



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA GLICOSILACIÓN DEL  
CANAL TRPV1**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**AMEYALLI GÓMEZ ILESCAS**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. SARA LUZ MORALES LÁZARO**

**Ciudad Universitaria, Cd. de Mx., 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **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 está 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.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

---

Este proyecto fue realizado en el laboratorio BL-303 del departamento de Neurociencia Cognitiva en la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular. Bajo la dirección de la Dra. Sara Luz Morales Lázaro. Fue financiado con el apoyo del Programa de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) – Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IA202717

Agradezco principalmente a la Dra. Sara Luz Morales Lázaro por permitirme incorporarme a su grupo de trabajo y por dirigir siempre con paciencia y decisión este proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dra. Gisela Edith Rangel Yescas, Dra. Myrian Velasco Torres, Dr. Enoch Luis Baltazar. Por sus correcciones y aportaciones al presente escrito.

A la Dra. Tamara Rosenbaum Emir, por recibirme en el laboratorio y permitirme el uso de las instalaciones donde se realizó este trabajo.

A la Biol. Alejandra Llorente Gil, por su apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto. Por sus consejos y su paciencia.

Al Laboratorista Félix Sierra Ramírez por su apoyo técnico.

A Miguel Ortiz Rentería y Rebeca Juárez, miembros del laboratorio por su contribución a este trabajo.

A la Dra. Claudia Verónica Rivera Cerecedo y el Dr. Héctor Alfonso Malagón Rivero (Unidad de Bioterio del Instituto de Fisiología Celular UNAM), por su apoyo con el mantenimiento de los animales utilizados.

Al Dr. Fernando García Hernández y al Ing. Marco Antonio García Aguilera (Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular UNAM), por su apoyo en la captura de las imágenes de microscopía confocal.

A la M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo por su apoyo técnico (Unidad de Computo del Instituto de Fisiología, UNAM).

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

---

A la Universidad por ser refugio y hogar. Porque a lo largo de mi trayectoria la UNAM se ha convertido en parte inexorable de mi identidad.

A la Dra. Sara Luz por el tiempo que dedicó a mi aprendizaje y por su apoyo. Su sabiduría y experiencia se reflejaron en consejos y discusiones siempre fructíferas que ahora son parte de mi formación académica.

A todos los miembros del laboratorio porque mi estancia en el laboratorio no habría sido la misma experiencia sin ustedes. Gracias a la Dra. Tamara por la confianza para permitirme trabajar en el laboratorio, a Ale por llamarme la atención siempre a tiempo y con justa razón, a Félix por su buen sentido del humor y gracias a Mike y Rebe por ser un gran equipo de trabajo compañeros y amigos.

Le agradezco a mis amigos de la carrera y de la vida, fuera y dentro de México. Gracias especialmente a Zaida Martinez, Andrés Penagos, Eugenio Contreras, Andrés Mejía, por siempre escucharme y apoyarme de muchas formas.

A Intercambio Internacional Puma, los intercambistas y toda la gente detrás de este proyecto. Gracias por las vivencias y recuerdos que me seguirán hasta que mi memoria lo permita.

A mi familia, mis padres Juan José Gómez Abarca y Guadalupe Ilescas Fuentes, por su apoyo y cariño incondicional. Finalmente, a mi hermana y mejor amiga Ix Chel.

*Sí te extraño pero no me aflijo  
y siempre te recuerdo.*

### ***Dedicatoria***

*A mis padres, pilar de todo lo que soy hoy en día.*

*A mi hermana con cariño.*

*A mis abuelos: él siempre pendiente de mi educación  
ella, siempre cuidando de mí incluso cuando ya no la veo.*

*Y a los animales experimentales que dieron su vida para que este proyecto  
pudiera concluirse.*

# ÍNDICE

	Página
<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>2</b>
2.1. <i>Receptores sensoriales y canales iónicos</i>	2
2.2. <i>Familia de canales TRP</i>	2
2.3. <i>El canal TRPV1</i>	4
2.4. <i>Glicosilación de proteínas</i>	7
2.5. <i>El canal TRPV1 y la glicosilación</i>	11
<b>3. Hipótesis</b>	<b>12</b>
<b>4. Objetivo general</b>	<b>12</b>
4.1. <i>Objetivos particulares</i>	12
<b>5. Material y método</b>	<b>12</b>
5.1. <i>Cultivo celular y expresión del canal TRPV1</i>	12
5.2. <i>Obtención de proteínas totales y ensayos de Western Blot (WB):</i>	13
5.3. <i>Tinción de geles</i>	17
5.4. <i>Análisis in silico</i>	17
5.5. <i>Construcción de mutantes</i>	17
5.6. <i>Transformación de bacterias</i>	18
5.7. <i>Ensayos electrofisiológicos</i>	19
5.8. <i>Tratamiento con glicosilasas</i>	20
5.9. <i>Precipitación con Concanalina A</i>	21
5.10. <i>Precipitación con SNA-I</i>	23
5.11. <i>Inmunocitoquímica</i>	24
5.12. <i>Ensayos de conducta de dolor (tiempo de lamido de la pata).</i>	26
<b>6. Resultados</b>	<b>27</b>
6.1. <i>El canal TRPV1 muestra un corrimiento electroforético diferencial entre especies</i>	27
6.2. <i>La secuencia de glicosilación del canal TRPV1 difiere entre especies</i>	30
6.3. <i>El aminoácido "X" es determinante para la glicosilación en el canal TRPV1</i>	31
6.4. <i>Las proteínas TRPV1 mutantes son funcionales</i>	32
6.5. <i>Localización subcelular de mutantes</i>	34
6.6. <i>El canal TRPV1 se encuentra N-glicosilado</i>	37
6.7. <i>TRPV1 de humano y rata contienen residuos tipo Manosa</i>	37
6.8. <i>Carbohidratos complejos en el canal TRPV1</i>	38
6.9. <i>La nocicepción mediada por el canal TRPV1 es atenuada al modificar su glicosilación</i>	39

<b>7. Discusión</b>	<b>41</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>50</b>
<b>10. ANEXO I – Tablas</b>	<b>52</b>
<b>11. ANEXO II - Protocolos para la preparación de Geles de poliacrilamida</b>	<b>57</b>
<b>12. ANEXO III - Protocolos para mutaciones puntuales por PCR doble</b>	<b>58</b>
<b>13. Imágenes Suplementarias</b>	<b>61</b>
<b>14. Referencias</b>	<b>62</b>

## 1. Resumen

*El canal iónico TRPV1 forma parte de una familia de sensores moleculares que comunican a la célula con el ambiente exterior y responden a diferentes estímulos (tanto físicos como químicos). Particularmente el canal TRPV1 es un sensor importante para la percepción de estímulos nocivos. Como consecuencia de su participación en el sistema sensorial, el estudio del canal permite determinar con mayor exactitud su papel en procesos como la inflamación y el dolor. Por ello es fundamental contribuir al estudio completo de sus características estructurales, como lo es su estado de glicosilación. La glicosilación tipo N puede ramificarse con carbohidratos complejos como el ácido N-acetil-neuramínico que se encuentra cargado negativamente. Esta estructura se sabe que influye en el funcionamiento de canales de membrana. De forma relevante, el canal TRPV1 presenta un sitio de N-glicosilación cercano al poro. El presente trabajo tuvo como objetivos caracterizar la glicosilación del canal TRPV1, comparar su perfil de glicosilación entre especies. Para esto se demostró inicialmente que el perfil electroforético de la proteína de origen humano difiere a su contraparte en roedores (rata y ratón) que conservan un perfil correspondiente a un canal ramificado en su glicosilación. Posteriormente se encontró que las diferencias entre humano y los roedores analizados, se localizan dentro de la secuencia consenso de glicosilación, en el residuo 605 designado como "aminoácido X". Demostramos que modificar únicamente este aminoácido contribuye a revertir el perfil electroforético de la proteína TRPV1 entre especies. Para determinar los componentes de la glicosilación ramificada y no ramificada de TRPV1 se utilizaron dos métodos enzimáticos y de interacción con lectinas. Así se observó que la glicosilación de rata y humano difiere en los carbohidratos terminales, ya que hasta el momento no se ha podido comprobar la presencia del ácido N-acetil-neuramínico en el canal TRPV1 de humano. Finalmente se demostró la importancia de este carbohidrato en la nocicepción de roedores, utilizando una endoglicosilasa específica sobre un modelo de dolor. Es importante reconocer que este trabajo representa una aproximación inicial para determinar la importancia fisiológica de la glicosilación del canal TRPV1 y su papel en la nocicepción.*

## **2. Introducción.**

### *2.1 Receptores sensoriales y canales iónicos*

*El estímulo nocivo, ya sea mecánico, químico o incluso térmico, es percibido por el nociceptor convirtiéndolo en un impulso eléctrico que envía la información a través de la médula espinal hacia el cerebro, donde la experiencia sensorial puede ser interpretada como dolor (Rowette et al., 2015). Los nociceptores son neuronas especializadas, caracterizadas por presentar proteínas embebidas en su membrana plasmática que funcionan como canales iónicos y que sirven para la percepción de los estímulos nocivos. Aunque la estructura base de la membrana plasmática se encuentra compuesta por lípidos, es gracias a esas proteínas de membrana que las células y el organismo entero pueden reaccionar a uno o varios estímulos de forma muy específica según el tipo de canales iónicos que contengan (Purves, 2001).*

*Los canales iónicos son complejos proteicos que permiten el intercambio selectivo de iones entre el citoplasma y el medio extracelular (Alberts y Johnson; 2002). Aunado al intercambio selectivo, los canales iónicos pueden fluctuar de su estado abierto a cerrado y viceversa conforme a su interacción con diferentes estímulos físicos y electro-químicos (Aryal et al., 2016; Alberts y Johnson, 2002).*

### *2.2 Familia de canales TRP*

*La familia de canales iónicos denominada Receptores de Potencial Transitorio o TRP (por sus siglas en inglés Transient Receptor Potential), contiene miembros que funcionan como sensores moleculares únicos con características polimodales. Esto significa que tienen la capacidad de responder a diferentes tipos de estímulos, tanto físicos como químicos (Zheng, 2013; Clapham, 2010). Temperatura, voltaje, estímulos mecánicos, ligandos endógenos y exógenos, son solo algunos de los agentes que pueden activar a miembros de esta familia de canales (Zheng, 2013; Nilius y Owsianik, 2011). Los primeros indicios de genes*

*pertenecientes a la familia TRP, se encontraron en 1969 en células de los ojos de mutantes de *Drosophila sp.*, en donde se reportó que los canales iónicos resultantes respondían a estímulos luminosos de forma transitoria; otorgando así el nombre de la familia (Cosens y Manning, 1969). Sin embargo, la proteína que se encontró en mosca, fue descrita por completo hasta 1992 (Hardie y Minke, 1992). El siguiente miembro se encontró en *Caenorhabditis elegans*, demostrando con ello la amplia distribución de estos canales a través del reino animal abarcando desde nemátodos e insectos y más tarde hasta mamíferos (Colbert y Bargmann, 1995; Minke, 2010).*

*Existen 29 integrantes de la familia TRP, de los cuales, 28 miembros han sido reportados en mamíferos (Zheng, 2013; Nilius y Owsianik, 2011). Con base en la homología de su secuencia polipeptídica y su similitud en estructura, los miembros de la familia TRP pueden clasificarse en 7 subfamilias: TRPV (vaniloide), TRPA (anquirina), TRPC (canónico), TRPM (melastatina), TRPML (mucolipina), TRPP (policistina) y la subfamilia TRPN (NO-mecano-potencial-C) con un solo integrante en vertebrados no mamíferos (Nilius y Owsianik, 2011; Montell et al., 2002; Minke, 2010; Nilius y Owsianik, 2011).*

*Todos los miembros de la familia TRP forman proteínas tetraméricas que pueden dar lugar a heterotetrámeros u homotetrámeros; cada subunidad presenta 6 dominios transmembranales (S1 a S6) con un asa entre los segmentos S5 y S6 que da lugar al poro del canal (Nilius y Owsianik, 2011; Morales-Lázaro et al. 2013). Con algunas excepciones, los canales TRP se comportan como canales catiónicos mono y divalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  por ejemplo), no selectivos (Smani et al., 2015). Debido a que también presentan una amplia distribución en tejidos y tipos celulares, las implicaciones de estos canales iónicos se han relacionado con diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Al ser transportadores de diferentes cationes, los TRP pueden causar cambios en los niveles intracelulares de iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  dando lugar a la activación de canales dependientes de voltaje, entre otras respuestas.*

Además de la percepción de estímulos sensoriales, a esta familia de canales se le ha atribuido su participación durante el desarrollo, la adquisición de memoria, la termorregulación, neuroprotección y en la quimiotaxis (**Ramsey et al., 2006; Zheng, 2013**). La desregulación de estas proteínas, producida por mutaciones aberrantes, o una localización celular anormal y modificaciones en los niveles de expresión de canales TRP se ha asociado principalmente con desórdenes cardiovasculares, diabetes mellitus y algunos tipos de cáncer (**Smani et al., 2015**).

### 2.3 El canal TRPV1

La subfamilia TRPV (Vaniloide) contiene 6 miembros (TRPV1-6). Juegan un papel muy importante como receptores de estímulos térmicos, mecánicos y osmóticos, con énfasis en tejidos vasculares y el sistema nervioso periférico (**Baylie y Brayden, 2010; Sagar et al., 2010**).

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) fue el primer miembro de esta subfamilia en ser caracterizado; se identificó por primera vez en 1997 a partir de neuronas derivadas de ganglios de la raíz dorsal (DRG), de donde fue aislado y clonado (**Caterina et al., 1997**). También se ha observado expresión del canal TRPV1 en neuronas del ganglio Trigeminal (TG). De forma muy específica este canal iónico se encuentra expresado dentro de estos ganglios (DRG y TG) en poblaciones de neuronas medianas y pequeñas (poco mielinizadas o no mielinizadas, respectivamente), caracterizadas por constituir las fibras nerviosas de conducción media (tipo A $\delta$ ) y de conducción lenta (tipo C), respectivamente. (**Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998**). En ambas poblaciones neuronales se sabe que se procesan y transmiten señales de nocicepción (**Caterina et al., 1997; Rosenbaum y Simon, 2007; Caterina y Julius, 2001**).

El canal TRPV1 cuya expresión principal es en neuronas del sistema nervioso periférico, también se expresa en áreas restringidas del sistema nervioso central como hipocampo, bulbo olfatorio, cerebelo, tálamo, corteza cerebral y amígdala (**Menigoz y Boudes, 2011; Tóth et al., 2005**). Además, se ha encontrado

evidencia de la expresión del canal TRPV1 en otros tejidos dentro de los cuales se encuentran de forma relevante: el sistema vascular **(Tóth et al., 2014)** córnea, piel (queratinocitos) y en tejido graso **(Lee et al., 2015)**.

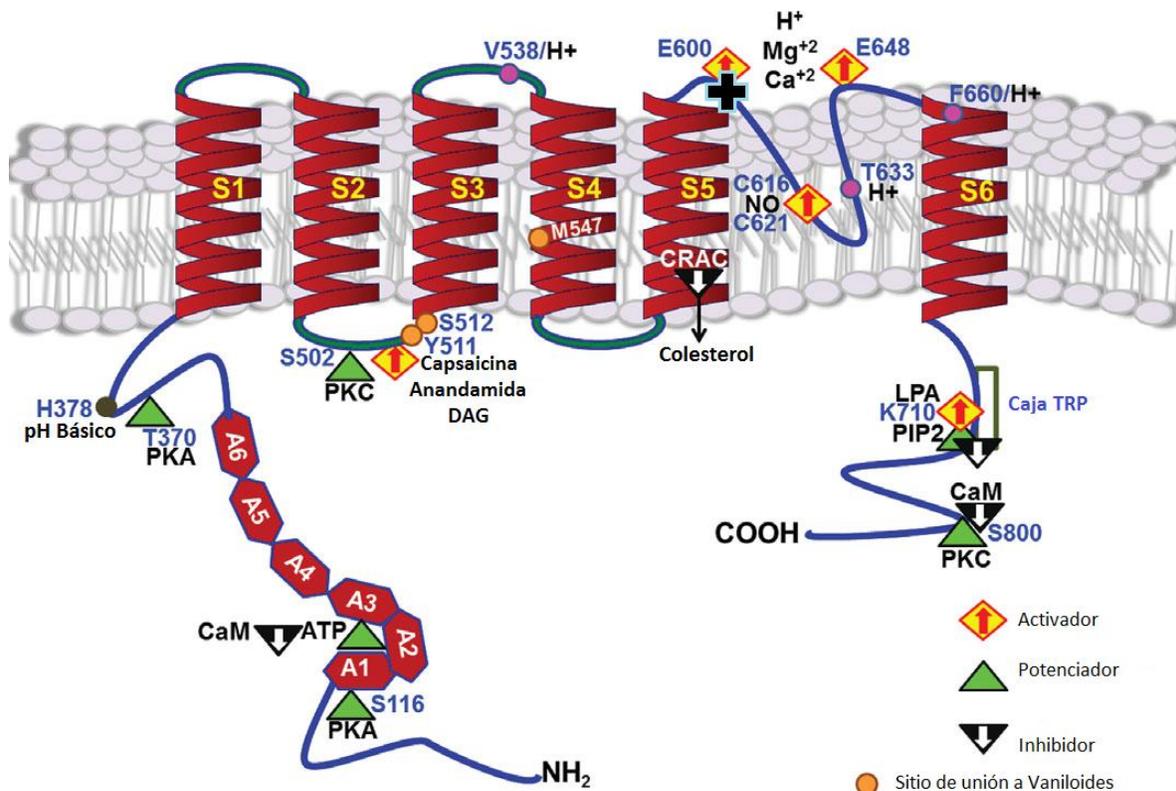
La activación del canal TRPV1 en los nociceptores, promueve la liberación de neurotransmisores en las terminales nerviosas que conllevan a la inflamación y dolor. Por ello el canal TRPV1 se ha relacionado con el dolor crónico en diferentes patologías tales como el cáncer de hueso **(Wan, 2016)**; la neuropatía diabética **(Silva et al., 2016)** y el infarto isquémico **(Miyanojara et al., 2015)**

El canal TRPV1 es polimodal en su forma de activación, es decir, responde a diversos estímulos que pueden ser físicos y químicos; su actividad se puede modular por una gran cantidad de moléculas exógenas y endógenas **(Morales-Lázaro et al., 2013; Cui et al., 2016)**. Desde hace más de una década se encuentra bien establecido que TRPV1 funciona como detector de cambios en el pH, debido a que puede activarse por pH extracelular ácido y por pH intracelular básico; también por moléculas endógenas de carácter lipídico **(Morales-Lázaro, et al., 2013)** y por temperaturas de  $\geq 42^{\circ}\text{C}$  **(Yao et al. 2010)**. Sin embargo, la activación del canal TRPV1 por temperatura puede cambiar si se encuentra en un estado "sensibilizado" (por ejemplo, fosforilación del canal), como podría suceder en el proceso de inflamación, haciendo que el canal se pueda activar incluso a la temperatura corporal **(Morales-Lázaro et al., 2013)**.

Aun cuando se han determinado varios agonistas para el canal TRPV1, pocos son los antagonistas descritos para este canal, entre ellos el ácido oleico **(Morales-Lázaro et al., 2016)** y recientemente se ha buscado descifrar nuevas proteínas de interacción con este canal **(Juárez, 2016)** para determinar blancos terapéuticos emergentes en la vía del dolor dependiente de TRPV1.

Estructuralmente un canal TRPV1 funcional es un homotetrámero y cada una de las subunidades que le componen presenta 6 dominios transmembranales (S1-S6, Fig 1). Particularmente, entre el S5 y S6 se encuentra una región de asa que en su configuración de tetrámero dará origen al poro del canal. Además, tanto el

carboxilo y amino terminal se encuentran hacia el interior celular. Presenta un dominio de repetidos de anquirinas (A1-A6) cercano al amino terminal, el cual se ha relacionado como un dominio que permite adecuadamente el tráfico de algunos miembros TRPV a la membrana plasmática y su correcta oligomerización (Erler et al., 2004; Arniges et al., 2006) y específicamente en el canal TRPV1 se ha comprobado que actúa como un dominio de interacción con múltiples ligandos y proteínas tales como el ATP y la Calmodulina (Lishko et al., 2007; Morales-Lázaro et al., 2013). (Fig.1)



**Figura 1. Esquema de una subunidad del canal TRPV1 en membrana.** La figura muestra la organización topológica de una subunidad del canal TRPV1 en membrana y la distribución de los pasos transmembranales (S1-S6); el asa en la región que dará lugar al poro como homotetrámero entre los dominios S5 y S6. Tanto el carboxilo como el amino terminal se encuentran de forma intracelular. Cerca al amino terminal destaca el dominio repetido de anquirinas (A1-A6) y la caja TRP cercana al carboxilo terminal. Se denota con una cruz negra, el sitio descrito para la glicosilación del canal (N604) y se muestran diferentes activadores, potenciadores e inhibidores del canal. (Imagen tomada y editada de Morales-Lázaro et al., 2013).

Cuando es activado, el canal TRPV1 permite el paso de cationes con la siguiente afinidad  $\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$  (Yao et al., 2010; Nilius y Flockerzi, 2014). Además, el canal TRPV1 presenta un fenómeno denominado “dilatación del poro”, que en este caso permite el ingreso a la célula de un mayor número de iones por canal y al ser un canal no selectivo la diversidad de iones aumenta. Esta actividad se ha propuesto ser dependiente de la glicosilación del canal (Veldhuis et al., 2012) y, por otra parte, el fenómeno de dilatación aumenta conforme a la concentración y tiempo de exposición del agonista (Chung et al., 2008).

Como consecuencia de su importante participación en el sistema sensorial, la investigación del canal TRPV1 se ha enfocado en determinar su papel complejo en la inflamación y el dolor. Sin embargo, es importante contribuir al estudio completo de sus características estructurales, por ejemplo, su nivel de glicosilación.

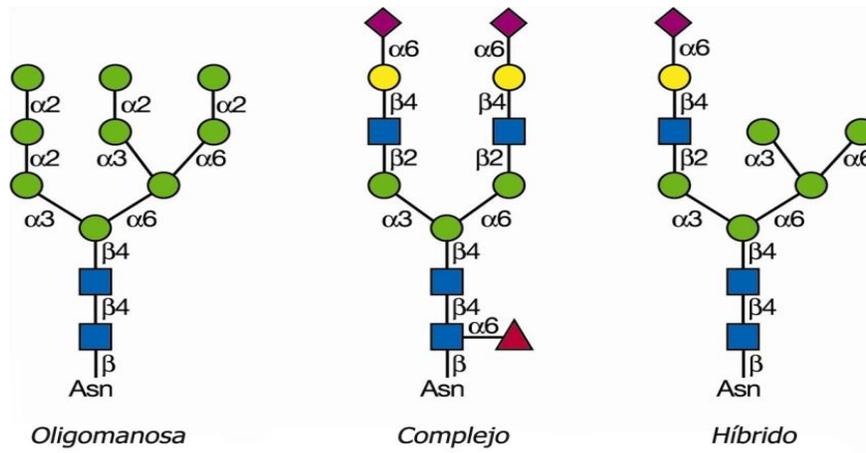
#### 2.4 Glicosilación de proteínas

Una característica importante de las proteínas de membrana como lo es el canal TRPV1, es su glicosilación. La mayoría de las proteínas que se encuentran en membrana plasmática tienen algún grado de glicosilación, la cual consiste en la unión covalente de carbohidratos a una macromolécula por acción enzimática (Cohen, 2006). Es importante diferenciar de la glicación, proceso que se refiere a la reacción no enzimática de carbohidratos no reductores con proteínas, lípidos o ácidos nucleicos (Ahmed, 2005). La glicosilación de una proteína, no solo se trata de una secuencia de carbohidratos unidos a un aminoácido, esta modificación es el resultado fiel de una red compleja de cascadas enzimáticas, organelos y otros actores que son imprescindibles para generar un correcto ensamblaje de modificaciones co y pos traduccionales de carbohidratos asociados entre sí y hacia una proteína (Stowell y Cumming, 2015).

Las glicosilaciones en general, pueden regular a los canales iónicos mediante tres mecanismos: primero, promoviendo su plegamiento y transporte a membrana plasmática; segundo, afectando su estabilidad o distribución en la membrana. Por

último, la glicosilación puede alterar las propiedades moleculares y biofísicas del canal interviniendo en su funcionamiento para la potenciación o inhibición de su actividad **(Scott y Panin, 2014)**.

Existen dos principales tipos de glicosilación, la O-glicosilación, en la cual las proteínas se glicosilan en el grupo hidroxilo de residuos de serina o treonina y existe la N-glicosilación en la cual el aminoácido glicosilado es un residuo de asparagina. Ésta última, es el tipo de glicosilación que se encuentra altamente representada en el sistema nervioso y se ha postulado como modulador importante de la transmisión neuronal y excitabilidad de células nerviosas **(Scott y Panin, 2014)**. La glicosilación tipo N está ligada únicamente a residuos de asparaginas dentro del contexto Asn-X-Thr donde X representa cualquier aminoácido excepto Prolina **(Ferris, 2014)**. Sin embargo, dado que no todas las secuencias Asn-X-Thr dentro de una proteína se glicosilan, algunos autores afirman que el aminoácido X en realidad repercute en la eficiencia de glicosilación de una secuencia. Por lo tanto, existen secuencias que son mejores aceptoras de oligosacáridos y esto les confiere una mayor eficiencia o probabilidad a ser glicosiladas **(Shakin-Eshleman et al., 1996)**. La glicosilación tipo N puede asumir distintas combinaciones moleculares, todas estas combinaciones poseen una secuencia base de 2 moléculas de N-acetilglucosamina y 3 moléculas de manosas ((GlcNAc)<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>). (Fig. 2) **(Cohen, 2006)**

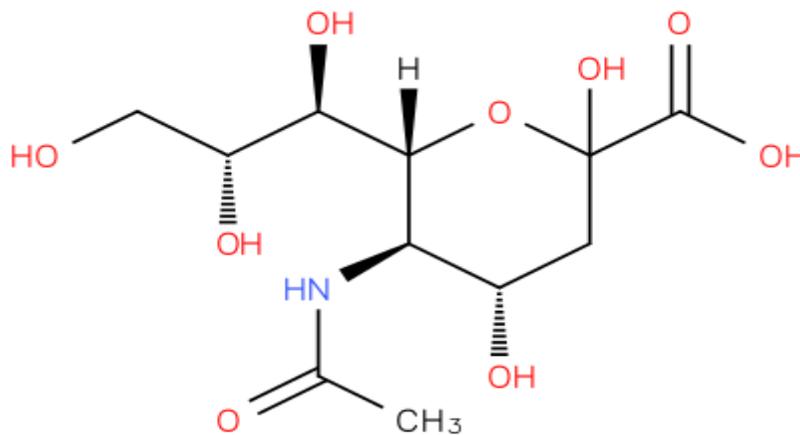


**Representaciones Simbólicas de los Monosacáridos y enlaces más comunes**

● Galactosa (Gal)	★ Xylosa (Xyl)
■ N-Acetilgalactosamina (GalNAc)	◆ Ácido N-Acetil neuramínico (Neu5Ac)
◻ Galactosamina (GalN)	◇ Ácido N-Glicolil neuramínico
● Glucosa (Glc)	◇ Ácido 2-Ceto-3-desoxinonóico (Kdn)
■ N-Acetilglucosamina (GlcNAc)	▲ Fucosa (Fuc)
◻ Glucosamina (GlcN)	◆ Ácido Glucurónico (GlcA)
● Manosa (Man)	◇ Ácido Idurónico (IdoA)
■ N-Acetilmanosamina (ManNAc)	◇ Ácido Galacturónico (GalA)
◻ Manosamina (ManN)	◇ Ácido Manurónico (ManA)

**Figura 2. Los carbohidratos tipo N pueden tener 3 ramificaciones principales.** Típicamente los oligosacáridos tipo N presentan una secuencia núcleo conservada: dos N-acetil glucosamina y tres manosas ((GlcNAc)<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>). Tres derivados de esta estructura pueden presentarse según los monosacáridos que se agreguen posteriormente: Oligomanosa, ramificaciones compuestas por cadenas de manosa. Complejo, puede contener diferentes carbohidratos como Galactosa, Fucosa y Ácido N-acetil-neuramínico (Neu5Ac). Híbrido, combina ramificaciones de ambos tipos (oligomanosa y complejo). (Imagen tomada y editada de Varki et al., 2009).

Debido a la complejidad en el proceso de formación de una glicosilación y al impacto que esta tiene para diversas funciones celulares, es innegable asumir que alteraciones en este proceso puedan causar un impacto en la funcionalidad de la célula (Stowell, et al. 2015; Sethi y Fanayan, 2015).



**Figura 3. Estructura química del ácido N-acetil-neuramínico.** La glicosilación tipo N puede contener en las terminales de su ramificación ácido N-acetil-neuramínico (Neu5ac o NANA), que se encuentra cargado negativamente. Tomado de Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI)

Los carbohidratos terminales de una glicoproteína, pueden afectar sus características estructurales. Desde hace tiempo, se sabe que el ácido N-acetil-neuramínico (carbohidrato cargado negativamente), influye en las propiedades físico-químicas de la proteína (Schauer, 1982). Por ejemplo, haciendo énfasis en la señalización celular e interacciones entre huésped y células hospederas, el ácido N-acetil-neuramínico facilita la entrada de patógenos a la célula como sucede en el caso de la influenza (Cohen et al., 2016.; Walop et al., 1960). Otros efectos en la fisiología celular se han determinado en modelos animales de dolor crónico, en los cuales se ha encontrado que la remoción del ácido N-acetil-neuramínico de las glicoproteínas de membrana por medio de acción enzimática (neuraminidasa), disminuye la velocidad de transmisión eléctrica de las células y la sensación del dolor en los animales (Li-CX et al., 2015; Orestes et al., 2013).

Aunado a ello, diversos estudios han propuesto que el ácido N-acetil-neuramínico, confiere una carga negativa a la superficie celular y este tipo de carbohidrato terminal se ha identificado en algunos canales iónicos contribuyendo de manera importante en su funcionamiento (Eric Bennett, 1997).

## 2.5 El canal TRPV1 y la glicosilación

Existen algunos reportes acerca de la glicosilación del canal TRPV1 de rata, el cual se encuentra siempre N-glicosilado en la asparagina 604 (N604), posición cercana a la región del poro cuando es expresado de forma heteróloga en las líneas celulares HEK293, F11, CHO y en ovocitos de *Xenopus*. Esta modificación le confiere al canal TRPV1 una diferencia en su peso molecular de aproximadamente 12 kD entre la proteína glicosilada y la no glicosilada (**Kedei et al., 2001**). Es importante mencionar que hasta la fecha se desconoce si el canal TRPV1 de humano se glicosila de igual manera que su ortólogo en rata. Por otra parte, se han encontrado reportes que indican una disminución en la desensibilización del canal TRPV1 ante la activación por capsaicina cuando el canal se encuentra glicosilado, es decir; esta modificación puede tener una repercusión directa en la respuesta de dolor mediada a través del canal TRPV1 (**Veldhuis, 2012**).

La glicosilación tipo N, es una modificación importante de una gran cantidad de canales iónicos del sistema nervioso (**Scott y Panin, 2014**). En el caso específico de la familia TRP, existen ensayos sobre los canales TRPV5 y TRPM4, donde demuestran que la presencia de esta modificación promueve la estabilidad de la proteína en membrana (**Cohen, 2006; Chang et al., 2005; Woo et al., 2013**)

Por otra parte el canal TRPM8 de la misma familia y termosensible al igual que el canal TRPV1, presenta un sitio de N-glicosilación. Se ha comprobado que al mutar el sitio de glicosilación, la respuesta de este canal frente a temperaturas bajas y su agonista mentol se ve comprometida y disminuida. (**Pertusa et al., 2012**). De acuerdo a lo anterior, es de gran importancia caracterizar la glicosilación del canal TRPV1 como una aproximación para estudiar el papel que juega la glicosilación del canal y su posible repercusión en la vía del dolor.

### **3. Hipótesis.**

*La eficiencia de glicosilación del canal TRPV1 es diferencial entre especies.*

### **4. Objetivo general**

*Caracterizar la glicosilación del canal TRPV1 de humano y de rata, con el fin de obtener un estudio detallado del perfil de glicosilación del canal en cada especie.*

#### **4.1 Objetivos particulares.**

- i. Analizar el perfil de glicosilación de TRPV1 de roedores y humanos.*
- ii. Análisis in silico de las secuencias de TRPV1 de diferentes especies en el sitio consenso para la glicosilación.*
- iii. Mediante mutagénesis sitio dirigida, comprobar si la secuencia consenso de glicosilación en TRPV1 es determinante para la eficiencia de glicosilación entre especies.*
- iv. Monitorear cambios en la localización subcelular de las proteínas mutantes.*
- v. Caracterizar la glicosilación del canal TRPV1 mediante el uso de lectinas y glicosilasas.*
- vi. Determinar la relevancia de la glicosilación en la sensación del dolor a nivel conductual.*

### **5. Material y Método**

#### 5.1 Cultivo celular y expresión del canal TRPV1:

*Con el objetivo de expresar y analizar el estado de glicosilación del canal TRPV1, se utilizó la línea celular HEK293 adherente como sistema de expresión heterólogo. Las condiciones de cultivo celular fueron 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron cultivadas en medio DMEM complementado con Penicilina (10,000 µg/mL)-Estreptomicina (10,000 u/mL) y Suero Fetal Bovino (10%). Las células*

fueron transfectadas con el plásmido pcADN3.1+rTRPV1, con pcADN3.1+hTRPV1 (que contienen la secuencia codificante para el canal TRPV1 de rata y de humano, respectivamente) o con las versiones de las construcciones mutantes de cada canal.

Las transfecciones se realizaron en cajas de 35 mm, con 100 ng del plásmido pcDNA3.1+rTRPV1 el cual contiene la secuencia codificante para la proteína TRPV1 de origen de rata y con 200 ng de pcDNA3.1+hTRPV1, que contiene la secuencia codificante para la proteína TRPV1 de origen de humano; concentraciones probadas previamente en el laboratorio. Para el caso de las mutantes se utilizaron las mismas concentraciones según el plásmido del que provenían (ver Construcción de mutantes). Para los experimentos de precipitación con lectinas, se realizaron transfecciones de células cultivadas en cajas individuales de 100 mm con 1.5 µg del plásmido pcDNA3.1+rTRPV1 y 3 µg de pcDNA3.1+hTRPV1.

Para las transfecciones, se utilizó el agente policationico (Jet-Pei<sup>®</sup>) que permite la internalización del ADN a la célula. El ADN y el Jet-Pei<sup>®</sup> se diluyen por separado en volúmenes iguales de NaCl 150 mM, de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Al ser policationico, el agente Jet-Pei<sup>®</sup> atrae las moléculas negativamente cargadas del ADN generando un complejo que interacciona con proteoglicanos de la membrana celular promoviendo su endocitosis. Para promover la formación del complejo, la mezcla de ADN y Jet-Pei<sup>®</sup> se incubó como se indica, a temperatura ambiente por 30 minutos antes de agregarse a las células.

## 5.2. Obtención de proteínas totales y ensayos de Western Blot (WB):

Con el fin de determinar las diferencias en el perfil de glicosilación del canal TRPV1, se obtuvieron los extractos de proteína total de las células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1 de rata o de humano. Para ello, 48 horas posteriores a la transfección, las muestras celulares se trataron con buffer de lisis

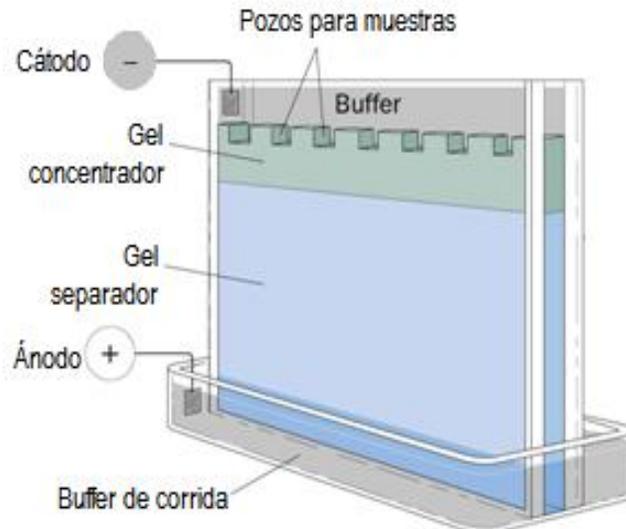
que contiene inhibidores de proteasas (Complete) y fosfatasas (NaF) para la extracción de proteína total. (Tabla 1; Anexo I); por cada caja de cultivo celular de 35 mm de diámetro, se agregó un volumen de 120  $\mu$ l de buffer de lisis y 200  $\mu$ l para cada caja de 100 mm. El lisado celular fue recolectado y centrifugado a 13,500 rpm para la separación del sobrenadante que contiene las proteínas totales solubilizadas.

Posterior a la extracción, se cuantificó la proteína presente en las muestras por medio de la reacción del ácido bicinconínico (BCA). Este método depende principalmente de que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen iones  $\text{Cu}^{2+}$ . Los iones  $\text{Cu}^+$  producidos por la reducción, se unen a dos moléculas de BCA y al hacerlo cambian su estructura electrónica de tal manera que el compuesto ahora absorbe luz a 562 nm y se forma una coloración púrpura. En condiciones alcalinas, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente en la reacción. Las absorbancias de cada una de las muestras fueron obtenidas por medio del lector ELx808 Bio Tek. Mediante la lectura de muestras de proteína de concentraciones conocidas como una curva de albúmina sérica bovina, se hizo una regresión lineal para obtener los valores de cada una de las muestras problema.

La misma cantidad de proteína para cada muestra fue cargada y separada por electroforesis en geles de poliacrilamida (Fig.4) al 10 y 7% (Anexo II). Las muestras se diluyeron con buffer de carga 1x (Tris Cl/SDS pH 6.8 [0.058 M]; Glicerol (5%); SDS (1.66%); DTT [0.1 M]; Azul de bromofenol (0.002%).

Para la electroforesis de proteínas se utilizó buffer de corrida 1x (Tris base [25 mM]; Glicina [192 mM]; y SDS (0.1%)). Posterior a la separación, las proteínas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivilideno (PVDF) por un sistema de transferencia semiseca. La transferencia se realizó en la unidad de transferencia semiseca TE 70XP Hoefer Inc. Se utilizó un Buffer de transferencia (Glicina [39 mM]; Tris base [48 mM]; SDS (0.037%) y MeOH (20%)). Los papeles

filtro empapados en buffer, introducidos debajo y por encima de la membrana y el gel que permanecieron juntos. La transferencia se realizó con un amperaje fijo de 220 mA y máximo voltaje, durante 1 hr 50 minutos.



**Figura 4. Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.** La electroforesis de proteínas por el sistema SDS-PAGE se basa en la separación por el tamaño de las proteínas en la muestra. Para esto, las muestras se cargan en los pozos del gel concentrador que agrupa las muestras a una misma altura, en su borde inferior. Otro gel de mayor tamaño y concentración variable (7 y 10% para este protocolo) es donde se lleva a cabo la separación de proteínas. Ambos se encuentran sumergidos en un buffer de corrida.

La membrana se bloqueó al salir de la transferencia, durante 1 hora utilizando PBS-T con leche descremada al 6%. Lo anterior con el objetivo de realizar la inmunodetección en fase sólida o Western Blot (WB) del canal TRPV1. Para lo cual se utilizó el anticuerpo primario (P19, de origen de cabra, Santa Cruz, Biotechnology) a una dilución 1:1000 en leche al 3% en PBS-T y recurriendo a la inmunodetección de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) como control de carga, mediante el uso del anticuerpo primario (14C10, de origen de conejo, Cell signaling) diluido 1:5000 en PBS-T. En el caso de los geles a menor concentración se utilizaron Calnexina 1:1000 (H70, de origen de conejo, Santa Cruz, Biotechnology) en leche al 3% en PBS-T y/o  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$  1:500 (H300, de origen de ratón, Santa Cruz, Biotechnology) como controles de pureza y/o carga respectivamente. Todos los anticuerpos primarios fueron incubados por toda la noche a 4°C. (Tabla 2; Anexo I)

*Se utilizaron anticuerpos secundarios para la inmunodetección del anticuerpo primario (Tabla 2; Anexo I), de la siguiente forma: para detectar el anticuerpo dirigido a TRPV1 se utilizó el anticuerpo secundario anti-cabra en dilución 1:5000 con leche al 3% en PBS-T, para la detección de GAPDH y calnexina primarios se recurrió al anticuerpo anti-conejo en dilución 1:7500 con leche al 3% en PBS-T; por último, el anticuerpo dirigido al primario de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPasa fue anti-ratón 1:5000 en PBS-T.*

*Todas las imágenes de WB mostradas en este trabajo son representativas de una serie de al menos tres experimentos independientes.*

### 5.3. Tinción de geles

*Posterior a la transferencia de los geles de poliacríalmida se realizó la tinción de las proteínas remanentes en el gel para ser usados como control de carga y poder realizar comparaciones entre las diferentes muestras (tratamientos con lectinas o con glicosilasas). Para la tinción se utilizó EZBlue™ Gel Staining Reagent, una solución de Sigma-Aldrich preparada a pH ácido con base en el agente Brilliant Blue G-250 (Coomasie G-250), un colorante ultrasensible que tiñe proteínas en geles de poliacríalmida y membranas de PVDF. Brilliant Blue G-250 se une a las proteínas por interacciones de Van der Waals entre sus grupos sulfuro y las cargas positivas en los grupos amino de las proteínas.*

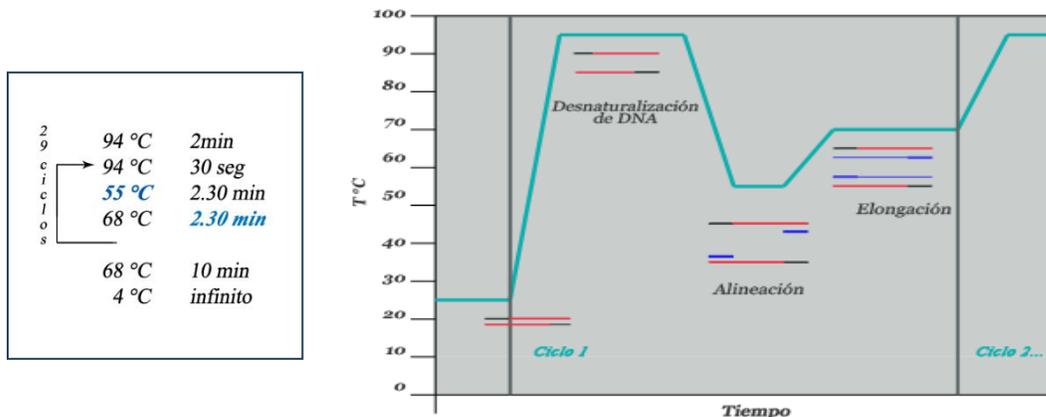
*Para lo cual, primero se fijaron las proteínas al gel mediante la incubación durante 15min en una solución [MeOH (50%); H<sub>2</sub>O (40%) y ácido acético (10%)]. Se enjuagó el exceso con agua Mili-Q. Posteriormente, se incubó el gel en la solución de tinción (EZBlue™) de 15 a 60 min, finalmente se retiró la solución de tinción y el gel fue enjuagado con agua MiliQ. El bandeo de proteínas resultante sirvió como referencia de control de carga para cada muestra.*

#### 5.4. Análisis in silico:

Las secuencias de la proteína TRPV1 fueron obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information. Se utilizaron aquellas que pertenecen a humano, rata y ratón. Dichas secuencias fueron alineadas en el programa Vector NTI Advance®. Poniendo especial interés en los componentes del sitio de glicosilación.

#### 5.5. Construcción de mutantes:

Por medio de mutagénesis sitio dirigida, se realizaron una serie de construcciones mutantes en el sitio de glicosilación de TRPV1 tanto humano como rata. (Tabla 3). Todas las mutaciones sitio dirigidas se hicieron por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica que amplifica un segmento de ADN por medio de la enzima polimerasa en tres pasos fundamentales (Fig. 5).



**Figura 5. Etapas en el ciclo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica dirigida a la amplificación en gran escala de muestras de ADN. **Izquierda** protocolo y rangos de temperatura utilizados en un ciclo de PCR. En azul se muestran la temperatura y tiempo para la alineación y elongación, respectivamente. Ambas son variables de acuerdo a la longitud y el porcentaje de GC en los oligos utilizados. **Derecha** Esquema que representa las etapas de un ciclo de PCR. Desnaturalización de ADN: la temperatura promueve la ruptura de los enlaces que permitían la doble cadena y se obtienen dos hebras de ADN de cadena sencilla. Alineación: los oligonucleótidos se alinean con sus complementarios en el ADN molde. Elongación: la polimerasa se activa a esta temperatura y comienza la síntesis de la cadena complementaria del ADN molde. El ciclo se repitió 29 veces para amplificar la cantidad del producto de elongación.

*El método consiste en utilizar cuatro oligonucleótidos, dos de ellos con la mutación a insertar y dos oligonucleótidos complementarios que flanquean cada uno a su propio oligo mutado. En la primera reacción (PCR I) se inserta la mutación al amplificar cada uno de los oligos mutantes por separado, la segunda (PCR II) genera un producto de doble cadena con ambos oligos mutados, insertando por completo la mutación. Al finalizar la PCR II el producto se digiere con enzimas de restricción específicas que cortan una sola vez tanto el ADN templado como al vector; mismas que se utilizaron para digerir el plásmido de TRPV1 para una posterior ligación de ambos. Todos los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en Sigma Adrich y se encuentran descritos en la Tabla 4; Anexo I.*

*Todas las mutaciones sean del canal TRPV1 de origen de humano o rata, se hicieron con el plásmido pcDNA3.1+TRPV1 como molde. Los requerimientos para la reacción de la polimerasa en cada paso, se indican más adelante (Anexo III). Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 0.8% con Bromuro de etidio. La visualización del gel se hizo en un transiluminador de luz UV. Después de la segunda PCR las muestras fueron digeridas con las enzimas de New England BioLabs® según el caso, para insertar el fragmento en el molde previamente digerido con las mismas enzimas y se hizo una ligación con ambos fragmentos.*

#### 5.6. Transformación de bacterias:

*Se trabajó con bacterias competentes de la cepa DH5α de Escherichia coli, que tienen una eficiencia de transformación de  $10^6$  bacterias por  $1\mu\text{g}$  de ADN. Las bacterias que se encontraban a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  se colocaron en hielo para su descongelación. El producto de la ligación ( $10\ \mu\text{L}$ ) se añadió a  $200\ \mu\text{L}$  de bacterias competentes y la mezcla se incubó durante 30 min, dando un choque térmico durante un minuto de  $42^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar el choque térmico, el tubo con la mezcla se regresó al hielo durante 2 min más. Posteriormente, se agregaron (800*

*μL) de medio LB para el crecimiento de la colonia y se incubó durante una hora a 37°C con agitación. Las bacterias se separaron por centrifugación (6 000 rpm, 5 min), se retiraron 800 μL de sobrenadante y se mezcló el botón bacteriano con el medio restante.*

*Se tomó una alícuota de bacterias transformadas y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C en placas de medio LB complementado con Ampicilina, ya que el plásmido utilizado contiene un gen de resistencia a este antibiótico y se utilizó como indicador positivo de transformación. De las colonias obtenidas se extrajo el ADN por lisis alcalina.*

*Para comprobar que la colonia obtenida fuera una mutante positiva se realizó una digestión con una enzima de restricción específica para cada mutación. Los productos se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. El patrón de bandeo fue comparado utilizando el plásmido Wild Type (WT) digerido con la misma enzima como control. Posteriormente fue enviado a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular para su secuenciación.*

#### 5.7. Ensayos electrofisiológicos:

*El sistema HEK293 adherente fue cotransfectado con pcADN3.1+rTRPV1 o pcADN3.1+hTRPV1 (nativo o mutante) y pIRES-GFP (BD Biosciences). Las células se cultivaron con las mismas condiciones de CO<sub>2</sub> y temperatura descritas anteriormente sobre cubreobjetos previamente recubiertos con poli-D-lisina (0.5 mg/ml). Cuarenta y ocho horas posteriores a la transfección se realizaron experimentos electrofisiológicos.*

*Estos experimentos fueron realizados por medio de la técnica de Patch clamp, en la modalidad de parche escindido y en la configuración inside-out. Se utilizaron micropipetas de borosilicato con una resistencia de 3-5 MΩ, un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti-S) con lámpara de tungsteno (Nikon Intensilight C-*

HGFI), un amplificador EPC10 (HEKA Elektronik), micromanipulador motorizado MO 225 (Sutter Instruments) y un sistema de recambio rápido de soluciones RSC-200 (BioLogic, Science Instruments).

Para verificar la funcionalidad de cada construcción mutante, se analizó su activación por capsaicina aplicando al parche de membrana con expresión de canales TRPV1 silvestres o mutantes, 4  $\mu$ M de capsaicina disuelta en una solución simétrica de registro NaCl/HEPES/EDTA (130 mM NaCl, 10 mM HEPES y 1 mM EDTA; en pH 7.2-7.4)

Las corrientes generadas se registraron mediante la aplicación de pulsos de voltaje desde -120 mV a +120 mV con un potencial de mantenimiento de 0 mV. Los registros se realizaron con el programa Patchmaster (HEKA Instruments) y se analizaron con el software Igor Pro.

#### 5.8. Tratamiento con glicosilasas:

Las glicosilasas son enzimas que rompe enlaces entre mono y oligosacáridos, existen dos grandes grupos: aquellas que hidrolizan enlaces contenidos en glicosilaciones tipo N (carbohidratos enlazados a residuos de asparagina) y aquellas que hidrolizan compuestos tipo O-glicosilación (carbohidratos enlazados al grupo hidroxilo de residuos serina o treonina) y S-glicosilación (carbohidratos unidos a los átomos sulfuro de residuos de cisteína). De esta forma; el uso de las glicosilasas es una herramienta que ayuda en el estudio del perfil de glicosilación de una proteína específica.

Con la finalidad de caracterizar el tipo de glicosilación presente en el canal TRPV1, se dieron tratamientos con glicosilasas específicas (Tabla 5; Anexo I) de Sigma Adrich®.

Los tratamientos con glicosilasas se aplicaron en extractos de proteína. El

tratamiento se aplicó después de la obtención de proteína total de las células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1. Se utilizó 1  $\mu$ l de la enzima correspondiente (Peptide-N-Glycosidase F (PNGasa F), neuraminidasa o galactosidasa), por cada 40  $\mu$ g de proteína total y se incubaron por 48 horas con la enzima a 37°C.

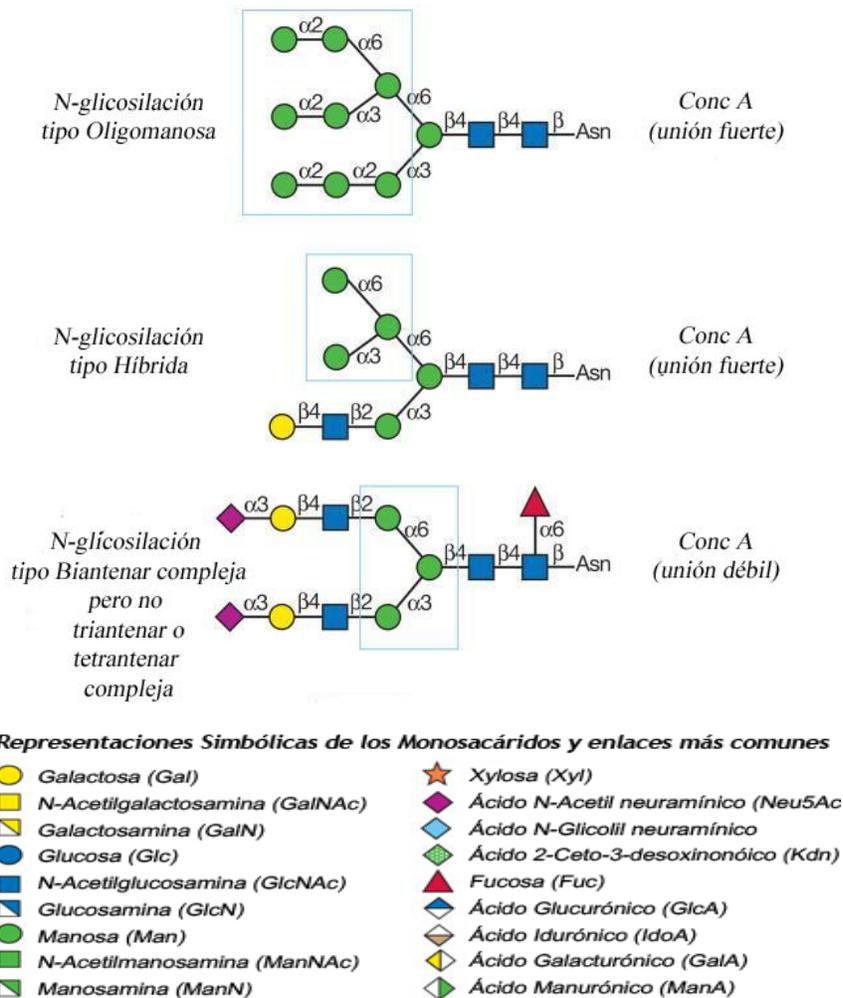
### 5.9. Precipitación con Concanalina A:

Las lectinas son proteínas no enzimáticas útiles para la identificación de glicoproteínas por su nivel de especificidad. Algunos de sus usos más comunes son: ensayos tipo ELISA; microarreglos (Haab, 2012); separación de células por su estado de glicosilación, como en la cromatografía por afinidad; purificación y caracterización por reconocimiento de glico-conjugados; entre otros (Varki, et al. 2009).

Para comprobar la existencia de altas manosas en la glicosilación de TRPV1 se precipitó el canal TRPV1 con Concanalina A, lectina ampliamente utilizada en el reconocimiento de glicanos que se une de forma específica a residuos de  $\alpha$ -D-manosa/ $\alpha$ -D-glucosa (Varki et al., 2009), con mayor afinidad a las cadenas de oligomanosa (Fig. 5). Para este ensayo se usaron células cultivadas en cajas de 100 mm y transfectadas con 1.5  $\mu$ g del plásmido pcADN3.1+rTRPV1 ó 3  $\mu$ g de pcADN3.1+hTRPV1.

Cuarenta y ocho horas posteriores a la transfección se cosecharon las células con Tripsina EDTA 0.05% (Sigma Adrich), centrifugando a 1500 rpm durante 5 min. El botón obtenido se lavó con TBS 1x. Las células se centrifugaron por última vez y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de buffer de interacción (TBS 1x con Complete 2x). Con el objetivo de generar una relación entre la proteína total (PT) y la proteína en membrana (PM) que se obtendría por la precipitación; se apartó la quinta parte del botón celular resuspendido (100  $\mu$ l) para ser tratada con buffer de lisis 1x (100  $\mu$ l).

Previo al ensayo de precipitación, se incubaron 75  $\mu$ l de perlas de agarosa cubiertas con Concavalina A (AS2004, Vector Laboratories), en buffer de equilibración que contenía cationes divalentes necesarios para la activación de la lectina ( $\text{CaCl}_2$  [5 mM],  $\text{MgCl}_2$  [5 mM]) diluidos en TBS 1x (pH 7.5; NaCl [150 mM]; Tris base [5 mM]). Las perlas se centrifugaron 3 veces a 2000 rpm durante 2 minutos en buffer de equilibración, resuspendiendo por última vez en TBS.



**Figura 6. Ejemplos de glicosilaciones tipo N reconocidas por Concavalina A.** Concavalina A (Conc A), es una lectina de unión específica a residuos de  $\alpha$ -D-manosa/ $\alpha$ -D-glucosa, con fuerte unión a residuos de manosa libres y cadenas de oligomanosa. En el esquema se muestran tres N-glicosilaciones que pueden ser reconocidas por Concavalina A y la fuerza de su unión; aspectos importantes para la precipitación por medio de la lectina. Imagen tomada y editada de Varki, A. et al. 2009.

Posteriormente; por cada botón celular derivado de un cultivo en caja de 100 mm se agregaron 500  $\mu$ l de la suspensión con Concavalina A, incubando la reacción durante una hora, en agitación y sobre una cama de hielo. Posterior a la incubación los complejos formados entre la Concavalina A y los residuos de manosa de las proteínas de superficie celular, fueron colocados en columnas de filtración y centrifugados a 2000 rpm durante 2 minutos. Para el lavado del complejo, las columnas se incubaron sobre cama de hielo durante 5 minutos con 500 $\mu$ l de buffer de lavado por columna (NP 40 al 0.5 % diluido en TBS 1x) el lavado se realizó dos veces y se alternó cada lavado con una centrifugación a 2000 rpm durante 2 min.

Finalmente, se agregaron 250  $\mu$ l del buffer de elución a cada columna ( $\alpha$  – metil glucósido [89 mM]; NP 40 al 0.5%; Complete 1x; NaF [2.5 mM] diluidos en TBS 1x). La elución se colectó por centrifugación a 2000 rpm durante 2 minutos en un tubo eppendorf nuevo. Los extractos obtenidos se corrieron en geles de poliacrilamida al 10%.

#### 5.10. Precipitación con SNA-I:

Para conocer las ramificaciones terminales de las N-glicosilaciones del canal TRPV1 se utilizó la lectina proveniente del sauco negro *Sambucus nigra* (Linneo, C. 1753), esta lectina *Sambucus nigra* aglutinina I (SNA-I) se ha demostrado que precipita proteínas altamente sialiladas, es decir modificadas con el ácido N-acetil-neuramínico (**Shibuya, 1987**).

SNA-I se encuentra acoplada a perlas de agarosa, previo a su uso, las perlas se enjuagaron 3 veces con TBS 1x y centrifugaciones intermedias de 1800-2000 rpm durante 1 minuto, desechando el sobrenadante. Se utilizaron aproximadamente 0.2 mg de lectina (66.6  $\mu$ l) por cada 100  $\mu$ g de proteína total, llevando a 1mL con TBS 1x que contenía inhibidores de proteasas (cOmplete™

ROCHE 1x). La incubación de esta mezcla se llevó a cabo por 1hr en agitación a temperatura ambiente.

Después de la incubación, las mezclas fueron colocadas en columnas de filtración Pierce™ y centrifugadas a 1000 rpm durante un minuto. Se realizaron 3 lavados con TBS 1x a la misma velocidad y se descartó el sobrenadante. Para finalizar, se incubó en la columna con buffer de elución durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. Fue centrifugada y el volumen recuperado se almacenó a -70 °C hasta ser utilizado para PAGE.

#### 5.11. Inmunocitoquímica

Para observar los cambios en la localización del canal TRPV1 se realizaron ensayos de inmunocitoquímica usando anticuerpos para la inmunodetección del canal TRPV1 y calnexina como marcador de retículo endoplásmico. Se utilizó DAPI para la localización del núcleo.

Para adherir las células a la superficie de los cristales, el cultivo celular se realizó en cubreobjetos cubiertos con poli-D-lisina (1mg/ml). Los cubreobjetos deben ser enjuagados con etanol al 75% y flameados antes de ser expuestos a poli-D-lisina. Una vez sumergidos en poli-D-lisina se reservaron a 4°C durante una noche o hasta su uso. Antes de utilizarse para cultivo celular, se descartó el exceso de Poli-D-lisina, los cubreobjetos se enjuagaron 3 veces con agua MilliQ esterilizada y fueron expuestos 15 minutos a luz UV con mechero encendido para esterilizar y secar el exceso de agua.

Después del cultivo celular y de 48 horas pos transfección, se retiró el medio de cultivo y los cubreobjetos fueron enjuagados cuidadosamente con PBS 1x frío para retirar los restos del medio de cultivo. Las células fueron fijadas durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación con paraformaldehído (PFA) 4%

*disuelto en PBS 1x. Posteriormente se enjuagaron nuevamente con PBS 1x frío tres veces.*

*Para permeabilizar las células se agregó a los cubreobjetos una solución de Tritón al 0.2% disuelto en PBS 1x durante 2 minutos a temperatura ambiente en agitación. Después de retirar la solución se enjuagaron tres veces con PBS 1x frío. Para bloquear las células se utilizó una solución de bloqueo (1% de gelatina, 2.5% de suero fetal bovino (SFB) en PBS 1x) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo se enjuagaron los cubreobjetos nuevamente.*

*Para el anticuerpo primario las células se incubaron durante una noche en cámara húmeda a 4°C con la cara del cubreobjetos que contenía las células sobrepuesto en 80 µl del anticuerpo correspondiente (Tabla 6; Anexo I) disuelto en BSA al 3%. Al finalizar la incubación con el anticuerpo primario se enjuagaron los cubreobjetos y se realizó la incubación con el anticuerpo secundario también disuelto en BSA 3%. Esta vez se incubó durante 1hr en cámara húmeda con las mismas condiciones descritas para el anticuerpo primario, con 3 enjuagues con PBS 1x frío al finalizar.*

*Las muestras se visualizaron en la unidad de microscopía del Instituto de Fisiología Celular en el microscopio confocal Zeiss LSM 800. Las longitudes de excitación y emisión utilizadas fueron las establecidas en la Tabla 6; Anexo I. Además, se excitó a 405 nm para DAPI con lectura en su pico de emisión a 460 nm (azul). Las imágenes obtenidas representan un corte intermedio en Z tomado con un objetivo 63x.*

### 5.12. Ensayos de conducta de dolor (tiempo de lamido de la pata).

Se eligieron ratones machos de la cepa C57BL/6J tipo silvestre, con 7-9 semanas de edad. Para esta prueba se utilizó un modelo de dolor agudo por estímulo químico (capsaicina). El test del tiempo de lamido de pata es una prueba comúnmente utilizada para la evaluación del dolor espontáneo. Consiste en medir en un intervalo establecido, el tiempo que el animal lame la palma de su pata previamente inyectada con algún agente químico (Gregory, 2013).

Se escogió la capsaicina como sustancia nociva para provocar el dolor agudo, por ser el principal agonista del canal TRPV1. Para probar la relevancia del ácido N-acetil-neuramínico en la sensibilidad del dolor se utilizó capsaicina [2.8 µg por animal, disuelta en solución salina] como agente nocivo. Ésta concentración ha sido probada previamente y ha reflejado un marcado comportamiento de dolor agudo (Orestes, 2013). A su vez, se optó por la glicosilasa  $\alpha$ -2(3,6,8,9)-neuraminidasa [0.015 unidades por animal] que corta enlaces de residuos de ácido-N-acetil-neuramínico (Neu5Ac) tipo  $\alpha(2\rightarrow3)$ ,  $\alpha(2\rightarrow6)$ ,  $\alpha(2\rightarrow8)$  y  $\alpha(2\rightarrow9)$ , el tipo de ácido N-acetil-neuramínico predominante en células de mamífero.

Los ratones se dividieron en 4 grupos experimentales (Tabla7). Cada animal se colocó para su observación en cajas individuales, con 15 minutos previos a la inyección para su aclimatización en este entorno. La inyección se realizó intra-plantar de la pata delantera, izquierda o derecha. Se utilizó un volumen de 10 µL que contenía la mezcla del compuesto a probar (Tabla7), las mezclas son correspondientes con los grupos experimentales seleccionados. El intervalo acotado para la prueba conductual fueron los 10 minutos seguidos a la inyección para cada animal. Tomando en cuenta solo dicho intervalo, se capturaba el tiempo total de lamido.

**Tabla 7. Mezclas de componentes utilizados en el test de tiempo de lamido.**

Grupo 1: Control Vehículo (n=5)		Grupo 2: Control Neuraminidasa (n=5)	
Etanol (vehículo de capsaicina)	0.14 $\mu$ L	Neuraminidasa	0.03 $\mu$ L
Solución salina	9.86 $\mu$ L	Solución salina	9.97 $\mu$ L
Grupo 3: Estímulo nocivo (n=5)		Grupo 4: Estímulo nocivo+Neuraminidasa (n=6)	
Capsaicina	0.14 $\mu$ L	Capsaicina	0.14 $\mu$ L
Solución salina	9.86 $\mu$ L	Neuraminidasa	0.03 $\mu$ L
		Solución salina	9.83 $\mu$ L

Los animales se dividieron en 4 grupos experimentales. A cada animal se le inyectaron 10  $\mu$ L de la mezcla perteneciente según su grupo.

## 6. RESULTADOS

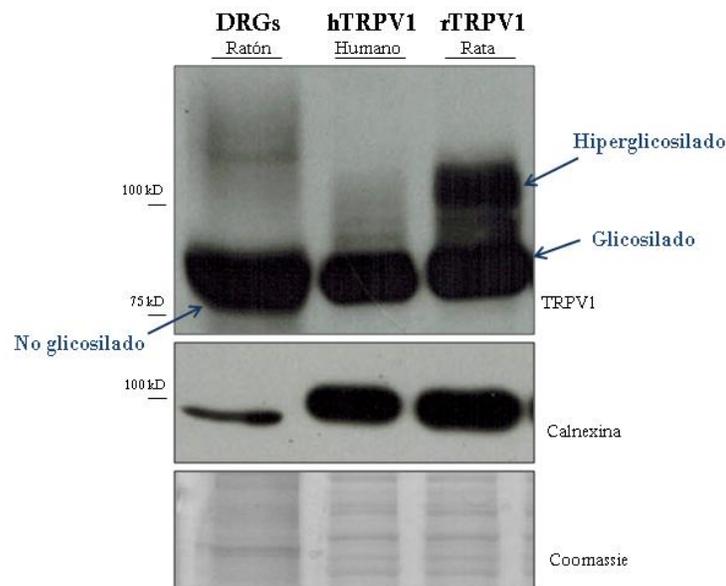
### 6.1. El canal TRPV1 muestra un corrimiento electroforético diferencial entre especies

En la línea celular CHO, se han reportado dos formas del monómero del canal TRPV1, una de ellas sin modificarse con un peso aparente de 96 kD y otra forma glicosilada con peso calculado de 114 kD (Kedei, et al., 2001). Reportes previos sugieren que la forma glicosilada del monómero de TRPV1 se encuentra en diferentes líneas celulares como la HEK293. (Jahnel et al., 2001; Veldhuis et al., 2012) Sin embargo, los reportes existentes sobre la glicosilación del canal TRPV1 en DRG's son controversiales.

En los extractos provenientes de células transfectadas con el canal de rata se detectaron dos bandas de distinto peso molecular bien definidas. La banda inferior corresponde al peso molecular del monómero de TRPV1 (~95kDa) y una banda superior que sobrepasa dicho peso. El patrón de bandeado obtenido corresponde con los reportes previos para el canal de rata (Veldhuis et al., 2012), donde se

propone que dichas bandas corresponden a diferentes formas glicosiladas del canal, de un estado simple a uno complejo o hiperglicosilado (Suplementaria 1) . En el caso de **ratón**, la banda de mayor peso sobrepasa los 100 kD. Lo que sugiere que las bandas con mayor peso conciernen al canal TRPV1 hiperglicosilado. En contraste; la misma proteína de origen **humano** solo presenta una banda nítida, correspondiente con el peso molecular del monómero de TRPV1 (Fig 7 y suplementaria 2).

La banda identificada en rTRVP1 es cercana a los 100 kDa superior a su forma de monómero. Dicha banda corresponde al canal en su estado hiperglicosilado. En otras pruebas con menor tiempo de exposición (suplementaria 2) se puede distinguir que la banda inferior presente en humano y rata se compone de dos bandas claramente separadas que se sugiere corresponden con el peso del monómero sin glicosilar y el monómero glicosilado sin ramificaciones. Considerando estos resultados fue pertinente investigar y caracterizar a fondo la glicosilación del canal TRPV1.



**Figura 7. El canal TRPV1 presenta un corrimiento electroforético diferencial entre especies.** WB para la inmunodetección del canal TRPV1 y calnexina (control de carga). Se muestran los extractos de proteína total de ganglios de raíz dorsal (DRGs) obtenidos de ratones de la cepa C57BL/6J. El gel teñido con Coomassie muestra el bandeado de las proteínas totales de los extractos de DRG y HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1 de rata y humano. Se observa el corrimiento de la proteína alrededor de los 95 kDa en las tres muestras, y una banda por encima de los 100 kDa en las muestras de ratón y rata, que corresponderían al canal glicosilado y ramificado.

De acuerdo a lo previamente reportado por el grupo de **Kedei, et al., 2001** y **Veldhuis, et al. 2012**; los diferentes pesos moleculares del canal TRPV1 identificados por WB en este trabajo pueden atribuirse a las formas no glicosiladas, glicosiladas e hiperglicosiladas (ramificadas) del canal. Nuestros resultados sugieren que la glicosilación del canal es diferente de acuerdo con la especie de origen del canal.

6.2. La secuencia de glicosilación del canal TRPV1 difiere entre especies

Según **Schwarz F. 2015** y otros autores, toda secuencia Asn- X -Ser/Thr es candidato a glicosilarse formando el enlace covalente en la primer Asparagina, aceptando una N-glicosilación. Para investigar las características que propiciaban una eficiencia o grado de glicosilación diferente entre las especies, se realizó un análisis de las secuencias polipeptídicas del canal TRPV1 tanto de rata como ratón y humano (Fig.8).



**Figura 8. Diferencias en el sitio de glicosilación del canal TRPV1.** En la figura se muestra el alineamiento de TRPV1 (humano, ratón y rata). Con énfasis en la secuencia de glicosilación del aminoácido 604 al 606. Solo el humano difiere en el sitio 605 con un Aspartato (D), en contraste a ratón y rata, ambos con Asparagina (N) en el sitio 605. Dicho sitio corresponde con el aminoácido “X” de la secuencia consenso de glicosilación (en negritas).

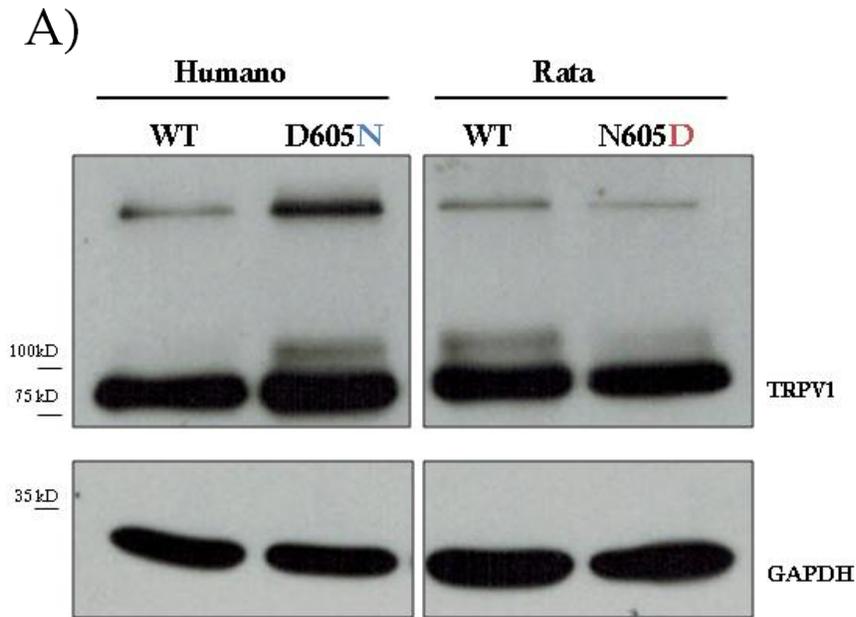
Las tres especies contienen en su cadena polipeptídica la secuencia consenso de glicosilación que comprende a los aminoácidos 604-606 de acuerdo con Rosenbaum, 2002 y Veldhuis, 2012. Dentro de la secuencia de glicosilación se

encontró que los aminoácidos Asn 604 y Ser 606 están conservados en las tres especies analizadas. Sin embargo, el aminoácido 605 difiere únicamente para el caso del humano. Siendo Asparagina (Asn)-605 para rata y ratón, mientras que en humano se encuentra Aspartato (Asp)-605. Esta diferencia corresponde con el residuo "X" de la secuencia consenso de glicosilación **N-X-S/T**. Debido a esta observación, se realizaron una serie de experimentos con mutagénesis sitio dirigida para comprobar la relevancia de intercambiar el aminoácido del sitio X entre humano y rata.

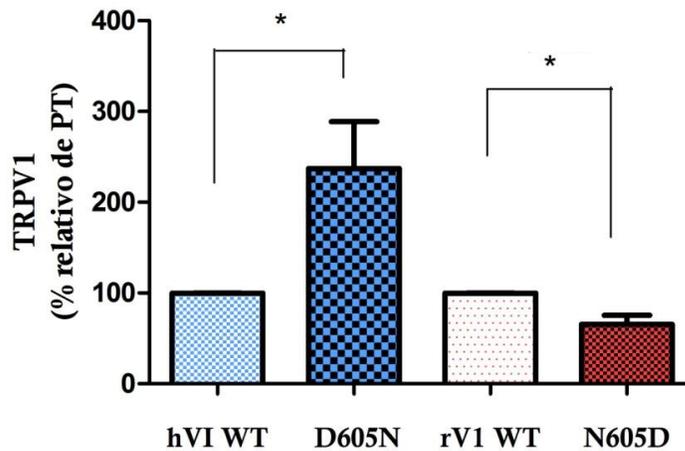
### 6.3. El aminoácido "X" es determinante para la glicosilación en el canal TRPV1

Asumiendo que el aminoácido X es determinante para el grado de glicosilación de una proteína y con el objetivo de determinar la relevancia del contexto genético para la glicosilación de TRPV1 entre especies (rata y humano), se realizaron dos construcciones con mutaciones puntuales en el aminoácido 605.

En el caso de TRPV1 humano se cambió el Aspartato (D) 605 por Asparagina (N), la mutante fue identificada como **hTRPV1 D605N** y por el contrario en TRPV1 de rata se mutó la Asparagina (N) 605 por Aspartato (D), esta vez la mutante identificada como **rTRPV1 N605D** (Tabla 3, ANEXO I). Observando que el cambio en este aminoácido revierte de forma significativa el perfil de glicosilación observado previamente en cada especie (Fig. 9).

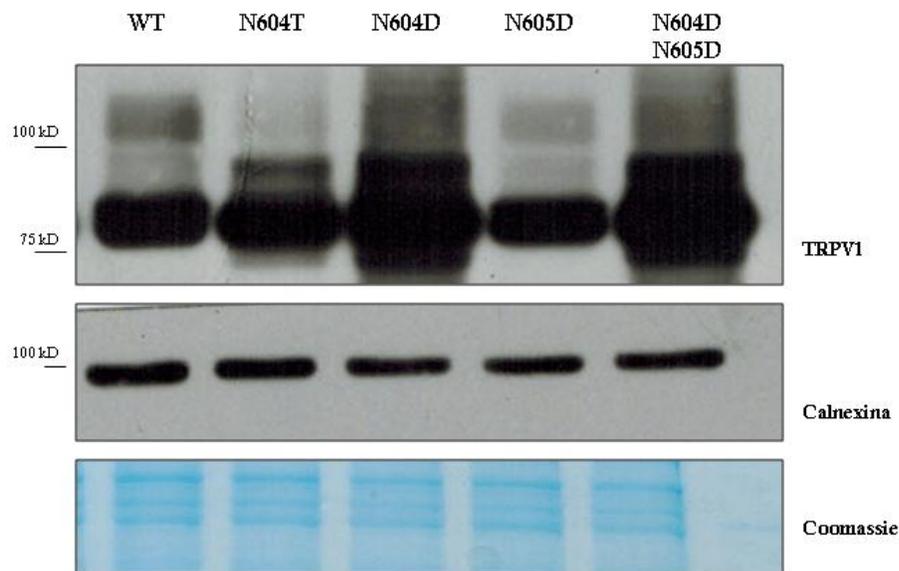


B) **Eficiencia de glicosilación**



**Figura. 9. Eficiencia de glicosilación en mutantes del canal TRPV1 en el aminoácido 605.** A) WB para la detección del canal TRPV1 y GAPDH como control de carga, los cambios en la banda correspondiente al canal glicosilado e hiperglicosilado por efecto de mutaciones en el sitio consenso de glicosilación en la secuencia de hTRPV1 y rTRPV1. B) La gráfica muestra los cambios en la señal de proteína total de la mutante hTRPV1 D605N (media = 237%, +/- 51.65 ES) respecto a su control hTRPV1 WT (hVI WT) y la mutante rTRPV1 N605D (rVI N605D) con disminución del 35.58% +/- 9.77 ES y su control (rVI WT). Se realizó una prueba t-student para la comparación pareada entre grupos y se obtuvo una diferencia significativa  $*(p \leq 0.0383)$  en ambas mutaciones.

Para comprobar la glicosilación anteriormente reportada (Rosenbaum, 2002; Veldhuis, 2012), se realizó una mutación puntual en el sitio 604 del canal TRPV1 de rata, reemplazando la Asparagina 604 por un Aspartato, residuo de carga negativa y otra mutante donde se reemplazó por Treonina residuo de carga neutra. Las mutantes fueron designadas **N604D** y **N604T** respectivamente. Observándose que la banda correspondiente a la forma glicosilada y la forma hiperglicosilada del canal TRPV1 desaparece (Fig. 10).

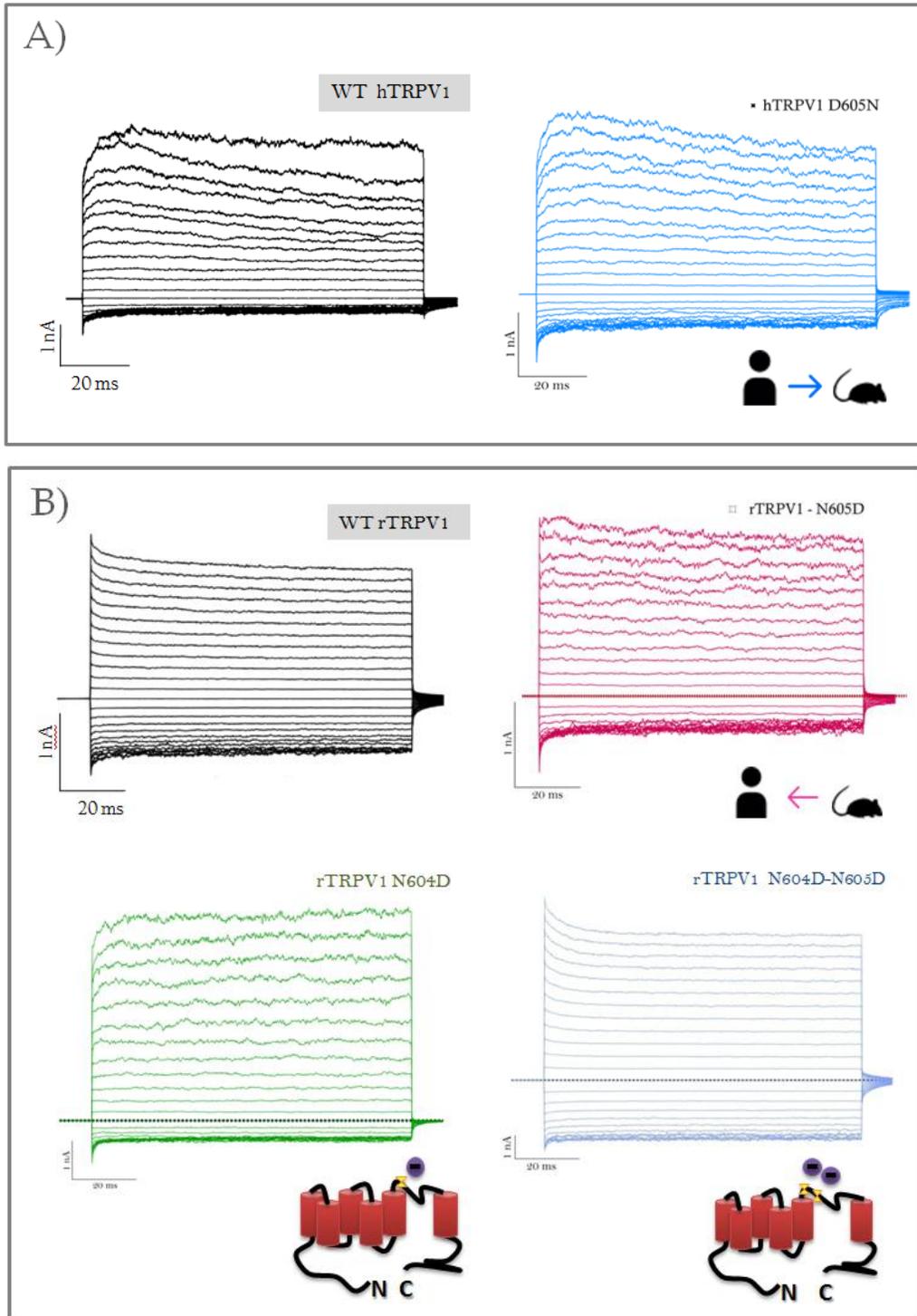


**Figura 10. La mutación en Asparagina 605 modifica la eficiencia de glicosilación del canal TRPV1 de rata.** WB de extractos de proteína total de células transfectadas con las construcciones mutantes del canal rTRPV1. La densidad de glicosilación en la forma WT de rTRPV1 se ve modificada cuando se cambia el aminoácido X del sitio de glicosilación consenso (N605D). Al mutar el aminoácido N604T/D se abate las formas pesadas de TRPV1 glicosilado. La doble mutación en N604D y N605D modifica las bandas más pesadas sin provocar su desaparición, en cambio se observa un enriquecimiento en las formas intermedias de glicosilación. La inmunodetección de calnexina y la tinción del gel Coomassie se realizó como control de carga.

#### 6.4. Las proteínas TRPV1 mutantes son funcionales

Con el fin de comprobar que los canales mutantes conservan su funcionalidad, se realizaron experimentos electrofisiológicos en la configuración de parche escindido y modalidad inside-out. Todas las mutantes fueron registradas en solución de

registro (trazos no mostrados) y posteriormente expuestas a capsaicina  $4\mu\text{M}$  disuelta en solución de registro como activador del canal donde sus corrientes fueron monitoreadas (Fig. 11).



**Figura 11. Familia de Corrientes obtenidas de la activación con capsaicina de las construcciones del canal TRPV1 mutantes.** Se muestran trazos representativos de las corrientes obtenidas al activar el canal con Capsaicina 4 $\mu$ M. A) Trazos representativos del canal de humano hTRPV1 wt en negro y la construcción mutante del aminoácido X (hTRPV1-D605N) en azul. B) Trazos representativos del canal de rata rTRPV1 wt en negro; la construcción mutante del aminoácido X (rTRPV1-N605D) en rosa; la construcción rTRPV1-N604D en verde y la doble mutante rTRPV1-N604D N605D en azul. Se muestran esquemas representativos del monómero del canal TRPV1 mutado, cada círculo morado representa la carga negativa adquirida por cada aminoácido mutado hacia aspartato.

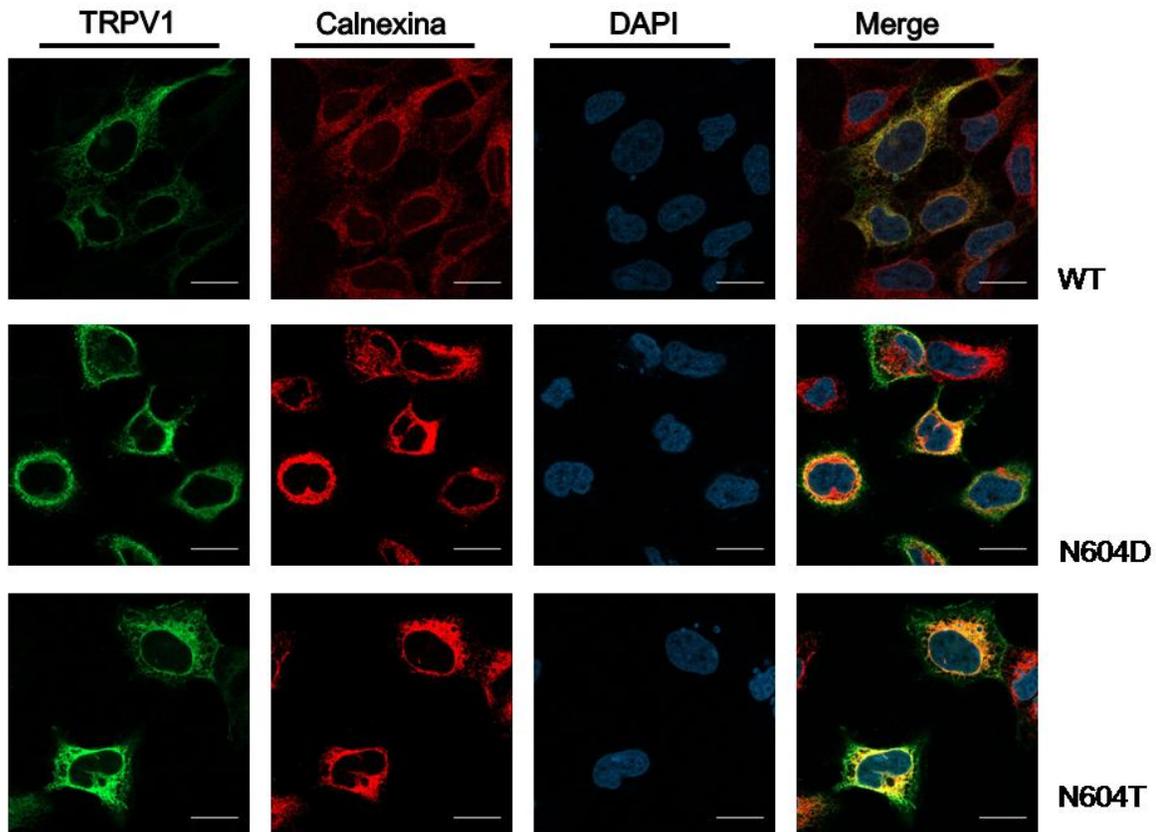
Todas las mutantes probaron ser funcionales al activarse frente a capsaicina, agonista principal del canal. Sin embargo, los trazos de los canales mutantes presentan diferencias importantes a voltajes negativos que podrían comprometer la dependencia de voltaje del canal silvestre.

#### 6.5. Localización subcelular de mutantes

Para evaluar posibles cambios en la localización del canal rTRPV1 debido a las modificaciones en su secuencia de glicosilación, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica. Las inmunodetecciones se realizaron para el canal TRPV1 y la proteína calnexina como marcador de retículo endoplásmico (RE). Además, se utilizó un medio de montaje con DAPI para localizar el núcleo.

Los resultados obtenidos demuestran una señal de TRPV1 (en verde) más intensa en las mutantes correspondientes al aminoácido 604 (N604D y N604T) (Fig. 12). Estos resultados concuerdan con lo observado por WB donde la concentración de estas mutantes es mayor respecto a su contraparte silvestre. Además, N604D y N604T tienen una mayor colocalización con calnexina (en rojo), aunque se sigue observando señal en verde lejos del retículo endoplásmico (RE), lo cual sugiere la presencia de canales TRPV1 en la membrana plasmática a pesar de la alta colocalización con calnexina. El aumento en la señal de TRPV1 en estas versiones mutantes del canal es un indicador de que la mutación en el aminoácido

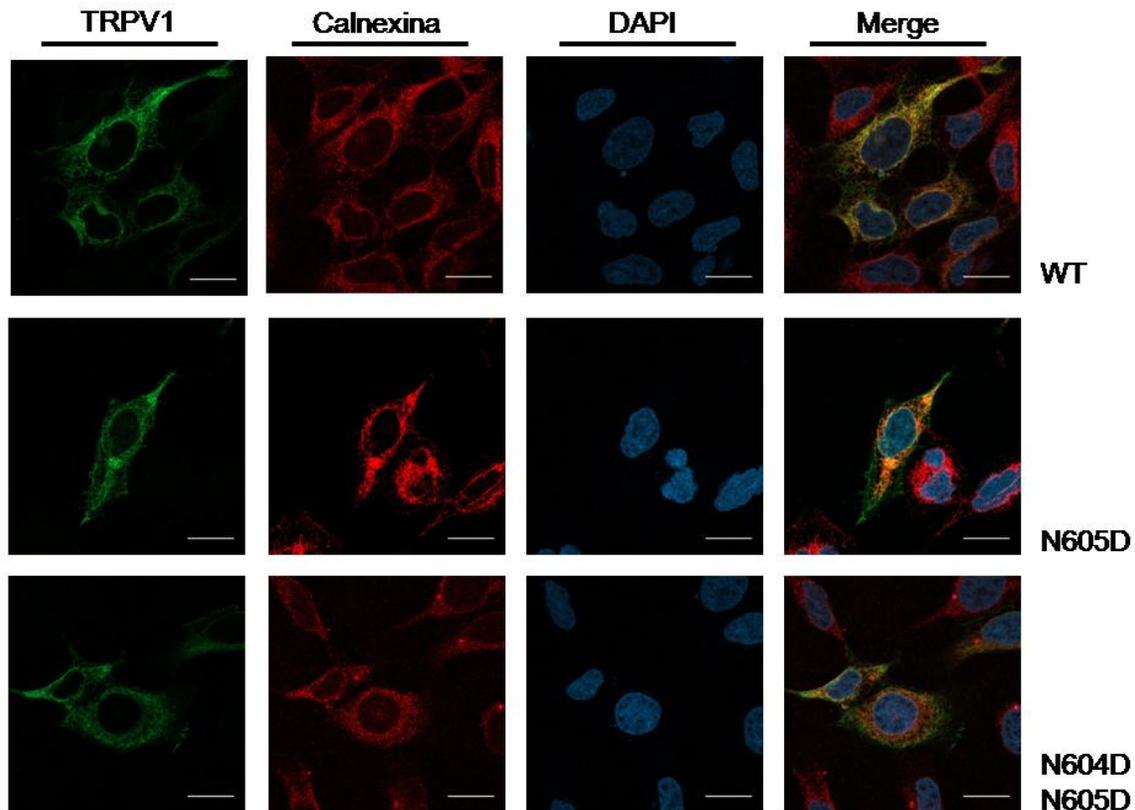
604 podría estar promoviendo la sobreexpresión del canal TRPV1. Sin duda, se necesitan más estudios en esta área para corroborar dicha hipótesis.



**Figura 12 Localización subcelular de TRPV1 WT y mutantes.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal, de células HEK293 transfectadas para la proteína rTRPV1 silvestre (wt) y mutantes (rTRPV1 N604D, rTRPV1 N604T). Las imágenes representan un corte intermedio en Z en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 y fueron procesadas en Fiji de Image J, la barra de calibración (en blanco) señala la escala en cada corte (20 $\mu$ m). Se muestra la señal en verde del canal TRPV1, calnexina proteína de retículo (rojo) y DAPI (azul) como indicador del núcleo. Las construcciones mutantes del canal TRPV1 presentan una mayor colocalización con calnexina y una mayor expresión del canal con respecto al canal TRPV1 silvestre.

Respecto a la mutación rTRPV1 N605D (Fig. 13), también se obtuvo mayor señal del canal TRPV1 (en verde) con respecto al canal silvestre. Tomando en cuenta la señal de calnexina se encuentra una alta colocalización entre ambas señales, sugiriendo que hay una considerable cantidad de proteína que permanece en RE. Contrario a los resultados que se obtuvieron por la doble mutación de rTRPV1

N604D-N605D, donde se observa que el patrón en la señal de ambas proteínas calnexina y TRPV1 se conserva de forma homogénea en RE, mostrando pocas áreas de colocalización de forma similar al comportamiento del canal silvestre.

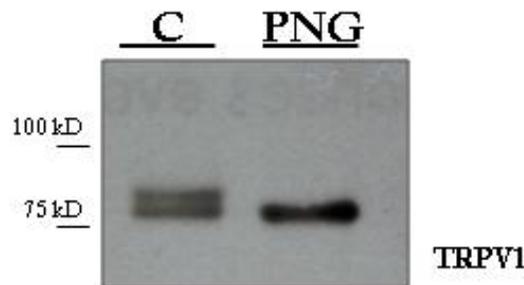


**Figura 13. Localización subcelular de rTRPV1 silvestre y mutantes.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal, de células HEK293 transfectadas para la proteína rTRPV1 silvestre (wt) y mutantes (rTRPV1 N605D, rTRPV1 N604D-N605D). Las imágenes representan un corte intermedio en Z en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 y fueron procesadas en Fiji de Image J, la barra de calibración (en blanco) señala la escala en cada corte (20µm). Se muestra la señal del canal TRPV1 (verde), calnexina proteína de retículo (rojo) y DAPI (azul) como indicador del núcleo.

#### 6.6. El canal TRPV1 se encuentra N-glicosilado

Reportes previos han demostrado que el canal TRPV1 de rata se N-glicosila (Rosenbaum, 2002; Veldihus et al. 2012), para verificar la N-glicosilación del canal, se realizaron incubaciones de los extractos proteínicos con PNGasa F

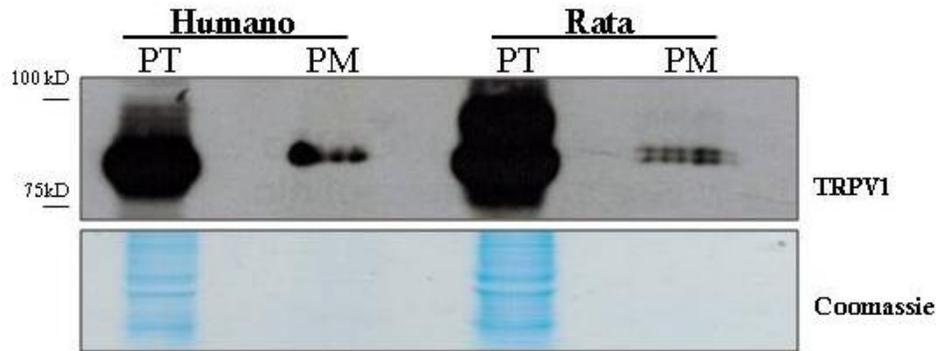
(enzima que corta el enlace de unión entre el carbohidrato inicial de la N-glicosilación con el aminoácido asparagina). Se observó una disminución de la banda correspondiente a la glicosilación en extractos de rTRPV1 tratado y un enriquecimiento en la banda inferior respecto al control (Fig. 14). Lo cual indica que la banda superior corresponde al canal N-glicosilado (aunque no necesariamente ramificado) y la banda de menor peso es el canal TRPV1 sin glicosilar.



**Figura 14. N-glicosilación del canal rTRPV1.** WB del canal TRPV1. El tratamiento (PNGasa F, 48hrs) en extracto células HEK293 transfectadas con rTRPV1 disminuye la densidad de la banda correspondiente a TRPV1 glicosilado respecto al control.

#### 6.7. TRPV1 de humano y rata contienen residuos tipo Manosa

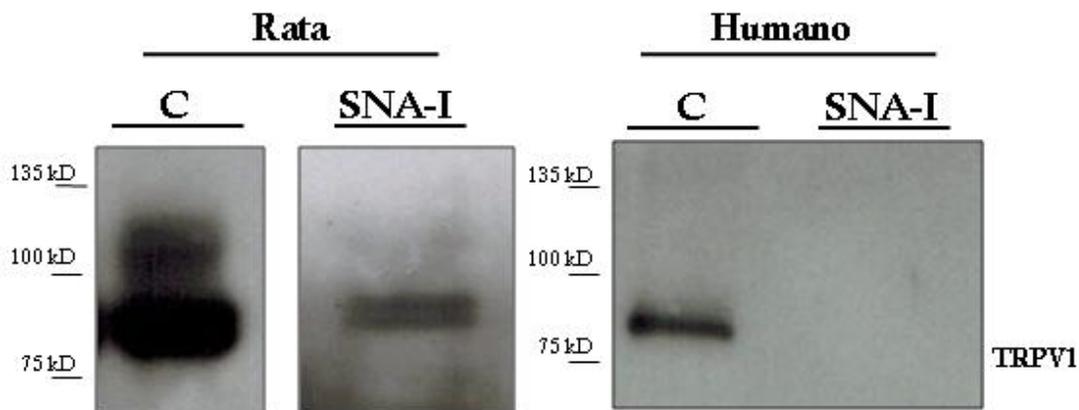
Una vez confirmada la N-glicosilación del canal rTRPV1, se exploró si la glicosilación del canal TRPV1 contiene carbohidratos tipo manosa, esto se realizó mediante el uso de Concavalina A, la cual es una lectina ampliamente utilizada para la identificación de enlaces  $\alpha$ -manosa/ $\alpha$ -glucosa. Además, esta lectina es específica de la N-glicosilación, ya que no se conoce su unión a O-glicoproteínas de origen animal. En la Figura 15 se observa el WB para detectar el canal TRPV1 en extractos de proteína total (PT) y la proteína obtenida por precipitación con concavalina A acoplada a perlas de agarosa, debido a que esta precipitación se realizó mediante la incubación de la Concavalina A con células completas, el canal TRPV1 precipitado representa la fracción de canal presente en membrana plasmática que contienen manosas en su N-glicosilación. No se observaron diferencias entre el canal TRPV1 de origen de rata y el humano. Indicando que ambos canales contienen manosa.



**Figura 15. El sitio N-glicosilado del canal TRPV1 contiene residuos de manosa.** Expresión del canal TRPV1 en extractos de proteína total (PT) y proteínas de membrana plasmática (PM) obtenidas por la precipitación con Concanavalina A. El precipitado en PM demuestra la presencia de manosas en la N-glicosilación del cana rTRPV1 y hTRPV1. La tinción del gel con coomasie se utilizó como control de carga.

#### 6.8. Carbohidratos complejos en el canal TRPV1

Para determinar si el canal TRPV1 se ramifica con carbohidratos del tipo complejo como el ácido N-acetil-neuramínico, se realizaron ensayos con proteína total extraída de células HEK293 transfectadas con rTRPV1 y hTRPV1, los cuales se incubaron con la lectina *Sambucus nigra* aglutinina I (SNA-I) acoplada a perlas de agarosa, una lectina de alta afinidad por residuos de ácido N-acetil-neuramínico. La proteína precipitada por la incubación con la lectina SNA-1 acoplada a perlas de agarosa fueron analizadas por WB para la detección del canal TRPV1 (Fig. 16). Se encontró que el canal de origen de rata fue precipitado por la incubación con la SNA-I, contrario al canal TRPV1 de humano donde nunca se encontró precipitado del canal utilizando SNA-I.



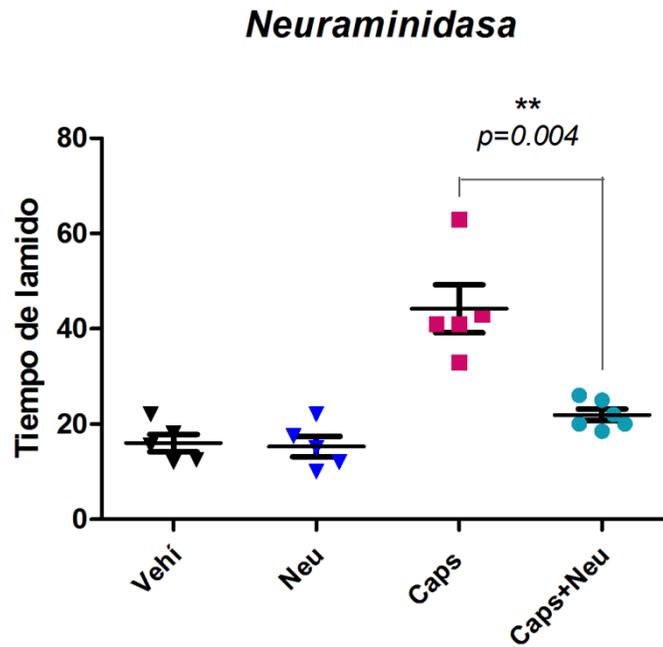
**Figura 16. El canal TRPV1 de rata contiene ácido N-acetil-neuramínico.** Inmunodetección del canal TRPV1 de origen de rata (izquierda) y humano (derecha) en extractos de proteína total (C) y en proteína precipitada con la lectina SNA-I. Se observa que el canal de origen de rata pudo ser precipitado a diferencia del canal de humano no se logró observar proteína precipitada.

#### 6.9. La nocicepción mediada por el canal TRPV1 es atenuada al modificar su glicosilación

El papel de los carbohidratos complejos en el sistema nervioso central, ha sido reportado previamente (Zhang et al., 2003; Orestes et al., 2013; Scott y Panin 2014). Para saber si el ácido N-acetil-neuramínico presente en el canal TRPV1 tienen un efecto sobre la conducta de dolor mediada por su activación, se realizó una prueba conductual de dolor (tiempo de lamido de la pata) en ratones, después de la inyección con el agonista principal del canal (capsaicina) o la co-inyección de capsaicina y neuraminidasa (enzima que hidroliza el enlace entre la galactosa y el ácido N-acetil-neuramínico).

Cuando se inyectó capsaicina en la pata del animal se observó una clara respuesta de dolor, reflejado por una conducta de lamido de la pata inyectada, registrándose en tiempo acumulado de la conducta mencionada (44.2 seg +/- 5.004 seg). En contraste, al co-inyectar capsaicina con neuraminidasa, se obtuvo una disminución del tiempo de lamido cercana al 50% (21.92 seg +/- 1.228 seg); respuesta muy similar a los niveles basales obtenidos por la inyección con solución salina (control negativo) (Fig. 17).

Los resultados sugieren que eliminar el ácido N-acetil-neuramínico del canal, modifica la detección del estímulo nocivo y el comportamiento de dolor mediado por la activación de TRPV1.



**Figura 17 Conducta de dolor en animales tratados con neuraminidasa.** Se muestra el tiempo de lamido de la pata de todos los animales utilizados en el ensayo, representando cada uno con un punto. Se distinguen 4 grupos de acuerdo con sus condiciones de tratamiento: animales inyectados con Solución Salina, el vehículo de la neuraminidasa (Vehí); animales inyectados con neuraminidasa más su vehículo (Neu); animales tratados con 2.8  $\mu$ g de capsaicina (Caps) que mostraron la mayor señal de dolor media = 44.2 seg.  $\pm$  5.004 seg. y finalmente el grupo problema co-inyectado con capsaicina y Neuraminidasa [0.015 u por animal] (Caps+Neu) media = 21.92 seg  $\pm$  1.228 seg. Se utilizaron 5 animales para cada grupo y se realizó una prueba t-student para la comparación pareada entre grupo, se obtuvo una diferencia significativa ( $p \leq 0.004$ ) entre el grupo Caps+Neu y Caps.

## 7. DISCUSIÓN

*TRPV1 es una proteína de 838 aminoácidos con un peso estimado de 92-95 kDa en su forma de monómero y de 190-220 kDa cuando se encuentra en dímero. Para ser funcional el canal TRPV1 nativo se encuentra formando tetrámeros (Kedei, et al. 2001). El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar los perfiles de glicosilación del canal TRPV1 de origen humano y de rata. Para ello se analizó en un primer acercamiento, el perfil de corrimiento electroforético de la proteína en geles de poliacrilamida (con SDS). Se utilizaron extractos de proteína total de diferentes especies (rata, ratón y humano) y se encontró por inmunodetección en fase sólida que en el sistema celular utilizado existen pesos intermedios entre los descritos para el canal TRPV1 en su forma de monómero y dímero.*

*Hay reportes donde se demuestra que el canal rTRPV1 expresado en las líneas HEK293, F11, CHO y ovocitos de Xenopus se encuentra N glicosilado (Kedei et al., 2001; Veldhuis et al., 2012). Sin embargo, los reportes sobre la proteína TRPV1 en su contexto nativo (neuronas DRG) son controversiales. Kedei y colaboradores utilizaron la purificación de extractos de proteína de membranas celulares derivadas de DRG en rata y por WB determinaron que el canal no se encontraba glicosilado. Contrastando lo anterior, en 2012 se probó que la N-glicosilasa (PNGasaF) tiene efectos en el corrimiento electroforético de la proteína rTRPV1, disminuyendo su peso molecular en extractos proteínicos de TG y DRG de rata tratados con la enzima (Veldhuis et al., 2012).*

*Sumado a lo anterior, en el presente trabajo se encontró que las bandas observadas en extractos proteínicos de DRG de ratón así como el canal rTRPV1 y hTRPV1 transfectados en la línea HEK293 muestran pesos mayores al peso establecido para el monómero y menores al peso correspondiente al dímero. Lo anterior puede atribuirse a que los canales de diferente origen presentan diferencias en el grado de glicosilación y ramificación en la glicosilación. De esta*

forma se probó la glicosilación del canal en tres contextos diferentes: por transfección heteróloga del canal rTRPV1 en la línea HEK293, transfección homóloga de hTRPV1 en la línea HEK293 y en extractos de DRG en ratón, un contexto nativo.

Es importante señalar que las condiciones y perfiles descritos retoman tres especies (rata, ratón y humano). Dado que en los tres perfiles se encontraron diferencias en cuanto a las densidades de las bandas observadas y el peso de las mismas, se recurrió a analizar la secuencia polipeptídica de estas especies (Fig.8) en el sitio de glicosilación.

La glicosilación de tipo N se efectúa en residuos de Asparagina dentro del contexto Asn-X-Thr/Ser donde X representa cualquier aminoácido excepto Prolina (**Ferris, 2014**). Como resultado del análisis *in silico* se encontró que en la secuencia de la proteína TRPV1 en roedores se presenta una Asparagina en el aminoácido designado como X, a diferencia de la secuencia de humano donde cambia por un Aspartato.

Existe evidencia la cual afirma que el aminoácido X en realidad es un determinante para la eficiencia de glicosilación en una secuencia Asn-X-Thr/Ser (**Shakin-Eshleman et al., 1996**) y las diferencias entre aspartato y asparagina incrementan cuando el tercer residuo es serina (**Kasturi et al., 1997**), tal como sucede en el caso de TRPV1. De acuerdo con reportes anteriores se localizó la secuencia consenso de glicosilación de la proteína TRPV1 entre los aminoácidos 604-606 (**Rosenbaum et al., 2002; Veldhuis et al., 2012**). Con Asp/Asn en el aminoácido 605 según se trate de hTRPV1 o rTRPV1 respectivamente.

Asumiendo la importancia del aminoácido X, se realizaron dos primeras mutaciones puntuales intercambiando únicamente dicho aminoácido entre humano y rata (Fig. 9). En ambas construcciones logramos revertir de forma significativa el perfil de bandas obtenido por WB correspondiente a la proteína TRPV1, en contraste con su forma silvestre. Los resultados que se obtuvieron en

*este trabajo demuestran que en la secuencia de glicosilación de la proteína TRPV1, el aminoácido X es definitivamente importante para la eficiencia de su glicosilación. A pesar de ser distintos en un solo aminoácido y con base en el impacto que el cambio ocasionó se señala que el aminoácido X es un residuo importante que difiere entre especies. Cuya diferencia pudo ser fijada como producto de la evolución y puede ser una pauta para monitorear la evolución de la sensación del dolor mediado por TRPV1 en estas especies.*

*Las mutantes obtenidas para el aminoácido 604 (rTRPV1 N604D y rTRPV1 N604D-N605D), comprobaron que las bandas más pesadas encontradas por WB corresponden con la glicosilación del canal TRPV1. Al mutar el sitio para la glicosilación (604) (Rosenbaum et al., 2002; Veldhuis et al., 2012), se observa la disminución en dichas bandas respecto al canal silvestre.*

*De forma relevante para el estudio de los canales, se ha reportado que la N-glicosilación tiene efectos sobre su funcionalidad (Scott y Panin, 2014). Específicamente sobre canales de la familia TRP, el estado de la N-glicosilación afecta la actividad de los canales TRPC3 y TRPC6 (Dietrich et al., 2003) y en TRPV1 se ha propuesto a esta glicosilación como necesaria para la desensibilización del canal y la dilatación del poro (Veldhuis et al., 2012). Los experimentos electrofisiológicos de patch-clamp realizados para determinar la funcionalidad de las mutantes demostraron que ninguna de las mutaciones realizadas sobre la secuencia de glicosilación del canal inhibió su activación por capsaicina (Fig. 11). Sin embargo, no se pueden descartar cambios en las densidades de corrientes de cada una de las mutantes o más aún cambios en la cinética de activación de los canales mutantes o en la dilatación del poro, aspectos importantes en la caracterización del comportamiento del canal que no fueron evaluados en este estudio y representan preguntas abiertas para su mayor profundización.*

*Se ha demostrado que las modificaciones pos-traduccionales pueden alterar las propiedades de las proteínas que las cargan. En especial, la N-glicosilación tiene*

un efecto en el tráfico de algunos canales a la membrana (ASIC y  $K_{2P}$ ; por mencionar algunos) (Kadurín et al., 2008; Mant et al., 2013), y se ha visto su efecto en miembros de la familia TRP como los canales TRPV5 y TRPM4, donde la presencia de esta modificación promueve la estabilidad de la proteína en membrana (Cohen, 2006; Chang et al., 2005; Woo et al., 2013)

Los resultados obtenidos por inmunocitoquímica en este trabajo, reflejan una proteína distribuida en la célula de forma homogénea para el canal TRPV1 silvestre (Fig. 12 y 13). De forma relevante se encontró que las mutaciones que abatían por completo la glicosilación (rTRPV1 N604D y rTRPV1 N604T) presentan de forma general, mayor señal de TRPV1 (Fig. 12) aunque con una distribución menor en las áreas cercanas a la periferia celular y un aumento de señal en el retículo endoplásmico (RE), esto reflejado por su alta colocación con calnexina, una chaperona constitutiva de este compartimento que está involucrada en el plegamiento de proteínas (Dalavilla et al., 2016). Lo anterior sugiere que la glicosilación del canal TRPV1 puede tener un papel importante en determinar la cantidad de proteína que sale del RE y se transporta a membrana.

La glicosilación tipo N y O en una proteína se sabe que sirven de guía y promueven mecanismos diferentes para el correcto plegamiento de glicoproteínas. El primero de ellos (dependiente de N-glicosilación) se encuentra conservada hasta en eucariontes complejos como el humano (Xu y Ng, 2015). Existe evidencia donde se demuestra que al eliminar los sitios de glicosilación de una glicoproteína se reduce su correcto plegamiento y por otra parte se promueve su retención y degradación en el retículo endoplásmico (De Virgilio et al., 1999; Shental-Bechor y Levy, 2009; Xu y Ng, 2015).

Los resultados obtenidos en este ensayo para el canal TRPV1 concuerdan entonces con lo reportado para otras proteínas (Helenius y Aebi, 2004) y además proponen un nuevo papel de la glicosilación en esta proteína, relevante para la localización celular del canal TRPV1. Tomando en consideración lo

anterior, se podría explicar que en los resultados de las mutantes N604 del canal TRPV1 por inmunocitoquímica se observe una alta acumulación de TRPV1 en retículo.

Asociado a lo anterior, se ha relacionado la presencia de una glicosilación tipo N con la degradación y vida media de las proteínas, reportando resultados contradictorios y dependientes de la proteína en cuestión. Por ejemplo, existen estudios utilizando isoformas de Inmunoglobulinas G (IgG), una glicoproteína abundante en suero, se encontró que las isoformas con N-acetil-neuramínico en sus terminales glicosiladas son más sensibles a la digestión in vitro por proteasas. **(Raju y Scallon, 2007)** De la misma forma, eliminar por mutagénesis el sitio de glicosilación de la proteína Interferón (IFN)- $\alpha$  aumenta la vida media in vivo de esta proteína **(Jia H. et al. 2016)**. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que estos datos se enfocan en proteínas de secreción y el canal TRPV1 no pertenece a este grupo de proteínas por lo que se sugieren hacer ensayos in vitro para asegurar o descartar una correlación entre la N-glicosilación del canal y la vida media de la proteína.

De forma similar a los resultados vistos en las mutantes rTRPV1 N604D y rTRPV1 N604T, se encuentra el comportamiento de la mutante rTRPV1 N605D donde se observa una sobre expresión y acumulación en retículo endoplásmico, probablemente por la tendencia de esta mutante en disminuir su eficiencia de glicosilación. Por último, rTRPV1 N604D-N605D (Fig.13), es una mutante que conserva dos aspartatos de carga negativa en el sitio de glicosilación. Y regresando al ejemplo anterior, los efectos de la N-glicosilación en la actividad de proteasas son considerados contradictorios, ya que otros estudios proponen que las cargas negativas del ácido N-acetil-neuramínico y otros carbohidratos complejos pueden alterar el reconocimiento del sustrato, la afinidad y desestabilizan la interacción de enzimas proteolíticas con su sitio de reconocimiento en la proteína **(Chung et al., 2016; Goettig, 2016)**. Se propone que la doble mutación semeja la actividad que tendría el ácido N-acetil-

neuramínico sobre las enzimas, regresando de esta forma al fenotipo visto en la proteína WT.

Por medio de diferentes lectinas y glicosilasas se logró identificar uno a uno los componentes de la glicosilación tanto del canal de origen humano como de rata. Se confirmó la N-glicosilación del canal rTRPV1 por incubación con la enzima PNGasa F (Fig.14), la cual ya había sido reportada previamente por el grupo de **Veldhius en 2012**; también se encontró que ambos canales (rTRPV1 y hTRPV1) contienen manosas por su precipitación con la lectina Concanavalina A (Fig. 15). Además, se estableció una importante diferencia al precipitar ambos canales con la lectina SNA-I (Fig.16), observándose que la proteína rTRPV1 tuvo afinidad por esta lectina, mientras que la proteína hTRPV1 no tuvo afinidad, indicando que el rTRPV1 presenta en su perfil de glicosilación un carbohidrato del tipo complejo como lo es el ácido N-acetil-neuramínico.

Estos resultados también sugieren que la presencia del ácido N-acetil-neuramínico en el canal TRPV1 de origen humano es mínima o nula. De acuerdo con las posibles estructuras de N-glicosilación (Fig.2) se propone que la N-glicosilación de humano pertenezca al grupo de Oligomanosa o Híbrida con baja presencia de ácido N-acetil-neuramínico.

La relevancia del ácido N-acetil-neuramínico, al ser un carbohidrato cargado negativamente tiene un gran impacto en la funcionalidad de los canales iónicos (**Ednie et al., 2015**). A nivel celular se ha comprobado su importancia para generar descargas espontáneas en células del sistema nervioso (**Zhang et al., 2003**). Por ello se propuso comprobar la importancia del ácido N-acetil-neuramínico presente en la glicosilación de rTRPV1 en una prueba conductual de dolor agudo causado por capsaicina.

Para conocer la relevancia de ácido N-acetil-neuramínico en la conducta de dolor, se utilizó la enzima Neuraminidasa que corta enlaces de residuos de ácido-N-

acetil-neuramínico (Neu5Ac) tipo  $\alpha(2\rightarrow3)$ ,  $\alpha(2\rightarrow6)$ ,  $\alpha(2\rightarrow8)$  y  $\alpha(2\rightarrow9)$ , el tipo de ácido N-acetil-neuramínico predominante en células de mamífero. Los resultados mostraron que el tratamiento disminuye significativamente el comportamiento de dolor, cercano a los niveles obtenidos al inyectar solución salina (Fig.17). Lo anterior no se había descrito con anterioridad, y resulta relevante ya que en la historia de la investigación de este canal, la mayoría de los ensayos se han realizado utilizando la variante Asn-Asn-Ser perteneciente a rata y ratón.

Estos resultados y otros apuntan a que la glicosilación de canales es relevante para la percepción del estímulo doloroso. Al retomar otros estudios que confirman una desregulación general en la glicosilación de proteínas en patologías como el cáncer, donde TRPV1 es un actor principal de la neuropatología descrita en esta enfermedad, se requieren hacer otras aproximaciones a la neuropatología utilizando modelos de dolor crónicos y considerando el estado de glicosilación de los canales.

Como consecuencia de la relevancia clínica del canal, muchos son los esfuerzos que se han realizado en los últimos años para establecer antagonista y nuevos blancos terapéuticos. Sin embargo, aún faltan incógnitas por resolver respecto a su estructura y la de otros canales pertenecientes a la familia TRP. Principalmente los denominados canales termosensibles, por sus cambios estructurales de acuerdo a la temperatura.

Los resultados obtenidos en este trabajo, juntos reafirman la importancia fisiológica de la glicosilación en el canal TRPV1. Resaltan su importancia a nivel celular y relevancia en el sistema nervioso periférico frente a la percepción de estímulos nocivos, además contribuyen a describir las propiedades estructurales del canal.

## 8. CONCLUSIONES

- a) *La glicosilación de la proteína TRPV1 es dependiente de la especie.*
- b) *Las secuencias de glicosilación de la proteína TRPV1 presente en roedores difieren en un solo aminoácido respecto a humano (Asn/Asp 605).*
- c) *El residuo Asn 605 es determinante en la eficiencia de glicosilación de la proteína TRPV1.*
- d) *Los aminoácidos complejos en la glicosilación de rTRPV1 pueden estar involucrados en la estabilidad de la proteína.*
- e) *La proteína TRPV1 de origen de rata (rTRPV1) está N-glicosilada y contiene carbohidratos complejos como en ácido N-acetil-neuramínico.*
- f) *El ácido N-acetil-neuramínico tiene un papel fundamental en el dolor mediado por TRPV1.*

## 9. PERSPECTIVAS

*El presente trabajo constituye solo un acercamiento para entender la glicosilación y sus efectos en la función y vida del canal TRPV1. Dada la relevancia terapéutica del canal por su participación en la vía del dolor, por una parte, es de gran importancia aclarar a fondo las características estructurales de este canal. Por otra parte, las diferencias encontradas entre especies señalan que aún hay particularidades que considerar en el análisis de TRPV1.*

*Dado que el aminoácido intermedio en la secuencia de glicosilación de este canal (X) es importante para su glicosilación y que esta diferencia se mantiene entre roedores y humanos; se debe explorar la posibilidad de analizar las secuencias de glicosilación de otros organismos relevantes para la investigación de este canal y corroborar la actividad del canal frente a agonistas así como su perfil de glicosilación. Considerando la existencia natural de polimorfismos dentro de cualquier población representativa de la especie, la diferencia en este aminoácido puede tomarse como referencia también en la sensibilidad al dolor dentro de poblaciones humanas. Los resultados mostrados constituyen un referente que abre la puerta a nuevas incógnitas sobre esta característica.*

*Para reafirmar las observaciones obtenidas por WB que muestran las diferencias entre los componentes de la ramificación de humano y rata, se propone realizar un análisis por espectrometría de masas en extractos de proteína de ambas especies y de las construcciones mutantes del canal. Dentro de la espectrometría de masas existen una variedad de ensayos, se propone seguir esta estrategia ya que de forma general estas permiten definir con aguda precisión los componentes de glicoproteínas ya sean aisladas o incluso dentro de una matriz compleja de glicoproteínas **(Morelle y Michalsk, 2007)***

*Como se mencionó anteriormente, este trabajo no abarca ensayos electrofisiológicos que permitan descartar la intervención de la glicosilación en las*

*densidades de corrientes, la cinética de activación o en la dilatación del poro de los canales mutantes. Por lo que se proponen ensayos con mayor tiempo de exposición a su agonista y en diferentes concentraciones. Aunado a lo anterior, si las eliminaciones del sitio de glicosilación impactan de manera positiva o negativa la expresión y el correcto plegamiento de TRPV1 se necesitan hacer más pruebas. Por ejemplo; ensayos de interacción con proteasas sobre las mutantes generadas en este trabajo. O evaluar la distribución del canal en un sistema de expresión endógena donde la maquinaria de transcripción no es forzada por la introducción de plásmidos.*

*Finalmente, resulta relevante analizar el comportamiento y el estado de glicosilación de TRPV1 y otros canales asociados a un proceso de dolor crónico e inflamación.*

## 10. ANEXO I – TABLAS.

Tabla 1. Reactivos y concentraciones utilizadas para el Buffer de lisis 1x.

<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>
<i>Buffer</i> <i>Tris Cl pH 8 [0.25 M]</i> <i>NaCl [0.75 M]</i> <i>Tritón [5%]</i>	<i>Buffer 1x</i> <i>Tris Cl pH 8 [0.05 M]</i> <i>NaCl [0.15 M]</i> <i>Tritón [1%]</i>
<i>cOmplete™</i> <i>ROCHE</i> <i>(inhibidores de proteasas) [25x]</i>	1x
<i>NaF [100 mM]</i>	2.5 mM
<i>H<sub>2</sub>O cbp</i>	1 mL

Tabla 2. Resumen listado de anticuerpos utilizados para WB y condiciones de incubación

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>					
<b>Proteína blanco</b>	<b>Buffer de incubación</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen</b>	<b>Incubación</b>	<b>Marca</b>
<i>TRPV1</i>	<i>PBS-T + leche 3%</i>	<i>1:1000</i>	<i>Cabra (policlonal)</i>	<i>ON* a 4°C</i>	<i>Santa Cruz (P19) Cell</i>
<i>GAPDH</i>	<i>PBS-T</i>	<i>1:5000</i>	<i>Conejo (policlonal)</i>	<i>ON a 4°C</i>	<i>Signaling (14C10)</i>
<i>Calnexina</i>	<i>PBS-T + leche 3%</i>	<i>1:1000</i>	<i>Conejo (policlonal)</i>	<i>ON a 4°C</i>	<i>Santa Cruz (H70)</i>
<i>Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPasa</i>	<i>PBS-T</i>	<i>1:250</i>	<i>Ratón (monoclonal)</i>	<i>48-72h a 4°C</i>	<i>Santa cCruz (H300)</i>

**ANTICUERPOS  
SECUNDARIOS**

Inmunoglobulina blanco	Buffer de incubación	Dilución	Origen	Incubación	Marca
anti- cabra	PBS-T + leche 3%	1:5000		1h Temp. ambiente	Santa Cruz
anti- conejo	PBS-T + leche 3%	1:7500		1h Temp. ambiente	GE Healthcare life Sciences
anti- ratón	PBS-T	1:5000		1h Temp. ambiente	GE Healthcare life Sciences

Todas las incubaciones se realizaron bajo las condiciones establecidas, en agitación constante. \*ON incubación durante toda la noche (over night).

**Tabla 3. Listado completo de mutaciones utilizadas**

Nombre de la construcción de TRPV1	Especie de origen	Secuencia original	Aminoácido mutado
rV1 N604D	Rata	604 <b>N</b> <sub>605</sub> <b>N</b> <sub>606</sub> <b>S</b>	604 <b>D</b> <sub>605</sub> <b>N</b> <sub>606</sub> <b>S</b>
rV1 N604T	Rata	604 <b>N</b> <sub>605</sub> <b>N</b> <sub>606</sub> <b>S</b>	604 <b>T</b> <sub>605</sub> <b>N</b> <sub>606</sub> <b>S</b>
rV1 <b>N</b> 605D	Rata	604 <b>N</b> <sub>605</sub> <b>N</b> <sub>606</sub> <b>S</b>	604 <b>N</b> <sub>605</sub> <b>D</b> <sub>606</sub> <b>S</b>
hV1 <b>D</b> 605N	Humano	604 <b>N</b> <sub>605</sub> <b>D</b> <sub>606</sub> <b>S</b>	604 <b>N</b> <sub>605</sub> <b>N</b> <sub>606</sub> <b>S</b>
rV1 N604D, <b>N</b> 605D	Rata	604 <b>N</b> <sub>605</sub> <b>N</b> <sub>606</sub> <b>S</b>	604 <b>D</b> <sub>605</sub> <b>D</b> <sub>606</sub> <b>S</b>

Tabla 4. Listado de oligonucleótidos utilizados en las construcciones mutantes.

Nombre de la construcción	Oligonucleótidos utilizados
	Directo (D) Complementario (C)
rV1 N604D	D: GAGGATGGGAAGGATAACTCTCTGCCCATGGAGTCCACACCA
	C: TGGTGTGGACTCCATGGGCAGAGAGTTATCCTTCCCATCCTC
rV1 N604T	D: GAGGATGGGAAGACAAATTCTCTGCCTATGGAGTCC
	C: GGACTCCATAGGCAGAGAATTTGTCTTCCCATCCTC
rV1 N605D	D: GATGGGAAGAATGACTCTCTGCCCATGGAGTCCACACCA
	C: TGGTGTGGACTCCATGGGCAGAGAGTCATTCTTCCCATC
hV1 D605N	D: GACGGGAAGAATAACTCCCTCCCGAGCGAGTCCACGTGC
	C: CGACGTGGACTCGCTCGGGAGGGAGTTATTCTTCCCGTC
rV1 N604D-N605D	D: ATTGAGGATGGGAAGGATGACTCTCTGCCAATGGAGTCCACA
	C: TGTGGACTCCATTGGCAGAGAGTCATCCTTCCCATCCTCAAT

Tabla 5. Glicosilasas utilizadas para la caracterización de la glicoproteína TRPV1.

Enzima	Actividad
<p>PNGasa F</p> <p>No.de catálogo P2619</p>	<p>Corta por completo el complejo unido al residuo de Asn y oligosacáridos de manosa largos a menos que el complejo tenga una <math>\alpha(1-3)</math>-fucosa.</p>

		
<p><math>\beta</math>-1,4-Galactosidasa</p> <p>No. de catálogo G0413</p>	<p>Corta enlaces de galactosa tipo <math>\beta</math>(1<math>\rightarrow</math>4) en oligosacáridos complejos no reductores.</p>	
<p><math>\alpha</math>-2(3,6,8,9)-Neuraminidasa</p> <p>No. de catálogo N8271</p>	<p>Enzima que cataliza la hidrólisis de residuos de ácido-neuramínico tipo <math>\alpha</math>(2<math>\rightarrow</math>3), <math>\alpha</math>(2<math>\rightarrow</math>6), <math>\alpha</math>(2<math>\rightarrow</math>8) y <math>\alpha</math>(2<math>\rightarrow</math>9).</p>	

**Tabla 6. Listado de anticuerpos utilizados en la detección de proteínas por inmunocitoquímica**

<i>Ab 1°</i>	<i>Dilución</i>	<i>Origen</i>	<i>Ab 2°</i>	<i>Dilución</i>	<i>Origen</i>	<i>Longitud excitación</i>	<i>Longitud emisión</i>
<i>TRPV1</i>	<i>1:100</i>	<i>Cabra</i>	<i>Alexa 488-anti cabra</i>	<i>1:500</i>	<i>Pollo</i>	<i>490 nm</i>	<i>525 nm</i>
<i>Calnexi- na</i>	<i>1:100</i>	<i>Conejo</i>	<i>Alexa 594-anti conejo</i>	<i>1:500</i>	<i>Pollo</i>	<i>590 nm</i>	<i>617 nm</i>
<i>DAPI</i>	<i>—</i>	<i>—</i>	<i>—</i>	<i>—</i>	<i>—</i>	<i>340 nm</i>	<i>488</i>

## 11. ANEXO II – Protocolos para la preparación de Geles de poliacrilamida

### GEL SEPARADOR

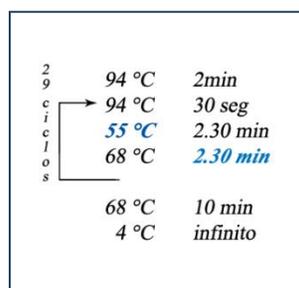
<i>Solución Stock</i>	<i>Cantidad utilizada para una concentración final de acrilamida</i>	
	<i>7 %</i>	<i>10 %</i>
<i>Acrilamida (30%) / bisacrilamida (0.8%)</i>	<i>3.50 mL</i>	<i>5 mL</i>
<i>4X Tris Cl / SDS pH 8.8</i>	<i>3.75 mL</i>	<i>3.75 mL</i>
<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>7.75 mL</i>	<i>6.25 mL</i>
<i>Persulfato de amonio (10%)</i>	<i>50 µL</i>	<i>50 µL</i>
<i>TEMED</i>	<i>15 µL</i>	<i>15 µL</i>

### GEL CONCENTRADOR

<i>Solución Stock</i>	<i>Cantidad utilizada</i>
<i>Acrilamida (30%) / bisacrilamida (0.8%)</i>	<i>0.650 mL</i>
<i>4X Tris Cl / SDS pH 6.8</i>	<i>1.2 mL</i>
<i>H<sub>2</sub>O</i>	<i>3.05 mL</i>
<i>Persulfato de amonio (10%)</i>	<i>25 µL</i>
<i>TEMED</i>	<i>5 µL</i>

## 12. ANEXO III – Protocolos para mutaciones puntuales por PCR doble

Figura suplementaria 1. Protocolo de PCR



En azul: temperatura y tiempo para la alineación y elongación, respectivamente. Ambas son variables según la longitud y el porcentaje GC en los oligos.

El presente protocolo de PCR se realizó para todas las mezclas modificando únicamente la temperatura para alineación y el tiempo de elongación en cada caso:

### PCR I

	Concentración inicial	Concentración Final
Templete	[940 ng/ul]	[2ug]
Oligo directo	[4uM]	[0.2ug]
Oligo complementario	[4uM]	[0.2ug]
Buffer pfx	[10x]	[2x]
MgSO <sub>4</sub>	[50mM]	[1mM]
dNTP's	[10 mM]	[0.2mM]
Polimerasa pfx	[0.4 uL/unidad]	[2.5u]
H <sub>2</sub> O cbp		50 UI

Alineación 55°C
Elongación 1.50 min

## PCR II

	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración Final</i>
<i>Producto PCR I</i>	<i>Se estimó de acuerdo a la intensidad del bandeo en el gel</i>	<i>Se estimó de acuerdo a la intensidad del bandeo en el gel</i>
<i>Oligo directo</i>	<i>[4uM]</i>	<i>[0.2 uM]</i>
<i>Oligo complementario</i>	<i>[4uM]</i>	<i>[0.2 uM]</i>
<i>Buffer pfx</i>	<i>[10x]</i>	<i>[2x]</i>
<i>MgSO<sub>4</sub></i>	<i>[50mM]</i>	<i>[1 mM]</i>
<i>dNTP's</i>	<i>[10 mM]</i>	<i>1 uL</i>
<i>Polimerasa (pfx)</i>	<i>[0.4 uL/unidad]</i>	<i>[2.5 unidades]</i>
<i>H<sub>2</sub>O cbp</i>		<i>100 uL</i>

Alineación  
55°C

Elongación  
2.30 min

## Digestión

	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>
<i>Producto PCR II</i>	<i>[estimada 2-5 ug]</i>	<i>[2-5 ug]</i>
<i>Buffer</i>	<i>[10x]</i>	<i>[1x]</i>
<i>Enzima de restricción I (Sacl)</i>	<i>[2000u / 100 uL]</i>	<i>[60 unidades]</i>
<i>Enzima de restricción II (Xbal)</i>	<i>[3000u / 150 uL]</i>	<i>[60 unidades]</i>
<i>BSA</i>	<i>[10x]</i>	<i>[1x]</i>
<i>H<sub>2</sub>O cbp</i>		<i>100 uL</i>

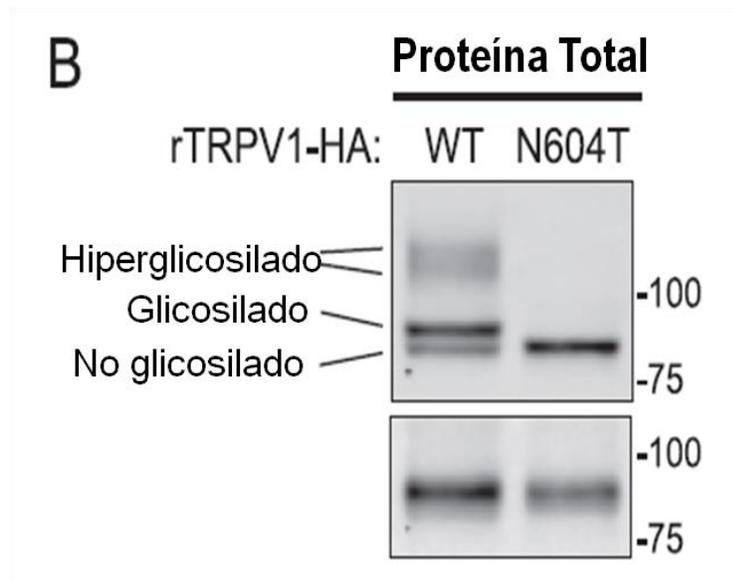
## Ligación

	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>
<i>Buffer</i>	<i>[10x]</i>	<i>[10x]</i>
<i>Inserto (digestión)</i>	<i>[estimada por densidad en gel]</i>	<i>[33 ng]</i>
<i>Vector</i>	<i>[estimada por densidad en gel]</i>	<i>[30 ng]</i>
<i>Ligasa</i>	<i>[3u / uL]</i>	<i>[3 unidades]</i>
<i>H<sub>2</sub>O cbp</i>		<i>10 uL</i>

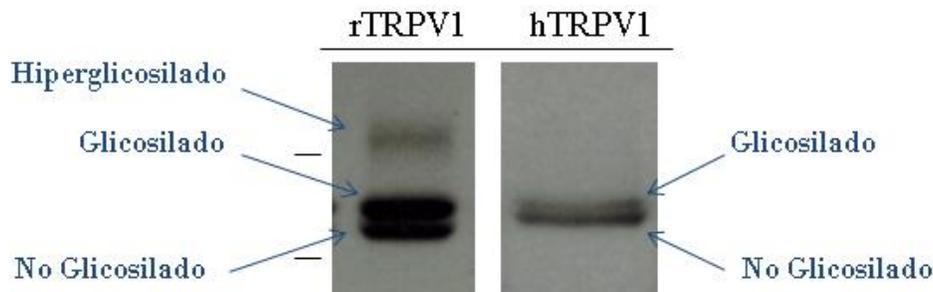
## Digestión diagnóstica

	<i>Concentración Final</i>	<i>Cantidad</i>
<i>ADN producto de Ligación</i>	<i>Estimada por intensidad del bandeo en gel</i>	<i>1 uL</i>
<i>Buffer</i>	<i>1X</i>	<i>1 uL</i>
<i>Enzima de restricción</i>	<i>200-2000 Unidades por /ul (según la enzima)</i>	<i>1 uL</i>
<i>H<sub>2</sub>O cbp</i>		<i>10 L</i>

### 13. IMÁGENES SUPLEMENTARIAS



**Fig. Suplementaria 1. El canal TRPV1 de rata se hiper glicosila.** En extractos de proteína total de células HEK293 transfectadas con TRPV1 de origen de rata se encontró un patrón de bandeado consistente con los resultados obtenidos en este trabajo. Se propone una clasificación predictiva sobre las bandas de mayor peso con referencia a su estado de glicosilación (imagen tomada y editada de Valdhuis et al. 2012).



**Fig. Suplementaria 2. Bandas menores en el perfil electroforético del canal TRPV1.** Las bandas correspondientes a los pesos menores de TRPV1 tienen una clara separación a un menor tiempo de exposición de la placa. Dichos pesos corresponden con la forma no glicosilada y glicosilada del monómero. Los marcadores corresponden a los pesos de 100 y 75 KDa respectivamente.

## 14. REFERENCIAS

Ahmed N. (2005). Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 67(1):3-21.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.

Arniges M, Fernández-Fernández JM, Albrecht N, Schaefer M, Valverde MA. (2006). Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem*. 281(3):1580-1586.

Aryal, P., Sansom, M. S. P., & Tucker, S. J. (2015). Hydrophobic Gating in Ion Channels. *Journal of Molecular Biology*, 427(1), 121–130.

Barrett PQ, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. (2013). Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of Ca(V)3.2 T-type calcium channels. *Diabetes*, 62(11):3828-3838. Caterina MJ, Julius D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*. 24:487-517.

Baruch Minke. (2010). The history of the *Drosophila* TRP channel: The birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet*. 24(4): 216–233.

Baylie RL, Brayden JE. (2011). TRPV channels and vascular function. *Acta Physiol (Oxf)*. 203(1):99-116.

Bennett E, Urcan MS, Tinkle SS, Koszowski AG, Levinson SR. (1997). Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism. *J Gen Physiol*, 109(3):327-343.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. Oct 23;389(6653):816-824

Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. (2005). The beta-glucuronidase *klotho* hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science*, 310:490–493.

Chung HS, Kim JS, Lee SM, Park SJ. (2016). Additional N-glycosylation in the N-terminal region of recombinant human alpha-1 antitrypsin enhances the circulatory half-life in Sprague-Dawley rats. *Glycoconj J*, 33(2):201-208

Chung MK, Guler AD & Caterina MJ (2008). TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* 11, 555–564.

Clapham DE. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 426(6966):517-524.

Cohen DM. (2006). Regulation of TRP channels by N-linked glycosylation. *Semin Cell Dev Biol*, 17(6):630-637.

Cohen M, Fisher CJ, Huang ML, Lindsay LL, Plancarte M, Boyce WM, Godula K, Gagneux P. (2016). Capture and characterization of influenza A virus from primary samples using glycan bead arrays. *Virology*, 493:128-35.

Colbert, H. y Bargmann, C. (1995). Odorant-Specific Adaptation Pathways Generate Olfactory Plasticity in *C. elegans*. *Neuron*, Vol. 14, 803-812

Cosens DJ, Manning A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*; 224(5216):285-287.

Cui M, Gosu V, Basith S, Hong S, Choi S. (2016). Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Nociceptor: Structure, Modulators, and Therapeutic Applications. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 104:81-125.

Dalit Shental-Bechor and Yaakov Levy. (2009). Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Current Opinion in Structural Biology*, 19:524–533

Dallavilla, T., Abrami, L., Sandoz, P. A., Savoglidis, G., Hatzimanikatis, V., & van der Goot, F. G. (2016). Model-Driven Understanding of Palmitoylation Dynamics: Regulated Acylation of the Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin. *PLoS Computational Biology*, 12(2), e1004774.

De Virgilio, M., Kitzmüller, C., Schwaiger, E., Klein, M., Kreibich, G., & Ivessa, N. E. (1999). Degradation of a Short-lived Glycoprotein from the Lumen of the Endoplasmic Reticulum: The Role of N-linked Glycans and the Unfolded Protein Response. *Molecular Biology of the Cell*, 10(12), 4059–4073.

Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T. (2003). N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem*, 278(48):47842-47852.

Ednie AR, Harper JM, Bennett ES. (2015). Sialic acids attached to N- and O-glycans within the Nav1.4 D1S5-S6 linker contribute to channel gating. *Biochim Biophys Acta*, 1850(2):307-317

Erler I, Hirnet D, Wissenbach U, Flockerzi V, Niemeyer BA (2004). Ca<sup>2+</sup>-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem*. 279(33):34456-34463.

Ferris SP, Kodali VK, Kaufman RJ. (2014). Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Dis Model Mech*, 7(3):331-341.

Goettig P. (2016). Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *Int J Mol Sci*, 17(12)

Hardie RC, Minke B. (2008). The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*.8(4):643-651.

Helenius A, Aebi M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 73:1019-49. Review.

Jia H, Guo Y, Song X, Shao C, Wu J, Ma J, Shi M, Miao Y, Li R, Wang D, Tian Z, Xiao W. (2016). Elimination of N-glycosylation by site mutation further

*prolongs the half-life of IFN- $\alpha$ /Fc fusion proteins expressed in Pichia pastoris. Microb Cell Fact, 15(1):209*

*Juárez (2016). Regulación del canal TRPV1 por efecto del receptor sigma 1. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.*

*Kadurin I, Golubovic A, Leisle L, Schindelin H, Grunder S. (2008). Differential effects of N-glycans on surface expression suggest structural differences between the acid-sensing ion channel (ASIC) 1a and ASIC1b. Biochem J. 412:469–475.*

*Kasturi, L., Chen, H., & Shakin-Eshleman, S. H. (1997). Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. Biochemical Journal, 323(Pt 2), 415–419.*

*Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM. (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. J Biol Chem, 276(30):28613-28619.*

*Lee, E., Jung, D. Y., Kim, J. H., Patel, P. R., Hu, X., Lee, Y., Kim, J. K. (2015). Transient receptor potential vanilloid type-1 channel regulates diet-induced obesity, insulin resistance, and leptin resistance. FASEB Journal, 29(8), 3182-3192.*

*Li CX, Ma GY, Guo MF, Liu Y. (2015). Sialic acid accelerates the electrophoretic velocity of injured dorsal root ganglion neurons. Neural Regen Res, 10(6):972-975.*

*Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. Neuron. 54(6):905-918.*

*Mant, A., Williams, S., Roncoroni, L., Lowry, E., Johnson, D., & O'Kelly, I. (2013). N-Glycosylation-dependent Control of Functional Expression of*

*Background Potassium Channels K2P3.1 and K2P9.1. The Journal of Biological Chemistry, 288(5), 3251–3264.*

*Menigoz A, Boudes M. (2011). The expression pattern of TRPV1 in brain. J Neurosci, 31(37):13025-7.*

*Montell C. et al. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. Mol Cell. 9(2):229-231*

*Morales-Lázaro SL, Simon SA, Rosenbaum T. (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). J Physiol. 591(13):3109-3121.*

*Miyanojara J, Shirakawa H, Sanpei K, Nakagawa T, Kaneko S. (2015). A pathophysiological role of TRPV1 in ischemic injury after transient focal cerebral ischemia in mice. Biochem Biophys Res Commun. 467(3):478-483.*

*Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. Genome Biology; 12(3):218.*

*Orestes P, Osuru HP, McIntire WE, Jacus MO, Salajegheh R, Jagodic MM, Choe W, Lee J, Lee SS, Rose KE, Piro N, Digruccio MR, Krishnan K, Covey DF, Lee JH, Barrett PQ, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM. (2013) Reversal of neuropathic pain in diabetes by targeting glycosylation of Ca(V)3.2 T-type calcium channels. Diabetes. 62(11):3828-38.*

*Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. (2001). Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.*

*Raju TS, Scallon B. (2007). Fc glycans terminated with N-acetylglucosamine residues increase antibody resistance to papain. Biotechnol Prog, 23(4):964-971.*

*Ramsey IS, Delling M, Clapham DE.(2006). An introduction to TRP channels. Annu Rev Physiol, 68:619-647.*

Rosenbaum T, Simon SA. TRPV1 Receptors and Signal transduction. In: Liedtke WB, Heller S, editors. (2007). *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 5.

Rouwette, T., Avenali, L., Sonderrmann, J., Narayanan, P., Gomez-Varela, D., & Schmidt, M. (2015). Modulation of nociceptive ion channels and receptors via protein-protein interactions: implications for pain relief. *Channels*, 9(4), 175–185.

Sagar DR, Jhaveri MD, Richardson D, Gray RA, de Lago E, Fernández-Ruiz J, Barrett DA, Kendall DA, Chapman V. (2010). Endocannabinoid regulation of spinal nociceptive processing in a model of neuropathic pain. *Eur J Neurosci*. 31(8):1414-1422.

Schauer R. (1982). Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 40, pp. 131–234.

Scott H, Panin VM. (2014) The role of protein N-glycosylation in neural transmission. *Glycobiology*, 24(5):407-417.

Sethi MK, Fanayan S. (2015). Mass Spectrometry-Based N-Glycomics of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 16(12):29278-29304.

Shakin-Eshleman SH, Spitalnik SL, Kasturi L. (1996). The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J Biol Chem*, 271(11):6363-6366.

Silva M, Costa-Pereira JT, Martins D, Tavares I. (2016). Pain modulation from the brain during diabetic neuropathy: Uncovering the role of the rostroventromedial medulla. *Neurobiol Dis*. 96:346-356.

Smani T, Shapovalov G, Skryma R, Prevarskaya N, Rosado JA. (2015). Functional and physiopathological implications of TRP channels. *Biochim Biophys Acta*. 1853(8):1772-1782.

Stowell SR, Ju T, Cummings RD. (2015). Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol*, 10:473-510.

Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., ... & Julius, D., (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3), 531-543.

Tóth A, Boczán J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L, Blumberg PM. (2005). Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*.135(1-2):162-168.

Veldhuis, N. A., Lew, M. J., Abogadie, F. C., Poole, D. P., Jennings, E. A., Ivanusic, J. J., ... McIntyre, P. (2012). N-Glycosylation Determines Ionic Permeability and Desensitization of the TRPV1 Capsaicin Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21765–21772.

Walop Jn, Boschman Ta, Jacobs J. (1960). Affinity of N-acetylneuraminic acid for influenza virus neuraminidase. *Biochim Biophys Acta*, 44:185-196.

Wan Y. (2016). New Mechanism of Bone Cancer Pain: Tumor Tissue-Derived Endogenous Formaldehyde Induced Bone Cancer Pain via TRPV1 Activation. *Adv Exp Med Biol*. 904:41-58.

Woo, S. K., Kwon, M. S., Ivanov, A., Geng, Z., Gerzanich, V., & Simard, J. M. (2013). Complex N-Glycosylation Stabilizes Surface Expression of Transient Receptor Potential Melastatin 4b Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(51), 36409–36417.

Xiu-Lin Zhang, Xiao-Qing Peng, Yan-Ling Jing, Wen-Rui Xie, Yi-Kuan Xie. (2003). Sialic acid contributes to generation of ectopic spontaneous discharges in rats with neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, 346(1–2): 65-68.

Xu C, Ng DT. (2015). Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(12):742-752.

Yao J, Liu B, Qin F. (2010). *Kinetic and energetic analysis of thermally activated TRPV1 channels. Biophys J.* 99(6):1743-1753.

Zheng, J. (2013). *Molecular Mechanism of TRP Channels. Comprehensive Physiology,* 3(1), 221–242.