesta para activación del canal TRPV1. Los círculos negros representan la corriente normalizada obtenida a 100 mV en presencia de distintas concentraciones de capsaicina. Los círculos blancos representan la corriente obtenida después del tratamiento con MTSET (A) o con MTSEA (B). Las corrientes fueron normalizadas al valor máximo obtenido en presencia de capsaicina  $4\mu\text{M}$  antes de la aplicación de los agentes MTS. Los valores obtenidos a partir de los ajustes a la ecuación de Hill (líneas continuas) para las constantes de disociación aparentes fueron:  $K_D = 158 \pm 0.5$  nM antes de la aplicación de MTSET y  $8 \pm 0.2$  nM después de la aplicación de MTSET y  $K_D = 124 \pm 0.25$  nM antes de la aplicación de MTSEA y después de la aplicación de MTSEA fueron  $K_D = 4 \pm 0.1$  nM.  $N=5$  para ambas curvas. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  E.S.

**A**

- 50nM Capsaicina
- 4uM Capsaicina
- 50nM Capsaicina después de MTSET 2mM
- 4uM Capsaicina después de MTSET 2mM

**B**

- 50nM Capsaicina
- 4uM Capsaicina
- 50nM Capsaicina después de MTSEA 2mM
- 4uM Capsaicina después de MTSEA 2mM

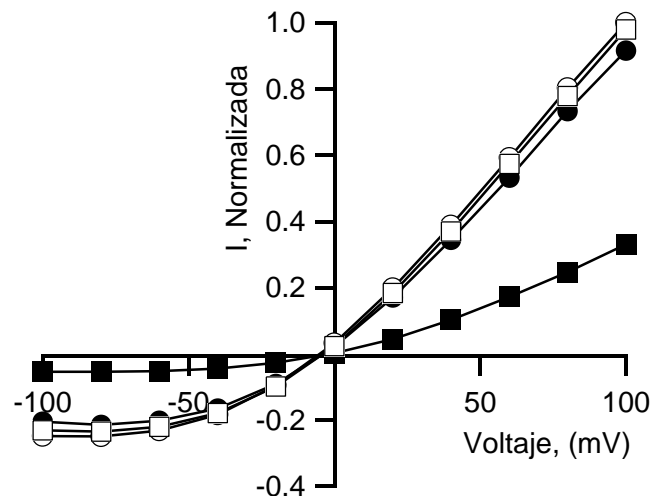


Figura 18) Efectos de los agentes MTSEA y MTSET en el canal TRV1 silvestre. Relaciones  $I$ - $V$  para parches de membrana escindido que expresan al canal TRPV1 silvestre. Las corrientes fueron graficadas a los voltajes que se muestran en presencia de concentraciones subsaturantes (50 nM) y saturantes (4 $\mu$ M) de capsaicina antes y después de la exposición a MTSET (A) y a MTSEA(B). Las corrientes fueron normalizadas al valor máximo para cada curva para mostrar que no hay cambios en el grado de rectificación.

En mi compu se ven raras las letras de  $I$ , normalizada.

b) El efecto del MTSEA sobre el canal TRPV1 se revierte por la aplicación de un agente reductor.

Para saber si el efecto del MTSEA se debe a una modificación de alguna(s) cisteína(s) en la secuencia del canal TRPV1, se utilizó el agente reductor ditioneitol o DTT para promover el rompimiento del puente disulfuro que se forma entre la cisteína y el MTSEA. De esta forma, se registró la corriente sin ligando o corriente de fuga (trazo verde), después se registro la corriente al final de la exposición al MTSEA (trazo azul), donde se observó que la corriente aumentó a valores cercanos al 60-70% de la corriente que activa una concentración

saturante de capsaicina ( $4\mu\text{M}$ ) (trazo negro). Finalmente, se aplicó DTT 20mM y se observó que la corriente disminuyó a valores cercanos a los de la corriente de fuga (trazo amarillo) (**Figura 19, A**). La curva  $I - V$  correspondiente al parche que se muestra en A, revela que el efecto del agente MTSEA sobre el canal se puede revertir al aplicar el DTT (círculos amarillos) (**Figura 19, B**). La aplicación de MTSEA a parches de membrana de células que sólo fueron transfectadas con GFP no indujo la activación de corrientes (**Figura 19, C**). Esto indica que las corrientes endógenas de las células HEK293 no son sensibles a este agente.

Con el objeto de determinar el curso temporal con el que ocurre la modificación del canal TRPV1 en presencia de MTSEA, se diseñó un protocolo de pulsos de voltaje a 100 mV cada 1 seg para determinar el cambio en la magnitud de la corriente después de una aplicación corta de MTSEA. Como se observa en la **Figura 20**, después de 10 segundos de aplicación del MTSEA, la corriente empieza a aumentar y, en menos de 35 segundos, ha alcanzado el estado estacionario. Finalmente, para fines de comparación aplicamos capsaicina a una concentración de  $4\mu\text{M}$  y luego, las corrientes fueron bloqueadas con  $10\mu\text{M}$  rojo de rutenio (RR), un bloqueador inespecífico de los canales TRP. La activación de la corriente por MTSEA se ajustó a una exponencial simple con una  $\tau = 13$  seg.

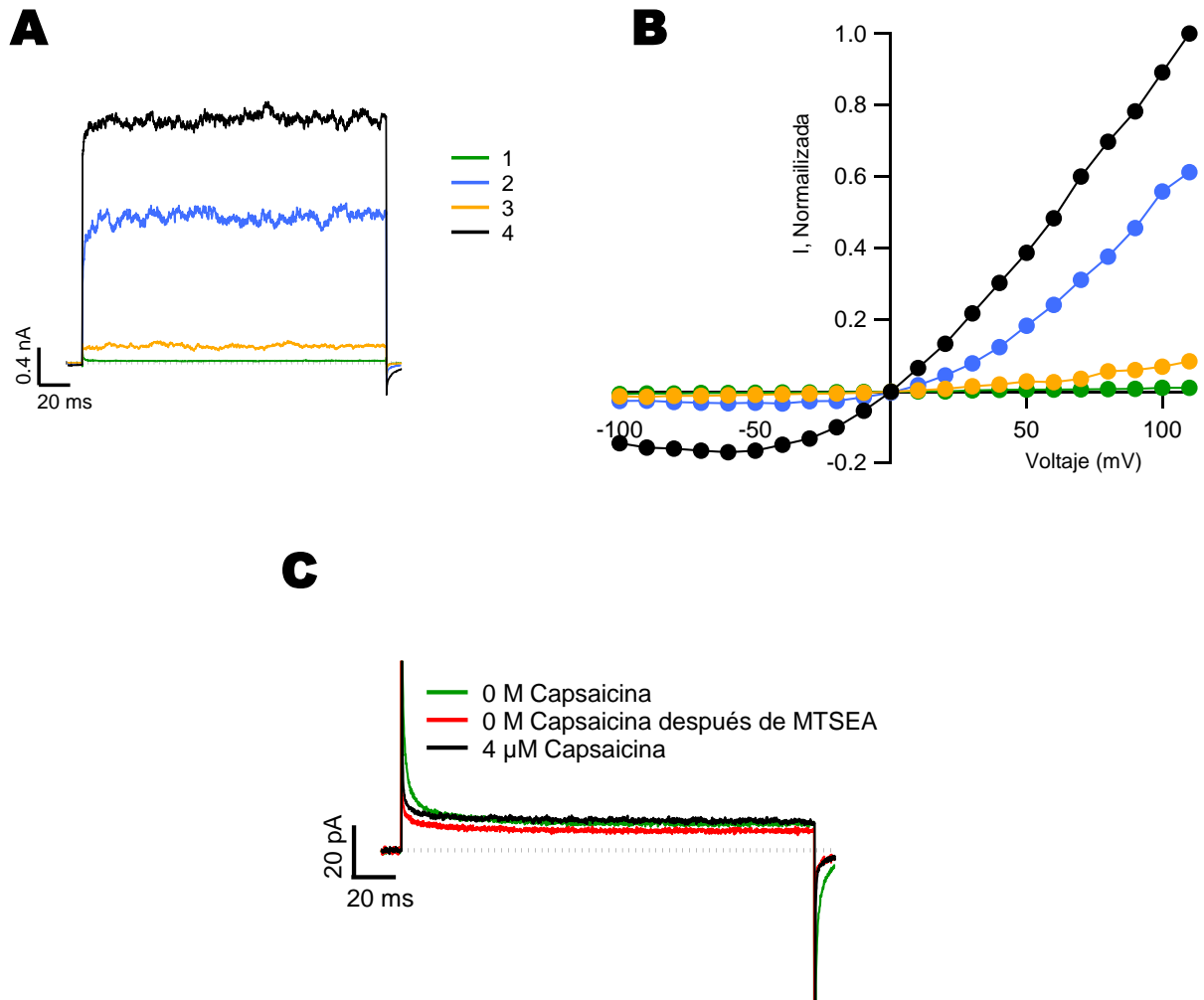


Figura 19) El efecto del MTSEA sobre el canal TRPV1 es reversible. (A) Trazos obtenidos después de la aplicación de MTSEA (trazo azul), de DTT 20 mM (trazo amarillo) y en presencia de capsaicina 4  $\mu$ M. (B) Relación  $I - V$  del mismo parche en donde se observa claramente el aumento de la corriente después de la aplicación de MTSEA (curva azul) con respecto a la corriente de fuga (curva verde) y la disminución de la corriente por el tratamiento con DTT (amarillo). La curva negra representa la corriente obtenida en presencia de capsaicina en una concentración saturante. (C) Trazos de corriente obtenidos a partir de un parche membranal de una célula transfectada solo con GFP.

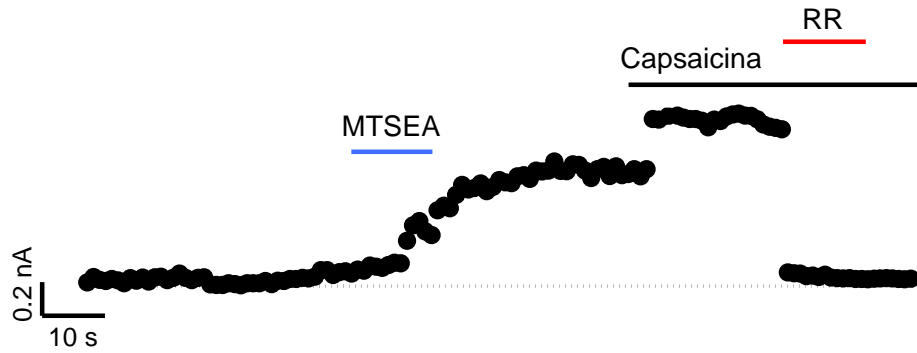


Figura 20) Curso temporal de la activación de la corriente por MTSEA. Las barras indican el tiempo que fue aplicado cada reactivo. Los valores de corriente mostrados fueron obtenidos a un voltaje de 100 mV a intervalos de 1 seg. RR= rojo de rutenio

## 2) Generación de un canal sin cisteínas.

### a) El canal TRPV1 sin cisteínas o TRPV1<sup>-18cys</sup>.

Durante la duración de mi trabajo de tesis, se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida para construir un canal TRPV1 sin cisteínas, al cual se le nombró TRPV<sup>-18cys</sup> (Figura 21).

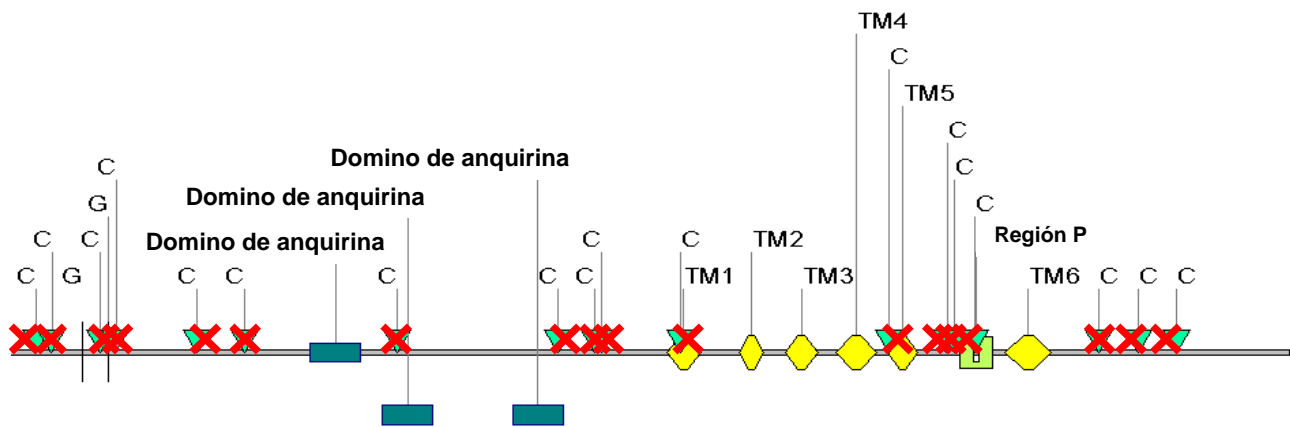
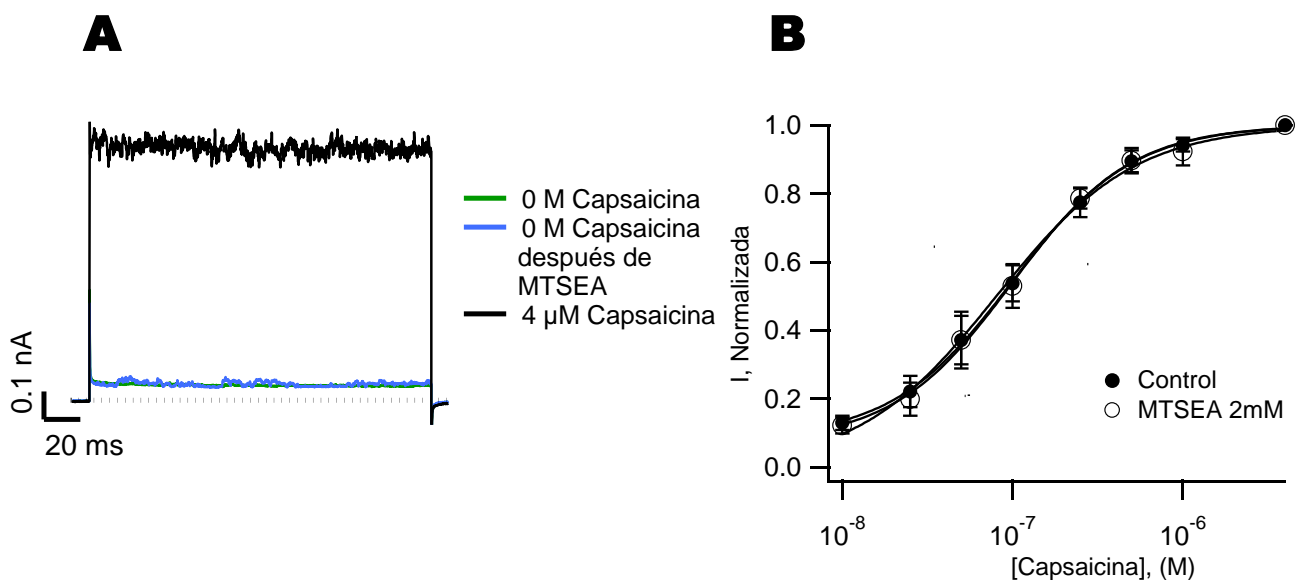


Figura 21) Esquema del canal TRPV1<sup>-18cys</sup>. Las cisteínas se marcan como triángulos verdes.

A pesar de que le faltan todas las cisteínas a este canal mutante, se comporta básicamente de la misma forma que un canal TRPV1 silvestre ante la capsaicina. Sin embargo, al

exponerlo a los agentes MTS, el canal TRPV1<sup>-18cys</sup> no presenta el aumento característico en la corriente que se observa en el canal silvestre (**Figura 22**). Esto constituye una evidencia más a favor de que alguna de la(s) cisteína(s) en su secuencia primaria es (son) importante(s) para la activación por los compuestos MTS.

En la **Figura 22 A** se observan trazos de corriente representativos obtenidos de parches de membrana de células transfectadas con el canal mutante a un voltaje de +100 mV. La aplicación de 2 mM MTSEA a dicho parche por 5 min no promovió un cambio en la magnitud de las corrientes del TRPV1<sup>-18cys</sup>. En la **Figura 22 B** se presenta una curva dosis a respuesta inicial ante diferentes concentraciones de capsaicina (círculos negros) y la respuesta que se obtiene después del agente MTSEA (círculos blancos). Como se puede apreciar la corriente después de la aplicación de dicho agente no aumenta y no hay cambios significativos en los coeficientes de disociación aparentes.



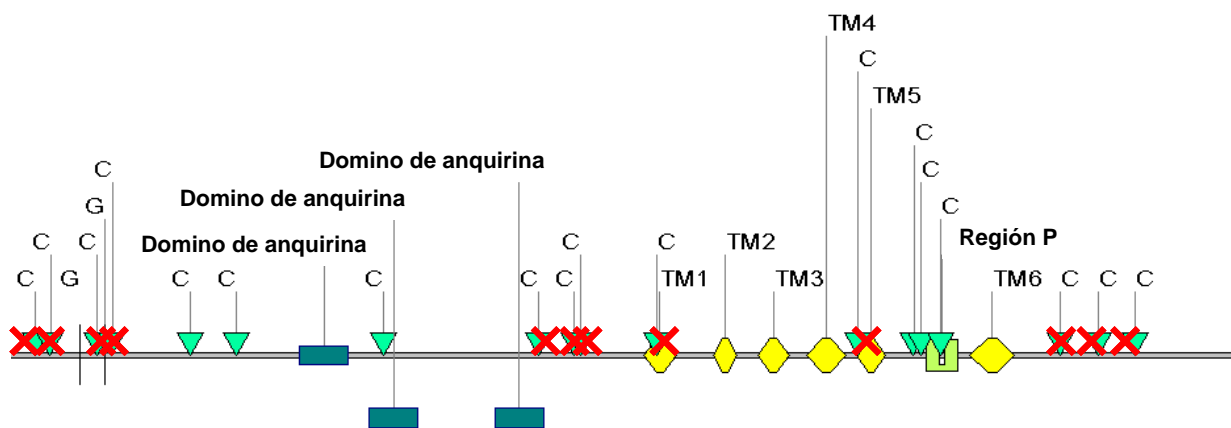
**Figura 22) Efecto del MTSEA sobre el canal TRPV1<sup>-18 Cys</sup>. (A) Trazos de corriente representativos a 100 mV en donde se observa que el MTSEA no produce un aumento en la corriente. (B) Curva dosis a respuesta de diferentes concentraciones de capsaicina antes (círculos negros) y después de (círculos blancos) del MTSEA. Los coeficientes obtenidos por el ajuste de la Ecuación de Hill para la curva obtenida antes de MTSEA son  $K_D = 106 \pm 0.2 \text{ nM}$  y después de MTSEA  $K_D = 102 \pm 0.2 \text{ nM}$  con  $N = 5$ . Los datos se presentan como el promedio  $\pm$ E.S.  $N = 5$ .**



b) La cisteína 157 es la responsable del efecto de los MTS sobre el canal TRPV1 silvestre.

Durante la generación del canal TRPV1<sup>-18cys</sup>, se produjo un canal con 12 cisteínas (12cys) mutadas a otros aminoácidos (**Figura 23, A**). Este canal todavía responde a la aplicación de agentes MTS de forma similar a lo que ocurre en el canal silvestre (**Figura 23, B**).

**A**



**B**

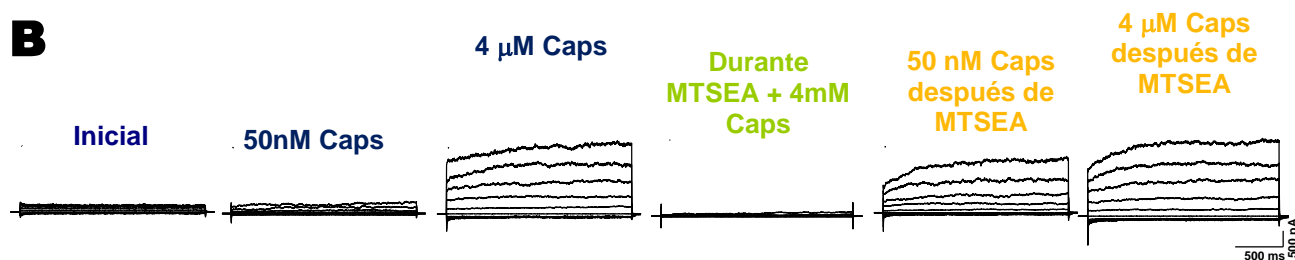
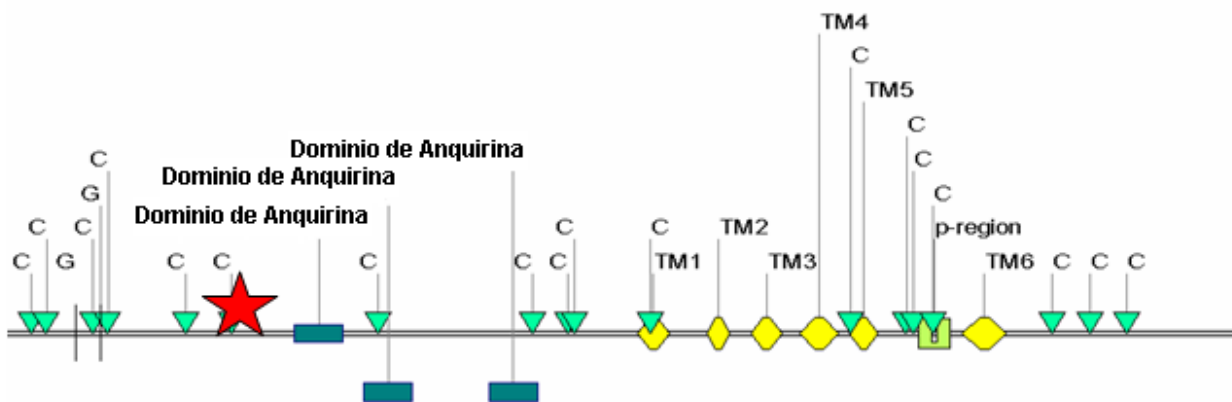


Figura 23) TRPV1<sup>-12cys</sup>. (A) Esquema del canal TRPV1 en donde se representan con "X" rojas las 12 cisteínas mutadas. (B) Familias de corrientes del canal TRPV1 obtenidas a varios voltajes antes (primeros tres trazos a la izquierda) y después de aplicar MTSEA (últimos dos trazos a la derecha).

Así como se muestra en la Figura 23, la aplicación de una concentración subsaturante de capsaicina (50 nM) activa una fracción de la corriente pequeña en comparación con la magnitud de corriente que se activa con 4 μM capsaicina. Después del tratamiento con MTSEA, la magnitud de la corriente activada con 50 nM capsaicina se acerca a la magnitud de la corriente activada por 4 μM capsaicina.

De manera interesante, al realizar la siguiente mutación acumulativa, en la cual se cambió la cisteína que se encuentra en la posición 157 de la región N-terminal (C157) por una alanina (A), se observó que el canal ya no respondía a los agentes MTS (datos no mostrados). Con el fin de decidir si la presencia de esta cisteína era necesaria para promover los efectos del MTSEA, se decidió mutar solo esa cisteína en un fondo de canal silvestre; es decir, en un canal en donde el resto de las 17 cisteínas se encontraban intactas y sólo existía la mutación C157A. **(Figura 24).**



**Figura 24)** Esquema del canal TRPV1–C157A en donde se representa con una estrella roja la cisteína que se mutó por una alanina. Esta cisteína es la responsable de que los agentes MTS causen un efecto sobre el canal TRPV1 silvestre.

Para probar los efectos del MTSEA sobre el canal TRPV1-C157A, se registraron las corrientes a pulsos de voltaje de +100mV antes y después de MTSEA y se observó que no había activación del canal por este agente. Sin embargo, después de aplicar una concentración saturante de capsaicina si se observó la activación de corrientes macroscópicas **(Figura 25, A)**. Esto indica que la falta de efecto de los agentes MTS sobre el canal no involucra un cambio en la respuesta del canal ante la capsaicina pero el reemplazo de la cisteína C157 por si sola, logra eliminar la activación por MTSEA. A continuación, se realizaron curvas dosis a respuesta en donde a los parches membranales se les aplicaron varias concentraciones de capsaicina y se registraron las corrientes antes (círculos negros) y después (círculos blancos) de la aplicación del MTSEA. En este caso, tampoco se observaron cambios inducidos por el tratamiento con MTSEA **(Figura 25, B)**.

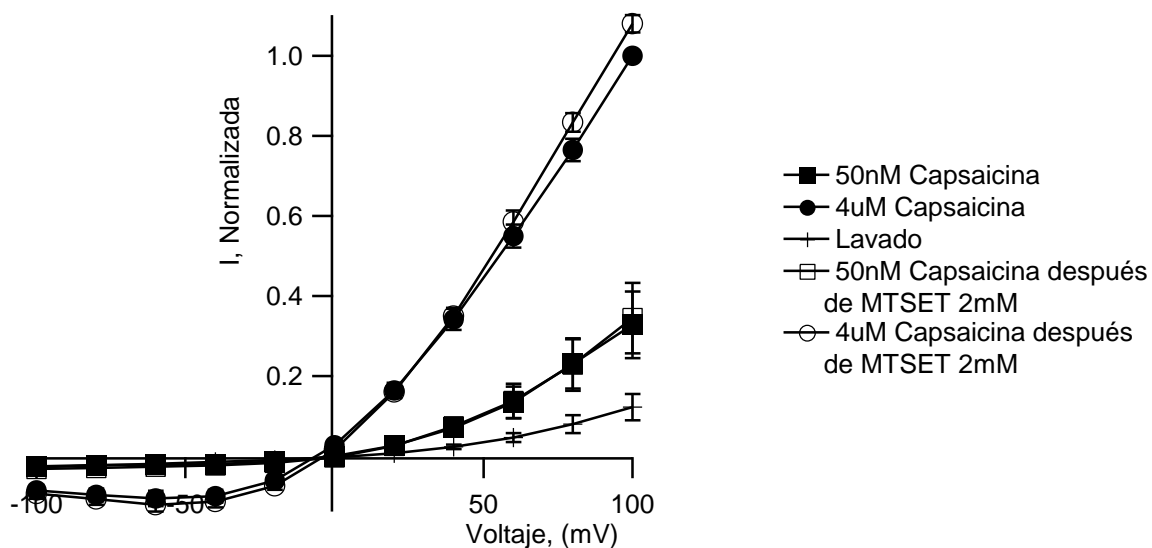
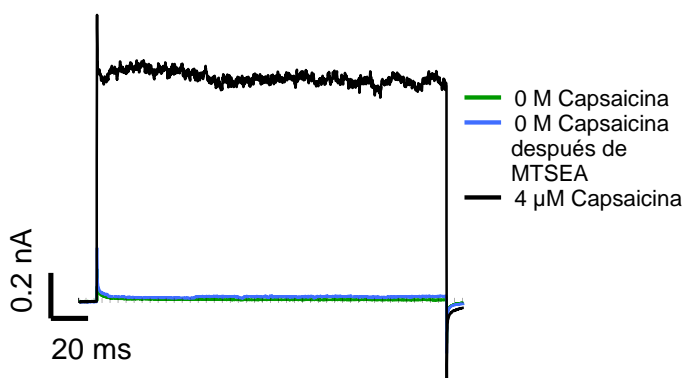
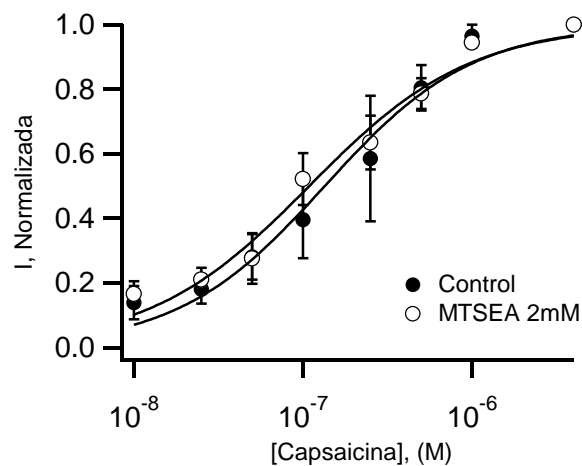
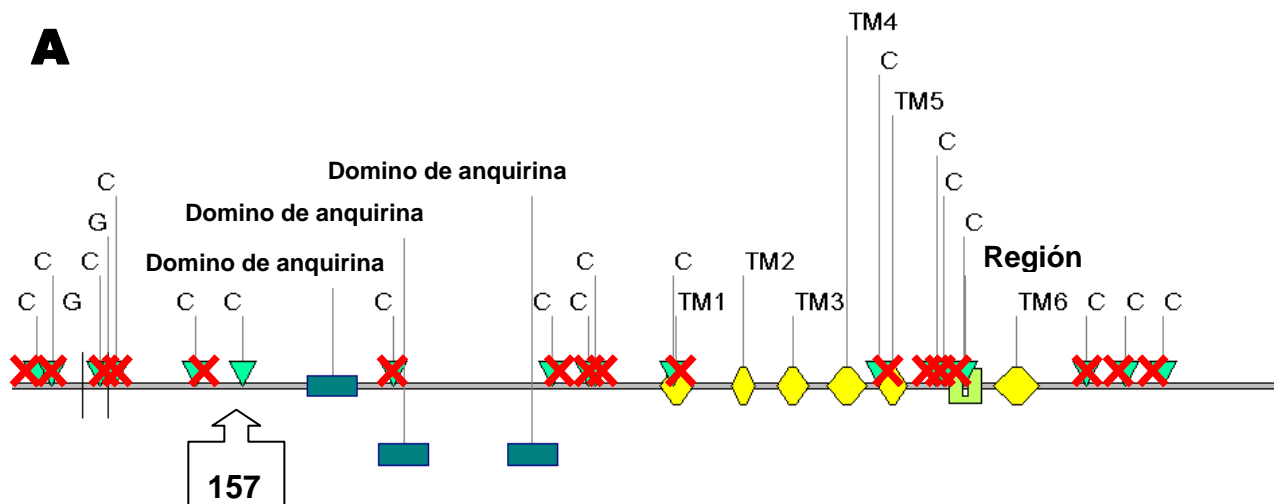
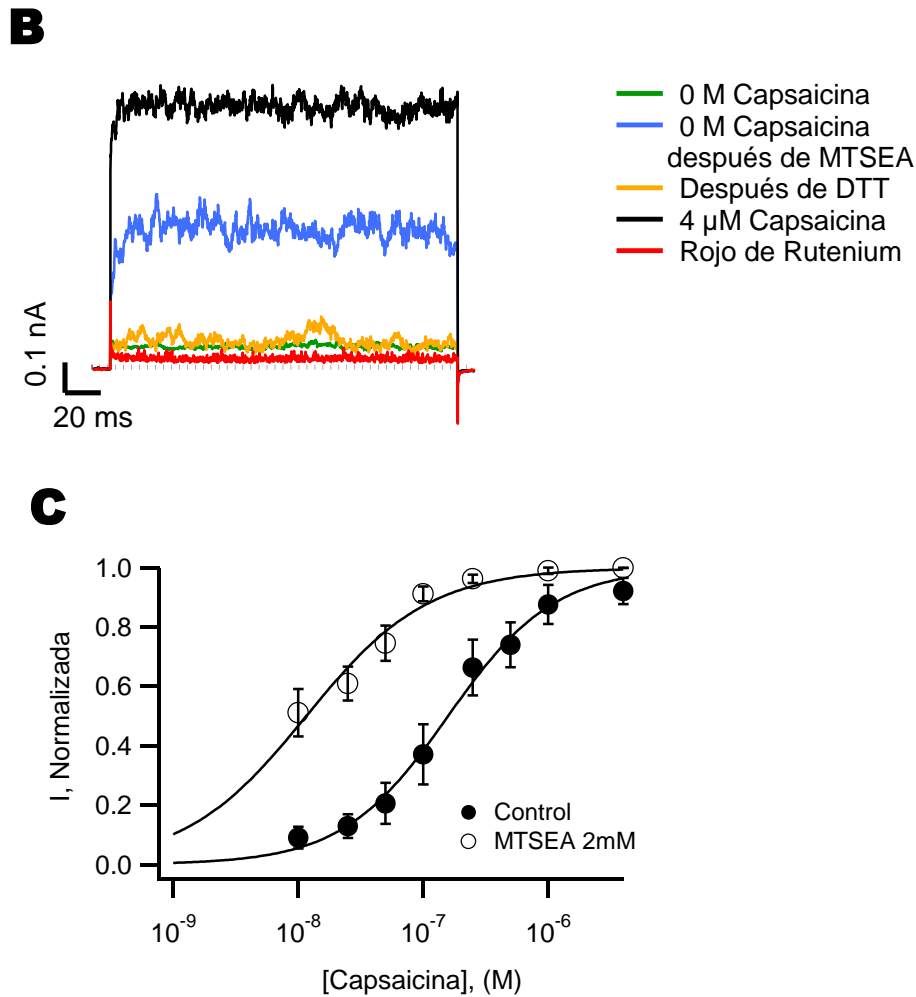
**A****B****C**

Figura 25) Canal TRPV1 – C157A. (A) Trazos obtenidos a 100mV antes (verde) y después de la aplicación de MTSEA (azul) y, finalmente con capsaicina 4μM (negro). (C) Curva dosis a respuesta ante diferentes concentraciones de capsaicina antes (círculos negros) y después del MTSEA (círculos blancos). Los coeficientes de disociación aparentes obtenidos a partir del ajuste con la ecuación de Hill antes de la aplicación del MTSEA son  $K_D = 155 \pm 0.9\text{nM}$  y después del MTSEA son  $K_D = 133 \pm 0.3\text{nM}$  con una  $N = 6$ . QUITAR EL PANEL A. Subir todo el documento

Dado que ya habíamos construido un canal TRPV1 sin cisteínas, decidimos usar este canal como una herramienta para determinar si la presencia de C157 era suficiente para promover los efectos de los agentes MTS sobre el canal TRPV1. De esta forma, generamos al canal TRPV1<sup>-18cys</sup>-A157C (**Figura 26, A**). En la **Figura 26, B** se muestran trazos de corriente de parches de membrana que expresaban al canal TRPV1<sup>-18cys</sup>-A157C. Lo que es evidente es que la corriente registrada después de la aplicación del agente MTSEA sin agonista aumenta (trazo azul) con respecto a la corriente inicial (verde). Cuando a estos parches se les aplica 20 mM de DTT, se observa una disminución en la corriente (trazo amarillo). La corriente puede ser recuperada al aplicar una concentración saturante de capsaicina (trazo negro) que, a su vez, puede ser bloqueada por rojo de rutenio. (**Figura 26, B**). A seguir, se llevaron a cabo curvas dosis a respuesta a partir de las cuales se obtuvo la magnitud de la corriente en respuesta a las diferentes concentraciones de capsaicina antes y después de la aplicación de MTSEA. El resultado de estos experimentos es claramente que la cisteína C157 es suficiente para promover los efectos de los agentes MTS sobre la actividad del canal TRPV1 (**Figura 26, C**).





**Figura 26) Canal TRPV1<sup>18cys</sup>-A157C.** (A) Esquema del canal TRPV1<sup>18cys</sup>-A157C el cual sólo presenta la cisteína de interés. (B) Trazos de corrientes representativas obtenidas a 100mV. La aplicación del MTSEA (trazo azul) promueve la activación de la corriente. Esta corriente puede ser revertida por el uso del DTT (trazo amarillo) y la corriente puede ser recuperada por la aplicación de capsaicina (trazo negro). (C) Curva dosis a respuesta para la activación en presencia de diferentes concentraciones de capsaicina antes (círculos negros) y después (círculos blancos) de la aplicación del MTSEA. Las líneas continuas son ajustes a la ecuación de Hill de la cual se obtuvo una  $K_D = 158 \pm 0.7\text{nM}$  y  $11 \pm 0.6\text{nM}$  antes y después de la aplicación de MTSEA respectivamente con una  $N = 5$ . Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  E.S.

### 3) Los extractos del ajo y la cebolla activan al canal TRPV1 silvestre.

Como se había mencionado antes, se han reportado estudios en los cuales se ha concluido que existen compuestos que provienen de algunas plantas, como el ajo y la cebolla, que activan al canal TRPV1 (Macpherson, 2005). Sin embargo, existe controversia de si el efecto es sobre el TRPV1 ya que existen evidencias contrarias obtenidas por otros grupos de

investigación en donde demuestran que dichos compuestos activan al TRPA1 (Julius, *et al.* 2005) Dado que los extractos de estos vegetales contienen compuestos que tienen la capacidad de modificar cisteínas, se decidió realizar experimentos para comprobar si efectivamente activaban al TRPV1 y para dilucidar el mecanismo por medio del cual esto ocurría.

Los experimentos que se realizaron consistieron en el registro de corrientes de células HEK293 transfectadas con el canal TRPV1 silvestre y con las mutantes TRPV1<sup>-18cys</sup>, TRPV1-C157A y TRPV1<sup>-18cys</sup>-A157C. Los resultados de estos experimentos se mencionan a continuación.

*a) Los extractos de ajo y cebolla activan al canal TRPV1 silvestre.*

Para este experimento se obtuvieron extractos de ajo y cebolla de los cuales se hicieron diluciones, como ya se menciona en la parte de Metodología. Los registros se hicieron en parches de membrana en “*inside-out*”. La **Figura 27** resume los datos que se obtuvieron. Ambos extractos fueron capaces de promover la activación de la corriente a través del canal TRPV1 silvestre (**Figura 27, A y B, trazos azules**). Al igual que con los agentes MTS, se decidió hacer un experimento para saber si las corrientes evocadas por éstos dos extractos eran a causa de la interacción de los mismos con las cisteínas. Lo que se observó fue que, efectivamente, las cisteínas participaban en la activación del canal por los extractos de ajo y de la cebolla ya que la aplicación del agente reductor DTT revierte su efecto (**Figura 27, A y B, trazos amarillos**). A continuación, se procedió a estudiar el efecto de estos extractos en las mutantes que se habían generado.

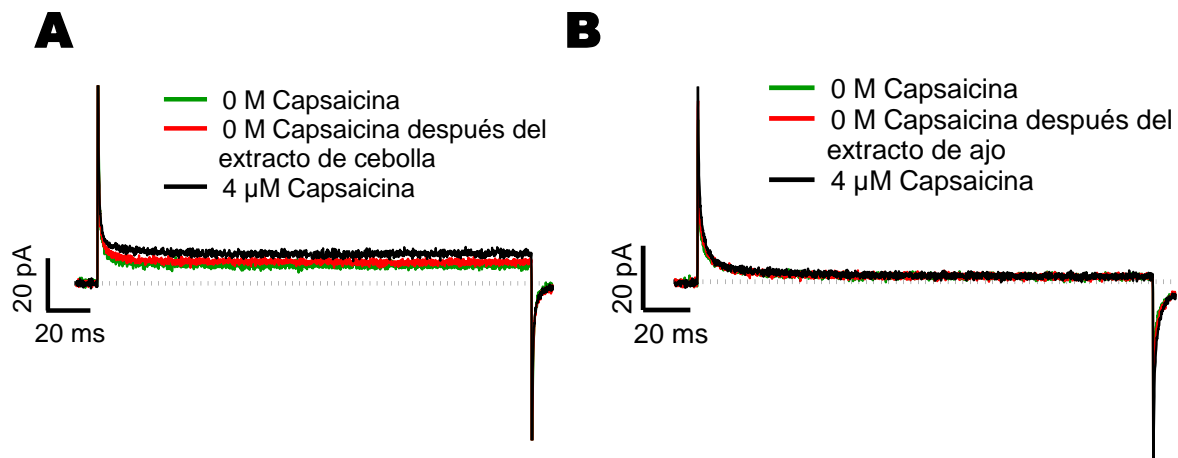


Figura 28) En A y B se muestran trazos representativos a 100 mV controles obtenidos de células HEK293 transfectadas solo con GFP a las cuales se les aplicaron los extractos de cebolla y ajo. Ninguno de los extractos fue capaz de activar corrientes.

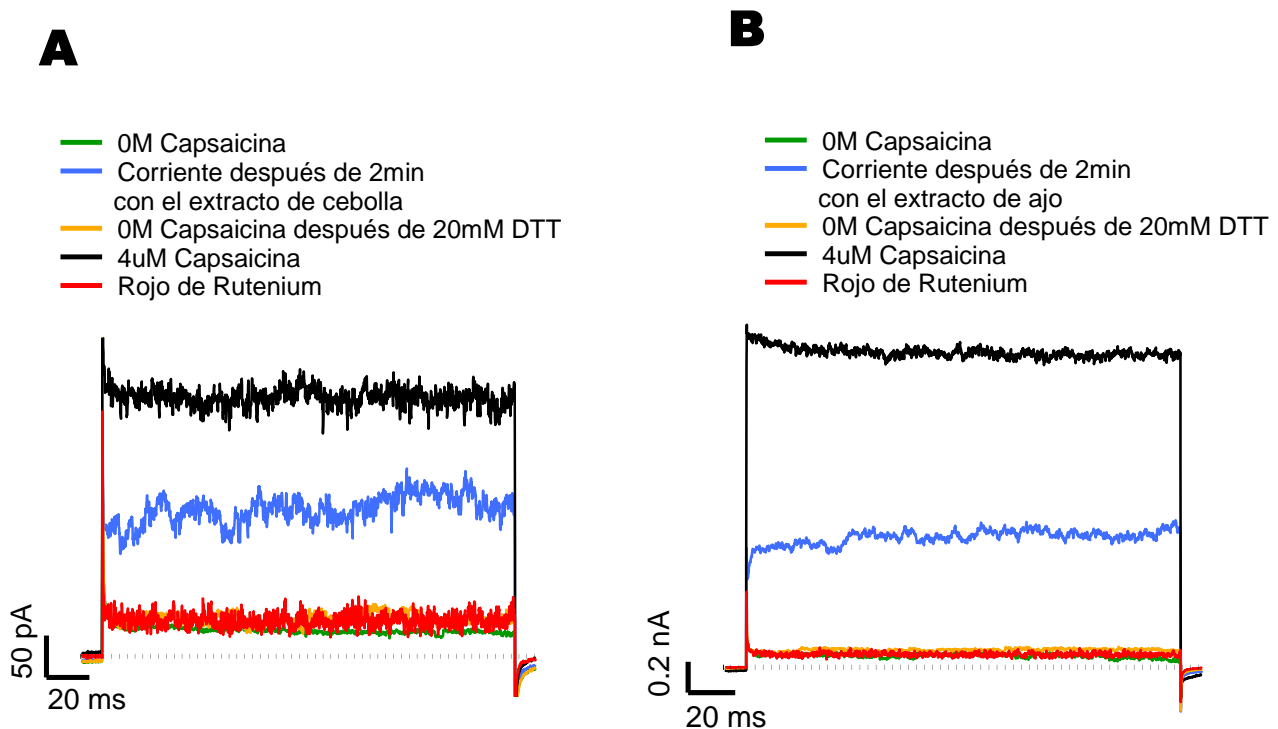


Figura 27) Efecto de los extractos de cebolla y ajo en el canal TRPV1 silvestre. En A y B se muestran trazos de corrientes representativos a 100 mV activados por los extractos de cebolla y ajo, respectivamente, en donde se observa que el DTT revierte la corriente evocada por cada extracto.

En la **Figura 28, A y B** se muestran trazos obtenidos a partir de células transfectadas solo con GFP. Los datos demuestran que no hay corrientes endógenas que se activen por estos extractos y que los resultados anteriormente mostrados se deben a los efectos de los extractos sobre el canal TRPV1.

En los experimentos se observó que las corrientes evocadas en respuesta a los extractos de ajo y cebolla, fueron sensibles al DTT ya que dichas corrientes disminuyeron a valores de las corrientes de fuga. En la Figura 29 se muestran curvas  $I-V$  en parches de membrana escindidos, con un protocolo de voltaje que va desde -100 a +100mV, en donde se observa que al aplicar el agente DTT las corrientes evocadas por los dos tipos de extractos disminuyen a valores cercanos a cero. Cabe mencionar, que datos de mi compañero de laboratorio Héctor Salazar García, demuestran los mismos efectos que se obtienen con los agentes MTS y los extractos en las células HEK293 transfectadas con el canal TRPV1, se obtienen en neuronas DRG de ratón en cultivo (datos no mostrados). Es decir, el sistema *in vivo*, se comporta igual.



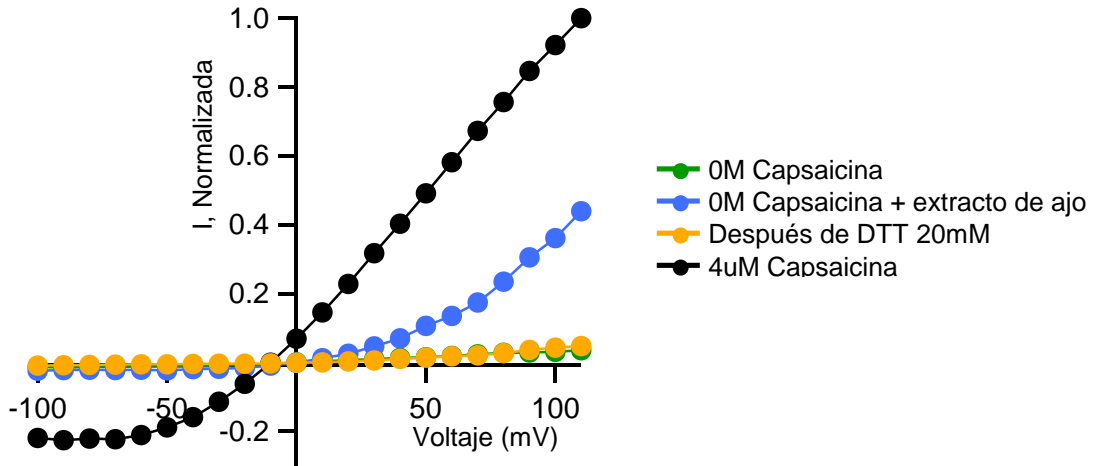
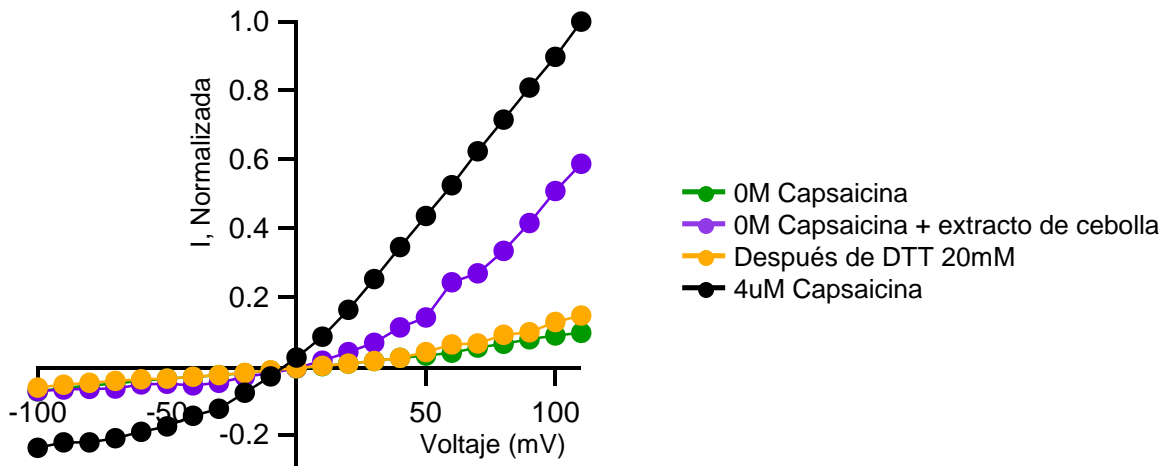
**A****B**

Figura 29) Efecto del DTT sobre el canal TRPV1 activado por extractos de cebolla y ajo. En A y B se observan curvas  $I - V$  para la activación del canal TRPV1 por los extractos de ajo (círculos azules) y de cebolla (círculos morados), respectivamente. La curva de color amarillo muestra que el efecto que tienen los extractos sobre el canal TRPV1 es reversible por el agente reductor DTT.

a) El canal TRPV1<sup>-18cys</sup> no es activado por los extractos de cebolla y ajo

Para comprobar si efectivamente los extractos de cebolla y ajo interactúan de alguna forma con las cisteínas del canal, se realizaron experimentos en los cuales se registraron las corrientes que presentaba el canal TRPV1<sup>-18cys</sup> en presencia de los extractos. Se observó que, tanto para el extracto de cebolla como para el extracto de ajo, no hubo un aumento en la corriente por la aplicación de estos extractos (**Figura 30, A y B, trazos azules**).

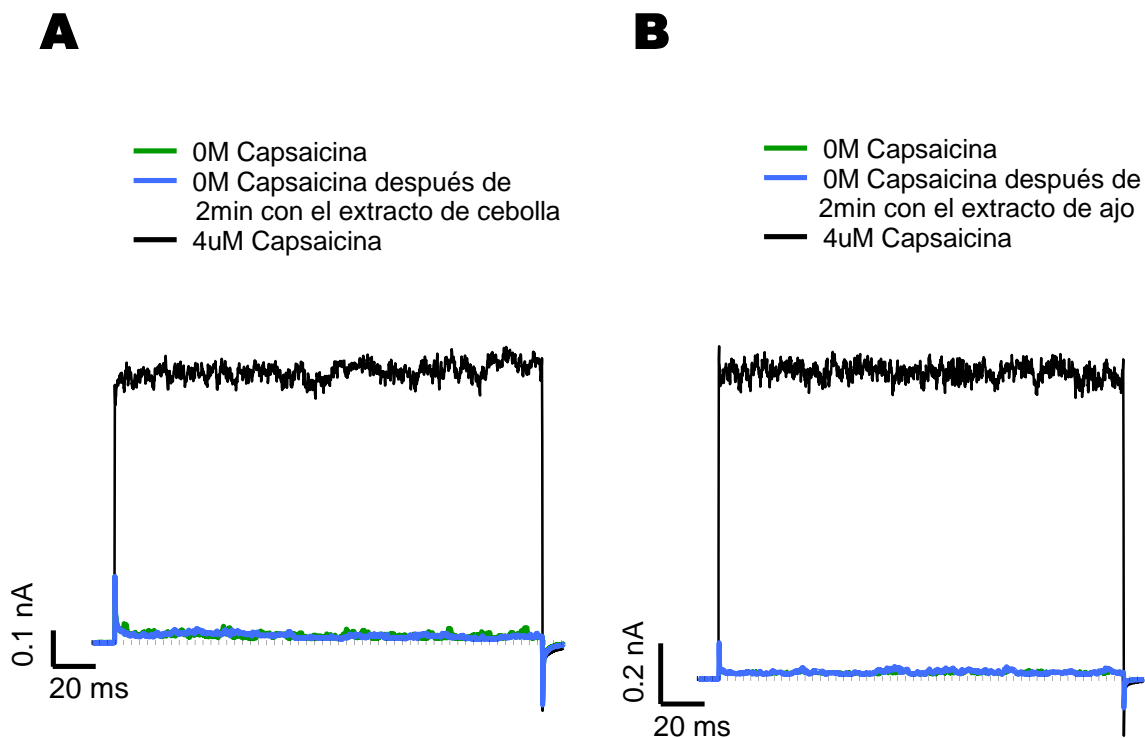
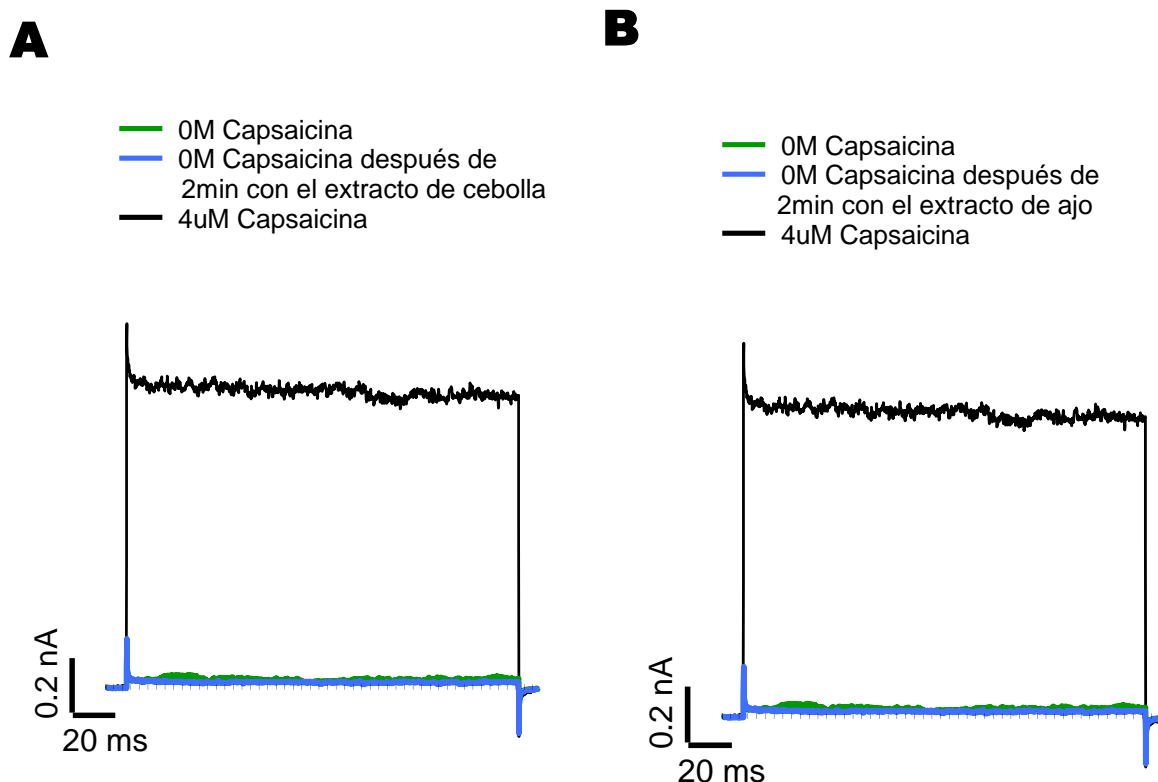


Figura 30) El canal TRPV1<sup>-18cys</sup> no se activa por los extractos de la cebolla y el ajo. Trazos de corrientes representativas obtenidas a 100mV en donde se observa que los extractos de cebolla (A) y ajo (B), no activan al canal (trazos azules). La capsaicina si es capaz de activar corrientes (trazo negro).

c) La cisteína 157 es la responsable de los efectos de los extractos.

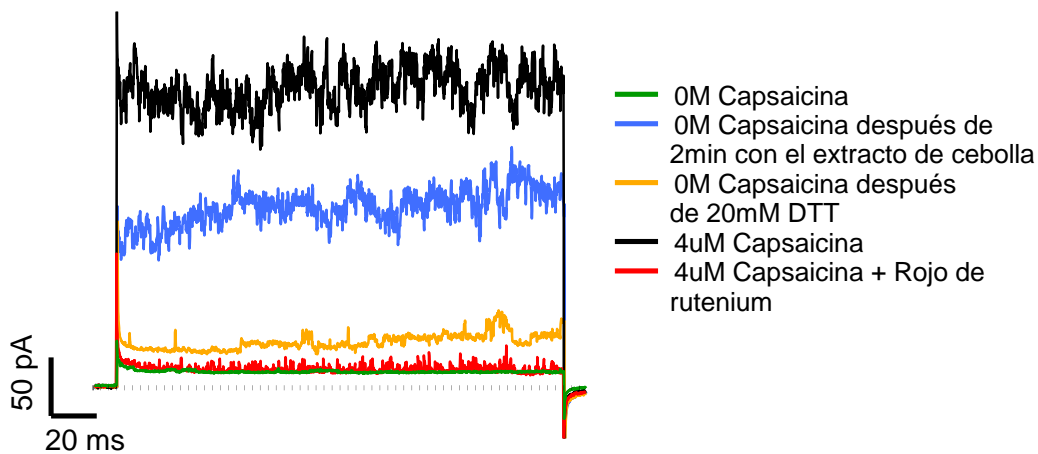
La falta de efecto que existió al aplicar los extractos a parches de membrana con canales TRPV1 sin cisteínas indicó que, efectivamente había una interacción de los extractos con las cisteínas del canal. Así, surgió la pregunta de si la responsable de dicha interacción era la cisteína 157 por lo que se utilizó la mutante TRPV1-C157A para determinar si esta era la responsable del efecto. Se registraron trazos de corrientes al aplicar los extractos de cebolla y ajo en células transfectadas con el TRPV1-C157A en donde se observó que ninguno de los dos tipos de extractos activaban al canal (**Figura 31, A y B, trazos azules**).



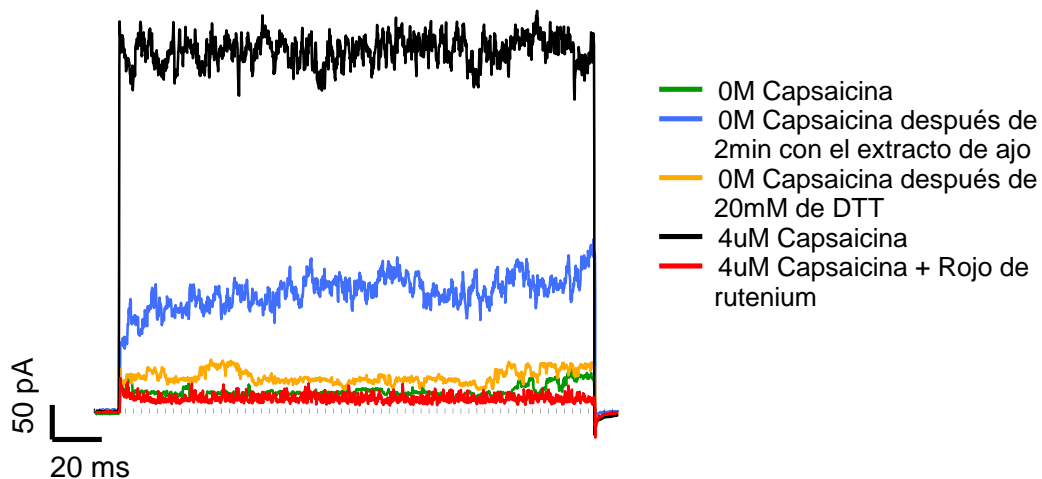
**Figura 31)** Los extractos de cebolla y ajo no activan corrientes en la mutante TRPV1-C157A. Los trazos de corriente representativos fueron obtenidos en parches de membrana a un voltaje de +100mV. Claramente se observa que después de haber aplicado el extracto, tanto de cebolla (A) como el de ajo (B), no hay activación del canal (trazos azules). Sin embargo, al aplicar una concentración de capsaicina saturante se observa que el canal si se activa (trazos negros).

Finalmente, con el fin de determinar si la C157 era capaz de rescatar la sensibilidad a los extractos, se decidió usar la mutante TRPV1<sup>-18cy-A157C</sup> en la cual solo se encuentra la cisteína de interés. Lo que se observó fue que al aplicar los extractos de cebolla o de ajo inmediatamente el canal se activaba (**Figura 32, trazos azules**). En este caso, el DTT también promovió la disminución de la corriente (trazos amarillos), la capsaicina promovió la activación de la corriente nuevamente (trazos negros) y el rojo de rutenio bloqueó las corrientes (trazos rojos).

**A**



**B**



**Figura 32) La cisteína 157 es la responsable de la activación del canal TRPV1 ante los extractos de cebolla (A) y ajo (B).**

#### 4) La alicina, el componente activo del ajo y de la cebolla, activa al canal TRPV1.

La alicina es el compuesto que proviene del “alin” el cual es convertido en alicina por medio de la enzima alinasa. La alicina es un compuesto que es capaz de modificar cisteínas. Dado que los extractos de ajo y cebolla modifican al canal TRPV1 por medio de una interacción con la cisteína C157, se decidió probar si el compuesto activo y más abundante en estos vegetales era capaz de mimetizar los efectos de los agentes MTS y de los extractos de ajo y cebolla.

##### *a) La alicina y el canal TRPV1.*

Se realizaron registros de trazos de corrientes en parches de membrana escindidos a un voltaje de +100mV. A dichos parches se le expuso a 200  $\mu$ M de alicina y se observó la activación de una corriente macroscópica (**Figura 33, A, trazo azul**) señal de que el canal TRPV1 se activó en presencia de la alicina. Después, se aplicó el DTT (trazo amarillo), para saber si este efecto podía ser reversible, y lo que se observó fue que la corriente activada por la alicina disminuyó a valores de la corriente de fuga (trazo verde).

Después, se llevaron a cabo curvas dosis a respuesta a diferentes concentraciones de capsaicina antes (círculos negros) y después de aplicar a la alicina (círculos blancos). Lo que se observó fue que la curva obtenida después de la aplicación de la alicina se corrió a la izquierda (**Figura 33, B**).

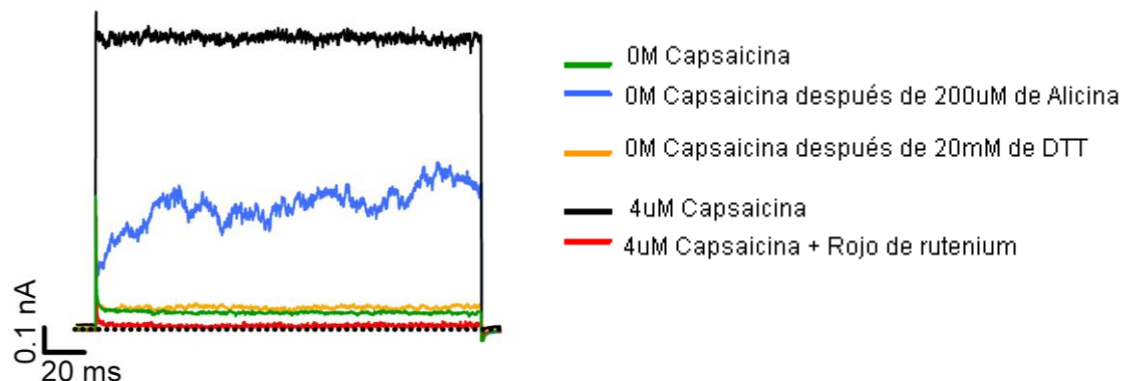
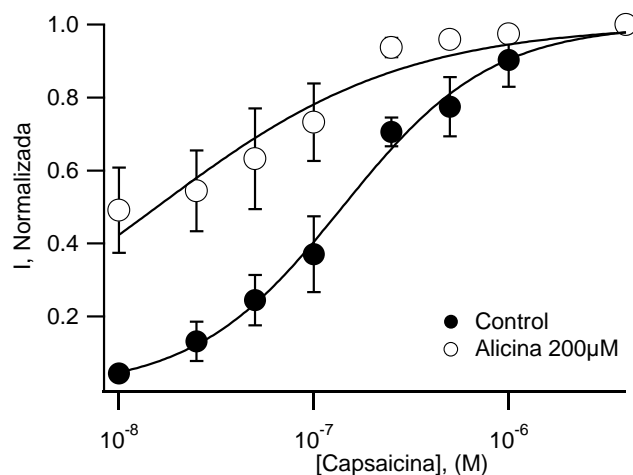
**A****B**

Figura 33) Efecto de la alicina en el canal TRPV1. A) Trazos de corriente representativos obtenidos de un parche de membrana escindido de una célula HEK293 transfected con el canal TRPV1. B) Curva dosis a respuesta de la activación por capsaicina antes (círculos negros) y después de alicina (círculos blancos) los valores para  $K_D$  antes (círculos negros) y después (círculos blancos) fueron  $159 \pm 0.3nM$  y  $12 \pm 0.2nM$  respectivamente, con una  $N = 5$ . Los datos se representan como el promedio  $\pm$  ES.  $N = 5$ .

b) El canal TRPV1 $\Delta$ 18cys no responde a la alicina.

Al probar los extractos en el canal TRPV1 $\Delta$ 18cys, lo que se observó fue que la corriente simplemente no se ve afectada por la aplicación de la alicina (Figura 34, A). De forma similar, las curvas dosis a respuesta para la activación por capsaicina no se modificaron (Figura 34, B). Estos datos demuestran que la alicina es incapaz de activar a un canal sin cisteínas.

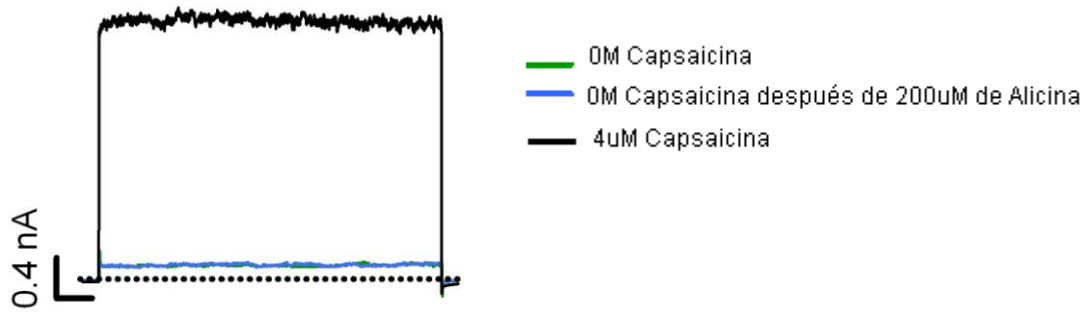
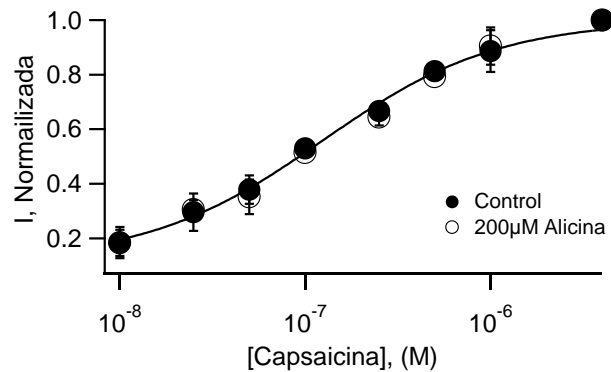
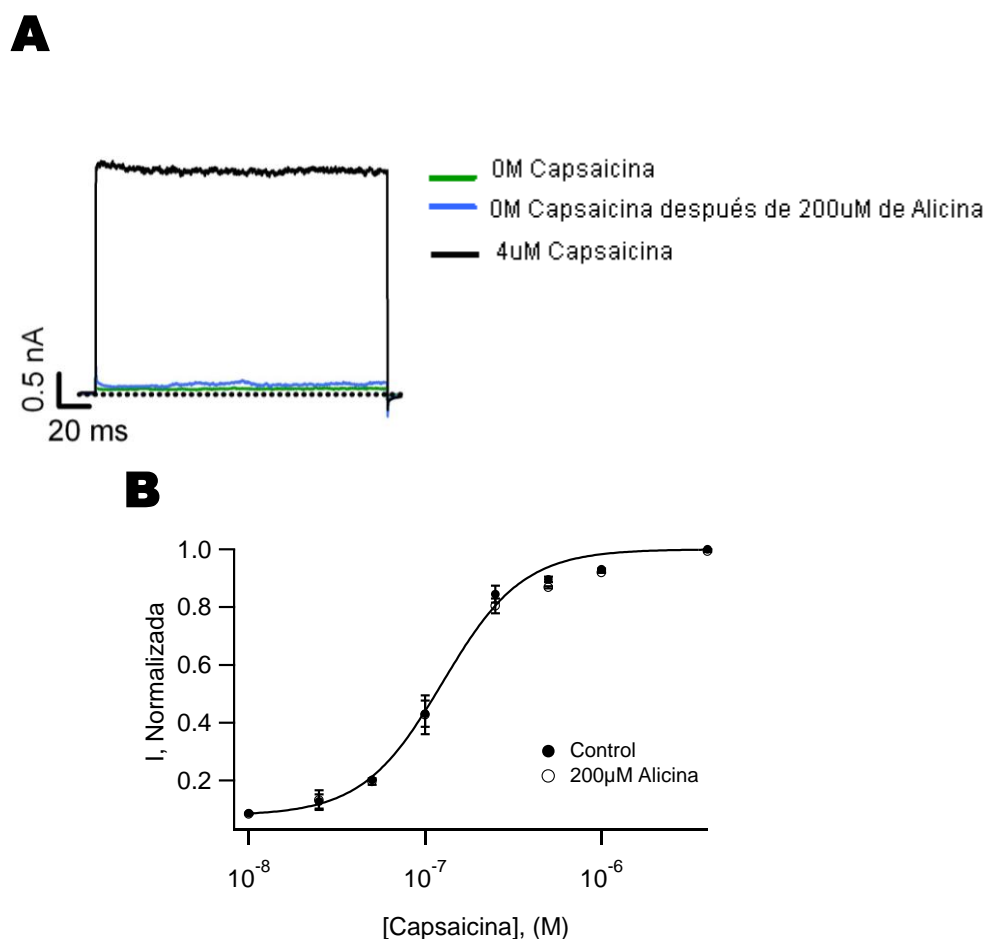
**A****B**

Figura 34) En el canal TRPV1<sup>-18cys</sup>, la alicina no promueve ningún efecto. (A) Trazos de corriente representativos obtenidos a 100 mV de un parche de membrana escindido de una célula HEK293 transfectada con el canal TRPV<sup>-18cys</sup>. El trazo verde representa la corriente de fuga, el trazo azul a la corriente después de alicina y el negro a la corriente activada por 4  $\mu$ M capsaicina. (B) Curva dosis a respuesta ante diferentes concentraciones de capsaicina antes (círculos negros) y después de la aplicación de 200  $\mu$ M de alicina (círculos blancos). Los valores obtenidos para  $K_D$  antes y después de la aplicación de alicina fue  $90 \pm 0.4$ nM y  $95 \pm 0.6$ nM respectivamente, con una N = 5. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  E.S.

c) La alicina interactúa con la cisteína C157.

Hasta ahora se ha discutido que, al igual que los extractos de ajo y de cebolla, la alicina interactúa con las cisteínas del TRPV1 para producir la apertura del canal. Sin embargo, se desea probar si la interacción con la cisteína 157 que se encuentra en el N-terminal podría ser la responsable de que la alicina active al canal. Por lo que se usó al canal TRPV1-C157A para contestar esta pregunta. En la **Figura 35, A** se muestran los trazos de corriente de parches de membrana que expresan al canal TRPV1-C157A. Se puede apreciar que al



**Figura 35) La alicina interactúa con la C157. (A) Trazos de corriente representativos obtenidos a partir de un parches de una célula HEK293 transfectada con el canal TRPV1-C157A. Estos datos evidencian la falta de activación del canal mutante por la alicina (trazo azul). (B) Curva dosis a respuesta de diferentes concentraciones de capsaicina antes (círculos negros) y después (círculos blancos) de la aplicación de 200 µM de alicina. El coeficiente de disociación aparente obtenido antes y después de la aplicación de alicina fue  $111 \pm 0.4$ nM y  $100 \pm 0.3$ nM respectivamente, con una N = 5. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  E.S.**



aplicar 200  $\mu\text{M}$  de alicina la corriente permanece sin ser activada (trazo azul) y a niveles de la corriente de fuga (trazo verde). No obstante, la aplicación de capsaicina al parche si promueve la activación de la corriente (trazo negro). Las curvas dosis a respuesta ante diferentes concentraciones de capsaicina antes y después de aplicar la alicina también demuestran que este canal es incapaz de activarse en presencia del compuesto (**Figura 35, B**).

*d) La presencia de la cisteína 157 es suficiente para la activación del canal TRPV1 por la alicina.*

Otra prueba más de que la cisteína 157 es la única responsable de la activación del canal TRPV1 por la alicina, proviene del registro de corrientes en el canal mutante TRPV1<sup>-18cys-A157C</sup>, el cual sólo presenta la cisteína 157. Lo que se observó fue que al aplicar 200  $\mu\text{M}$  de alicina, ésta activo al canal (trazo azul) y nuevamente, la aplicación de DTT, abolió las corrientes (**Figura 36, A, trazo amarillo**). Al llevar a cabo las curvas dosis a respuesta para activación por capsaicina, observamos que la aplicación de la alicina a los parches de membrana promueve el corrimiento de la curva dosis respuesta hacia la izquierda (**Figura 36, B, círculos blancos**). Este último dato, en conjunto con las evidencias mostradas anteriormente, demuestra que la activación del canal TRPV1 por el compuesto activo que se encuentra en los extractos de ajo y cebolla, es por medio de una sola cisteína que es tanto, necesaria como suficiente, para promover los efectos de la alicina.

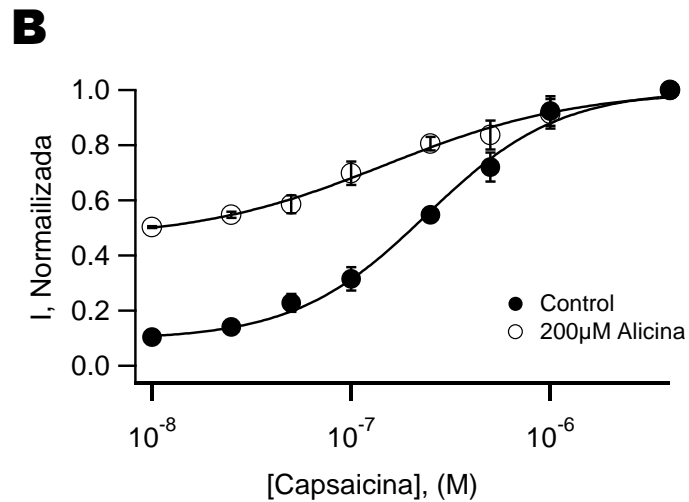
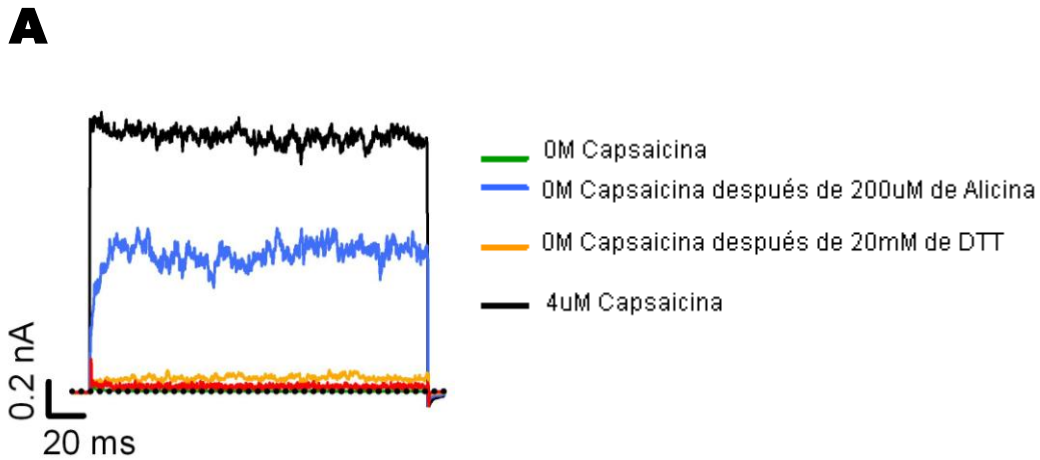


Figura 36) Efecto de la alicina sobre el canal mutante TRPV1<sup>18cys-A157C</sup>. (A) Trazos de corriente representativos obtenidos de un parche escindido de célula HEK293 a un voltaje de 100mV. El trazo verde representa la corriente de fuga, el azul la activación por alicina 200 $\mu\text{M}$ , el amarillo la aplicación de DTT 20mM y el negro la aplicación de capsaicina 4 $\mu\text{M}$ . (B) Curva dosis a respuesta ante diferentes concentraciones de capsaicina antes (círculos negros) y después (círculos blancos) de la aplicación de alicina. Los valores para  $K_D$  y  $N$  antes y después de la aplicación de alicina son:  $159 \pm 0.3\text{nM}$  y  $12 \pm 0.2\text{nM}$  con una  $N=5$ . Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  E.S.

## Discusión

Los canales TRP juegan un papel fundamental en la percepción de estímulos ambientales y algunos de estos canales exhiben sensibilidad a compuestos como el cinamaldeído, el aceite de mostaza (alil isotiocianato) y a la alicina que son sustancias que producen dolor o sensaciones irritantes.

A la fecha todavía existe controversia de si el canal TRPA1 es el único blanco de estos agentes y el único mediador de sus efectos. Aunque es claro que el cinamaldeído y el aceite de mostaza solo activan a los canales TRPA1, hay estudios que contrastan entre sí en cuanto a sus conclusiones (Julis, *et al* 2005; Bautista, *et al.* 2006 y Macpherson, *et al* 2007).

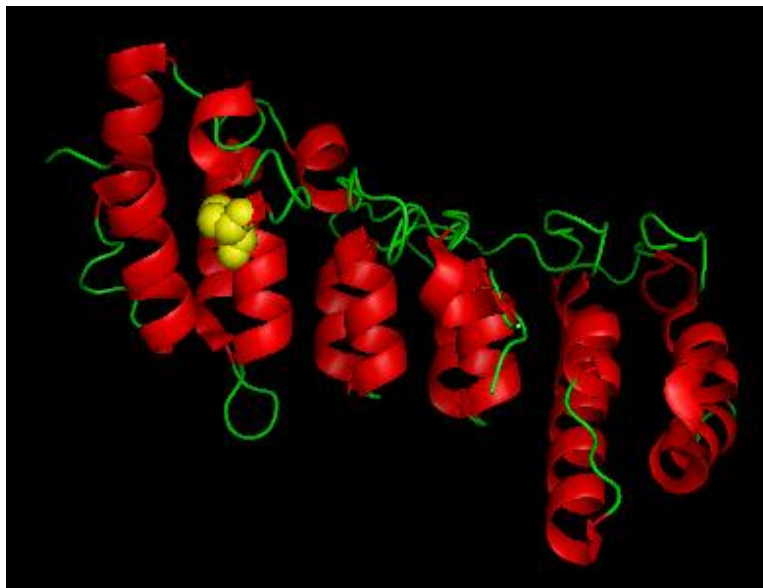
Los datos demuestran que efectivamente el TRPV1 es blanco de las acciones de los derivados del ajo y la cebolla. Se ha demostrado que los residuos de cisteínas pueden modular la actividad de varios tipos de canales, incluyendo los canales TRP (Hess, *et al* 2003; Matalon, *et al* 2003; Yoshida, *et al* 2006, Macpherson, *et al* 2007; Julis, *et al* 2005; Vyklicky, *et al.* 2005; Susankova; *et al.* 2006). En el laboratorio logramos construir un canal TRPV1 sin cisteínas funcional que ha resultado muy útil para los experimentos aquí descritos y que será invaluable para estudios futuros sobre la relación existente entre la función y la estructura del canal TRPV1.

Los resultados indican que los agentes del tipo de los metanotiosulfonatos, que los extractos de cebolla y ajo y que la alicina son capaces de activar al canal TRPV1 a través de la modificación de una sola cisteína, la C157 en la región N-terminal de la proteína.

La estructura cristalizada de las regiones N-terminales de los canales TRPV1 y TRPV2 se lograron recientemente y muestran que esta región está compuesta por 6 dominios de unión a anquirina (Lishko, *et al.* 2007; Gaudet, *et al.* 2006).

También se demostró que la región N-terminal del canal TRPV1 forma un dominio de unión múltiple a ligandos y que media la respuesta a ATP, PIP<sub>2</sub> y calmodulina (Lishko, *et al.* 2007; Gaudet, *et al.* 2006).

Al examinar la estructura publicada para la región N-terminal del canal TRPV1 se logra constatar que C157 se localiza en la hélice interna 2 del dominio de unión a anquirina ANK2 (**Figura 37**).



**Figura 37) Localización de C157 en la región N-terminal del canal TRPV1. Diagrama de cintas para la estructura publicada. Basado en esta estructura, C157 (bolas amarillas) se encuentra en la hélice interna 2 del dominio de anquirina ANK-2 del TRPV1.**

Notablemente, esta región también es blanco de unión de varios otros ligandos reguladores. Por ejemplo, los sitios K155, K160 y L163 (que se encuentran cercanos a C157) constituyen la región de unión a ATP (Lishko, *et al.* 2007; Gaudet, *et al.* 2006). Estos resultados y los nuestros sugieren que esta región sufre cambios conformacionales significativos acoplados a las propiedades de compuerta del canal y constituye una región reguladora importante para la función del canal TRPV1.

La importancia de la región N-terminal en la función de los canales TRP parece estar conservada ya que en el TRPA1 existe un grupo de 3 cisteínas (C619, C639 y C663) que es

la región que modula los efectos del cinamaldehído y del aceite de mostaza sobre la activación del canal (Hinman; *et al.* 2006).

Además, en el TRPA1, esta región también contiene dominios de unión a anquirina similares a los encontrados en el TRPV1. Para el TRPA1 se ha propuesto que estos dominios juegan un papel importante en la respuesta del TRPA1 a cambios en la tensión de la superficie celular (Corey; *et al.* 2004; Howard, *et al.* 2004; Michaely, *et al.* 2002).

Por otro lado, algunas de las otras cisteínas de la secuencia del TRPV1 parecen jugar papeles importantes en la activación del TRPV1 por óxido nítrico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es posible entonces que la modificación de C157 pueda también participar parcialmente en los efectos de estos agentes sobre el canal (Yoshida, *et al.* 2006).

Aunque puede ser que la activación por modificadores de cisteínas sea un mecanismo conservado en los canales TRP, la falta de activación del canal TRPV1 por cinamaldehído y, particularmente por el aceite de mostaza (alil isotiocianato), que es estructuralmente parecido a la alicina, constituye un enigma en cuanto la especificidad de los agonistas en los canales TRP. El hecho de que los agentes MTS con cargas distintas promuevan activación, sugiere fuertemente que estos efectos se deben a interacciones estéricas más que a interacciones electrostáticas. Además, el hecho de que la sensibilidad a capsaicina se mantiene intacta en el canal TRPV1-C157A y en el canal sin cisteínas, sugiere que los mecanismos de activación por capsaicina y agentes que modifican cisteínas son distintos.

El canal TRPV1 y TRPA1 comparten solo un 13% de identidad de secuencia (22% de conservación). Sin embargo, los resultados que aquí se muestran indican que comparten mecanismos de activación. Nuestro entendimiento de la naturaleza de este mecanismo nos proveerá de información nueva acerca de las bases moleculares que subyacen a la detección de estímulos nocivos.

## Conclusión

Las conclusiones que se obtienen a partir de los resultados de este trabajo son:

- 1) Los agentes MTS activan al canal en ausencia de la capsaicina promoviendo un cambio en la probabilidad de apertura del canal TRPV1.
- 2) Los extractos de ajo y cebolla así como la alicina promueven una activación del canal TRPV1 similar a la que se observa con los agentes MTS.
- 3) El canal TRPV1 sin cisteínas se activa por capsaicina pero no por los agentes MTS ni por la alicina.
- 4) La activación del canal por los agentes MTS y la alicina es un proceso dependiente de la modificación de la cisteína C157 de la región N-terminal del canal TRPV1.
- 5) Existe especificidad en la activación por agentes que modifican cisteínas en los canales TRP ya que el cinamaldehído y el alil isotiocianato que activan al canal TRPA1 no activan al TRPV1.

## Referencias

1. Ahluwalia, J., Urban, L., Bevan, S., Nagy, I., (2003a). Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 17: 2611– 2618.
2. Aidley, N., (1989). *The Physiology of Excitable Cells.* 3<sup>rd</sup>. Cambridge University Press. New York. 1 – 508pp.
3. Aizenman. E., Lipton. S. A., Loring. R. H. (1989). Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 3: 1257 – 1263.
4. Amagase, H., Petesch, B., Matsuura, H., Kasuga, S., and Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 131: 955S–962S.
5. Amato. A., Connolly. C. N., Moss. S. J., Smart. T. G. (1999). Modulation of neuronal and recombinant GABA<sub>A</sub> receptors by redox reagents. *J. Physiol.* 517 (Pt 1): 35 – 50.
6. Bautista, D. M. et al. (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269-82.
7. Benham. C. D, Davis. J. B, Randall. A. D, (2002) Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels, *Neuropharmacology* 42: 873–888.
8. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat – activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816 – 24.
9. Catterall, W. A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555.
10. Clapham DE. (1995). Calcium signaling. *Cell* 80:259–68.
11. Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517 – 524.
12. Clapham, D. E., Runnels, L. W., Ströbing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nature* 2: 387 – 396.
13. Corey, D. P. et al. (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432, 723-30.
14. Cosens. D. J, Manning. (1969) A., Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant, *Nature* 224: 285–287.
15. Ferrer – Montiel Antonio., Gacia – Martinez Carolina., Morenilla – Palao Cruz, García – Sanz Nuria., Fernández – Carvajal Asia., Fernández – Ballester Gregorio., Planeís – Cases Rosa., (2004). Molecular architecture of the vanilloid receptor. *Eur. J. Biochem* 271:1820 – 1826.

16. Flynn, G. E., Zagotta, W. N., (2003). Acysteine scan of the inner vestibule of cyclic nucleotide – gated channels reveals architecture and rearrangement of the pore. *J. Gen. Physiol.* 121 (6): 563 - 582.
17. Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C, Planells-Cases, R., Merino, J. M., Ferrer-Montiel, A., (2000) Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties, *J. Biol. Chem.* 275: 32552–32558.
18. Gaudet, R., Jin, X., Touhey, J., (2006). Structure of the N - terminal Ankyrin Repeat Domain of the TRPV2 Ion Channel. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 281, 35: 25006 – 25010.
19. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 150-66.
20. Hille, B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Ma.
21. Hinman, A., Chuang, H. H., Bautista, D. M. & Julius, D. (2006) TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19564-8.
22. Holmgren, M, Liu, Y, Xu, Y., Yellen, G., (1996). On the use of Thiol – modifying Agents to Determine Channel Topology. *Neuropharmacology* 35: 797 – 804.
23. Howard, J. & Bechstet, S. (2004). Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr Biol* 14, R224-6.
24. Islas, L.D. y Sigworth, F.J. (1999) Voltage sensitivity and gating charge in *Shaker* and *Shab* family potassium channels. *J Gen Physiol.* 114(5):723-742.
25. Julius, D., Basbaum, A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203–210.
26. Julius, D., Bautista, D., Movahed, P., Hinman, A., Axelsson, H., Sterner, O., Högestätt, E., Jordt S., Zygmunt P. (2005) Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *PNAS*, Vol: 102, 34: 12248 – 12252.
27. Jung, J., Lee, S. Y., Hwang, S. W., Cho, H., Shin, J. Kang, Y. S., Kim, S., Oh, U. (2002) Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J. Biol Chem* 277: 44448 – 44454.
28. Kanzaki, M., Nagasawa, M., Kojima, I., Sato, C., Naruse, K., Sokabe, M., Iida, H., (1999) Molecular identification of a eukaryotic, stretchactivated nonselective cation channel, *Science* 285: 882–886.
29. Lambers, T.T, Weidema, A. F, Nilius, B., Hoenderop, J. G, Bindels, R. L., (2004) Regulation of the mouse epithelial Ca<sup>2+</sup>(+) channel TRPV6 by the Ca<sup>2+</sup>(+)-sensor calmodulin, *J. Biol. Chem.* 279: 28855–28861.



30. Liang, Y.-F., Haake, B., Reeh, P.-W., (2001). Sustained sensitization and recruitment of rat cutaneous nociceptors by bradykinin and a novel theory of its excitatory action. *J. Physiol.* 523: 229– 239.
31. Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B. & Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54: 905-18.
32. Macpherson, L. J. et al (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445, 541-5.
33. Macpherson. L. J., Geierstanger. B. H., Viswanath. V., Bandell. M., Eid. S. R., Hwang. S., Patapoutian. A., (2005) The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Current Biology.* 15: 929–934.
34. Matalon, S. et al. (2003). Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1184-9.
35. Michaely, P., Tomchick, D. R., Machius, M. & Anderson, R. G. (2002). Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *Embo J* 21, 6387-96.
36. Minke, B. (1977). *Drosophila* mutant with a transducer defect. *Biophys. Struct. Mech.* 3:59–64.
37. Montell. C., Birnbaumer. L., Flockerzi. V., (2002). The TRP channels, a remarkable functional family, *Cell* 108: 595–598.
38. R. Latorre, Brauchi. S., Orta. G., Zaelzer. C., Vargas. G. (2007) ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating, *Cell Calcium* doi:10.1016/j.ceca.2007.04.004.
39. Ramsey. S., Delling. M., Clapham. D., (2006) An Introduction to TRP Channels. *Annu. Rev. Physiol* 68: 619 – 647.
40. Rosebaum. T., Gordon – Shaag. A., Munari. M., Gordon. S. (2004). Ca<sup>2+</sup>/ Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin. *J. Gen. Physiol.* 123: 53 – 62.
41. Rosenbaum. T., Awaya. M., Gordon. S. E., (2002a). Subunit modification and association in VR1 ion channels. *BMC Neurosci.* 3:4.
42. Sands. A., Grottesi. A., Sansom M., Voltage – gated ion channels. (2005). *Current Biology.* 15: 1143–1149.
43. Smith. G. D., Gunthorpe. J., Kelsell. R. E, Hayes. P. D., Reilly. P., Facer. P, Wright: J. E, Jerman. J., Walhin. J. P, Ooi. L, Egerton. J., Charles. K. L, Smart. D., Randall. A. D., Anand. P., Davis. J. B, (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein, *Nature* 418: 186–190.
44. Stine F. P., Grzegorz O., Bernd N. (2005) TRP channels: An overview. *Cell calcium*, 38: 233 – 252.

45. Susankova, K., Tousova, K., Vyklicky, L., Teisinger, J. & Vlachova, V. (2006). Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol Pharmacol* 70, 383-94.
46. Tominaga, M., Caterina, M. J., Malberg, T. A., Rosen, H., Gilbert, K., Skinner, B. E., Raumann, A. I., Basbaum, A. I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain – producing stimuli. *Neuron* 21: 531 – 543.
47. Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, Nilius B. (2004). Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:396–401.
48. Vyklicky, L., Lyfenko, A., Susankova, K., Teisinger, J. & Vlachova, V. (2002). Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience* 111, 435-41.
49. Vyklicky, L., Lyfenko, A., Kuffler, D. P., Vlachova, V. (2003) Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport*. 14 (7): 1061 – 1065.
50. Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., Nilius, B., (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 277: 47044–47051.
51. Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419: 35 – 42.
52. Yoshida, T. et al. (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol* 2, 596-607.
53. Yoshida, T. et al. (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol* 2, 596-607.
54. Zhou, Y., Li, G.D., Zhao, Z.Q., (2003). State-dependent phosphorylation of epsilon-isozyme of protein kinase C in adult rat dorsal root ganglia after inflammation and nerve injury. *J. Neurochem.* 85: 571– 580.