



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

***Regulación de la expresión de los canales TRP  
por efecto del receptor Sigma 1***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
***Biol. Miguel Ortíz Rentería***

TUTOR PRINCIPAL  
***Dra. Sara Luz Morales Lázaro (Instituto de Fisiología celular, UNAM)***

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
***-Dra Myrian Velasco Torres (Instituto de Fisiología celular, UNAM)***  
***-Dr Ángel Alfonso Zaráin Herzberg (Facultad de Medicina, UNAM)***

Ciudad Universitaria, CDMX. Octubre, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



### **Agradecimientos institucionales.**

- Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Este proyecto fue financiado por el Programa de la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGPA)-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IA202717 y No.IN206819.
- A CONACyT por el apoyo económico brindado con la beca para alumnos nacionales con número 851232.
- A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro del Instituto de Fisiología Celular, UNAM quien participó como tutor principal de este proyecto.
- Al comité tutor integrado por la Dra. Myrian Velasco Torres y el Dr. Ángel Alfonso Zaráin Herzberg.

### **Agradecimientos formales.**

- Al comité sinodal integrado por el Dr. León Islas Suárez, la Dra. Marina Macías Silva, al Dr. Diego González Halphen, el Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por aportar sus observaciones, recomendaciones, asesoría e importante contribución a este proyecto.
- A la Dra. Tamara Rosenbaum Emir, por permitir el uso del laboratorio donde se realizó este trabajo y por sus valiosos comentarios respecto al mismo.
- A la Biol. Alejandra Llorente Gil por su apoyo técnico para el desarrollo de este proyecto.
- Al Laboratorista Félix Sierra Ramírez por su apoyo técnico.
- Al Dr. Héctor Alfonso Malagón Rivero por su apoyo con el mantenimiento y manipulación de animales (Unidad de Bioterio del Instituto de Fisiología, UNAM).
- A la M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo y Francisco Pérez Eugenio, por su apoyo técnico (Unidad de Computo del Instituto de Fisiología, UNAM).
- A la Dra. Ruth Rincón Heredia y a la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, por su apoyo técnico (Unidad de imagenología).

## **Agradecimientos personales**

- A mis padres y hermanos por su cariño incondicional y por haberme apoyado en todo momento durante mi etapa de maestría. Gracias ellos he logrado un triunfo más en mi vida.
- A mi tío Pablo Ortíz Palma que en los momentos más difíciles de este año nos apoyó y nos ayudó como nadie más. Gracias.
- A la Dra Sara Luz, a quien le agradezco su digna labor y le doy mi reconocimiento por fomentar la formación tanto de buenos científicos como de excelentes personas. Tiene mi gratitud y cariño por su infinita paciencia y profesionalidad. Ha sido muy importante su presencia en mi vida.
- A los miembros del laboratorio, a Rebe y Raúl por siempre apoyarme y escucharme en todo momento dentro del lab. A Félix y a Ale por brindarme buenos consejos tanto en las buenas como en las malas. Y también agradecer a Óscar y Angélica que resultaron ser muy buenos amigos.
- A Héctor Salas, Juan Carlos Herrera, Aline Cruz por su apoyo y amistad.

# Índice

Abreviaturas: .....	1
Resumen .....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Nocicepción .....	3
1.2 Canales iónicos.....	4
1.3 Canales TRP.....	5
1.4 Canal TRPV1 .....	7
1.5 Interacción de TRPV1 con otras proteínas .....	10
1.6 Receptor Sigma 1 (Sig-1R).....	12
1.7 Interacción de Sig-1R con proteínas.....	15
1.8 Sig-1R y dolor .....	17
2. Antecedentes directos.....	19
3. Hipótesis .....	21
4. Objetivos .....	21
4.1 Objetivo General:.....	21
4.2 Objetivos Particulares: .....	21
5. Metodología.....	22
5.1 Cultivo celular .....	22
5.2 Transfección .....	22
5.3 Extracción de DRG .....	24
5.4 Fluorescencia y microscopía confocal .....	25
5.5 Ensayos de Co-inmunoprecipitación.....	26
5.6 Lisis celular .....	28
5.7 Cuantificación de proteínas.....	28
5.8 Inmunodetección de proteínas en fase sólida (Western blot).....	30
5.9 Ensayos de conducta de dolor.....	33
5.10 Tratamientos con siRNA .....	33
5.11 Tratamientos con P4 y RU.....	34
5.12 RT-PCR.. .....	34
6. Resultados .....	37
6.1 Estandarización del anticuerpo policlonal de cabra para TRPV1 .....	37

6.2 Alteraciones en la expresión del Sig-1R modifican los niveles proteicos del canal TRPV1 .....	37
6.3 Tratamientos con progesterona generan una disminución en los niveles proteicos de TRPV1 .....	39
6.4 Progesterona modifica los niveles proteicos de TRPV1 de manera independiente a sus receptores clásicos.....	40
6.5 La nocicepción dependiente de TRPV1 disminuye en ratonas embarazadas .....	44
6.6 TRPV1 y Sig-1R co-localizan en el retículo endoplasmático de las células HEK293.....	46
6.7 Sig-1R y TRPV1 colocalizan en neuronas DRG.....	47
6.8 Antagonistas de Sig-1R interrumpen la interacción entre Sig-1R y TRPV1..	47
6.9 Inmunodetección de distintas construcciones de DNA del canal TRPV1 .....	49
6.10 Sig-1R interacciona con los dominios transmembranales de TRPV1.....	51
6.11 Co-localización de Sig-1R con el canal TRPA1 .....	52
7. Discusión .....	54
8. Conclusiones.....	64
9. Bibliografía .....	65

## **Abreviaturas:**

- **DNA:** Ácido desoxirribonucleico.
- **mRNA:** Ácido ribonucleico Mensajero
- **BiP:** Proteína de unión a inmunoglobulinas (Binding immunoglobulin protein).
- **BD1063:** 1-[2-etil]-4-metilpiperazina.
- **BSA:** Albumina de suero bovino.
- **RT-PCR:** Reverse transcription polymerase chain reaction
- **DRG:** Ganglios de la raíz Dorsal (Dorsal Root Ganglion).
- **GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- **CaM:** calmodulina.
- **GFP:** Green fluorescent protein.
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **PP2B:** Serina-treonina proteína fosfatasa 2B.
- **PGA:** Perlas de agarosa con la proteína G acoplada
- **LPA:** Ácido lisofosfatídico
- **HEK293:** Línea celular de riñón de embrión humano (Human Embryonic Kidney).
- **IgG:** Inmunoglobulinas.
- **IP:** Inmunoprecipitado.
- **NMDA:** Receptor de *N-metil-D-aspartato*
- **PBS:** Amortiguador de fosfatos.
- **AKAP:** Proteínas de anclaje a cinasas A.
- **InsP3R:** Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
- **GABARAP:** Proteína asociada al receptor GABA.
- **CaMKII:** Ca<sup>2+</sup>/calmodulina cinasa II
- **PBS-T:** Amortiguador de Fosfatos adicionado con Tween 20.
- **PKA:** Proteína cinasa A.
- **PKC:** Proteína cinasa C.
- **PT:** Proteínas totales solubilizadas.
- **PVDF:** Polivinilideno fluorido.
- **Sig-1R:** Receptor sigma 1.
- **Sig-1R-GFP:** Fusión del Receptor Sigma 1 con GFP.
- **TRP:** Receptor de potencial transitorio (*Transient Receptor Potential*).
- **TRPV1:** Receptor de potencial transitorio vaniloide subtipo 1.
- **TRPA1:** Receptor de potencial transitorio de anquirina 1.
- **Vh:** vehículos.
- **P4:** Progesterona.
- **PFA:** Paraformaldehído al 4%.
- **TG:** Ganglio Trigeminal.
- **CRAC:** Cholesterol recognition amino acid Consensus sequence



## **Resumen**

El canal iónico TRPV1 es una proteína expresada principalmente en neuronas sensoriales que muestra una estrecha relación con procesos como la inflamación y el dolor, por lo que este canal representa una diana molecular para el tratamiento de diversos padecimientos. La mayoría de los estudios sobre TRPV1 se enfocan en investigar distintos ligandos tanto agonistas como antagonistas, que regulen al canal con el fin de encontrar un tratamiento que module el dolor mediado por este canal. Aunque la interacción de TRPV1 con proteínas que regulan su función se ha explorado pobremente, por ejemplo, con proteínas de andamiaje como AKAP79 o del citoesqueleto como Whirlina, la modulación de TRPV1 por medio de proteínas con función de chaperonas no se ha dilucidado. En este proyecto se demostró que TRPV1 interactúa físicamente con el receptor Sigma 1 (Sig-1R), una chaperona cuya función puede ser regulada por diversos ligandos como la progesterona, que actúa como antagonista de Sig-1R y como un neuroesteroide asociado a la modulación del dolor. En este trabajo demostramos que la disminución en la expresión de Sig-1R, mediante el uso de antagonistas y utilizando un siRNA específico para Sig-1R, afecta concomitantemente los niveles proteicos de TRPV1, aunado a esto el antagonismo de Sig-1R por la progesterona, también produjo como resultado la regulación negativa de los niveles proteicos de TRPV1, de manera independiente de los receptores a progesterona nucleares y de membrana. A nivel fisiológico, demostramos que ratones hembra en gestación, etapa en la cual los niveles de progesterona son elevados, muestran un aumento en el umbral del dolor asociado a la activación del canal TRPV1. Nuestras evidencias experimentales también muestran que TRPV1 y Sig-1R colocalizan de manera predominante en el retículo endoplasmático y que interactúan de manera directa, mediante los dominios transmembranales de TRPV1. Además, demostramos que la interacción entre TRPV1 y Sig-1R es susceptible a ser interrumpida por la presencia de antagonistas de Sig-1R. Finalmente, demostramos que Sig-1R podría estar regulando similarmente a otro canal TRP, el canal TRPA1, ya que también se observó colocalización de este canal y Sig-1R. Con este trabajo se enfatiza como Sig-1R es relevante para regular el dolor mediado por canales de la familia TRP, en específico el canal TRPV1.

## **1. Introducción**

### **1.1 Nocicepción**

La percepción y evasión de estímulos dañinos es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular y, en consecuencia, la supervivencia. En los vertebrados, las neuronas sensoriales (los llamados nociceptores) detectan estímulos químicos, mecánicos y térmicos nocivos, transmitiendo esta información a través de las fibras nerviosas C y A $\delta$ , en estas neuronas sus somas se encuentran dentro de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) (Dermot J *et al.*, 2001). La información posteriormente llega al asta dorsal y continúan transmitiendo el mensaje a través de las neuronas de segundo orden las cuales se dirigen a la vía espino-talámica y finalmente hasta el cerebro donde se genera la experiencia sensorial del dolor (Rouwette T, *et al* 2015). Los nociceptores son las primeras células de una serie de neuronas que conducen a la sensación de dolor. Las funciones esenciales de los nociceptores es transducir estímulos nocivos a despolarizaciones que desencadenan potenciales de acción, y conducir desde el sitio sensorial periférico a la sinapsis en el sistema nervioso central, para que los potenciales de acción regulen la liberación de neurotransmisores en la terminal presináptica. Para que esto se lleve a cabo es necesaria la participación de canales iónicos (Daniel T, 2017). Por lo tanto, la nocicepción es un proceso fisiológico y el dolor se refiere a la respuesta emocional, la cual puede ser subjetiva.

Por lo tanto, es gracias a las proteínas transmembranales llamadas canales iónicos, que el organismo posee esa capacidad de reaccionar a uno o varios estímulos de forma muy específica según el tipo de canales iónicos que expresen (Purves, 2001).

## **1.2 Canales iónicos**

Las células poseen un gradiente electroquímico el cual difiere en ambos lados de la membrana, siendo negativo del lado intracelular y positivo del lado extracelular, permitiendo que se genere el potencial de membrana por la mayor concentración de iones positivos en uno de los lados. Este voltaje se mantiene por la difusión pasiva de iones a través de proteínas que se encuentran embebidas en la membrana plasmática llamadas canales iónicos, que pueden ser regulados por ligandos, voltaje, temperatura o estrés mecánico (Wilson, *et al.*, 2007).

Los canales iónicos son complejos multiproteicos que forman poros y facilitan el flujo de iones a través de las membranas celulares de acuerdo a determinados estímulos (Hille, B, 2001). Gracias a estos canales hay una comunicación entre las células y el medio que las rodea, por ejemplo, en algunos tipos de neuronas que se encuentran en el sistema nervioso periférico la función de algunos canales de sodio, de calcio y de potasio dependientes de voltaje, es generar la percepción, transducción y transmisión de señales que en algunos casos pueden ser dañinas para el organismo (Zheng, 2013).

El dolor es causado por estímulos nocivos y por estímulos que pueden generar daño tisular. El dolor cumple una función fisiológica crucial como un sistema de alerta rápida que puede ayudar a prevenir lesiones o limitar la extensión del daño.

Los canales iónicos que participan en la vía del dolor están codificados por múltiples familias de genes, que responden a diversos estímulos. Muchos de estos canales iónicos están ubicados en la terminal periférica del nociceptor, lo que afecta la excitabilidad de las neuronas después de una lesión y, como resultado, afecta la sensación de dolor. Canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes por voltaje, canales de la familia TRP como el canal TRPV1, ASIC, canales activados por ligando, P2X, y los receptores NMDA, AMPA y Kainato, todos ellos participan en el proceso del dolor. (Gold & Gebhart, 2010). La activación de dichos canales iónicos genera una despolarización de la membrana neuronal ocasionando que se lleve a cabo el primer paso de la vía del dolor donde las señales nocivas se convierten en mensajes eléctricos o también llamado transducción (McEntire *et al.*, 2016). Si la magnitud de la despolarización es suficiente, se activan los canales de sodio

dependientes por voltaje (Nav) donde se inicia y se propaga un potencial de acción a lo largo del axón (transmisión) hasta que alcanza la zona sináptica, donde la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav) produce la liberación de neurotransmisores excitadores (Sekiguchi et al., 2018).

Un tipo de canal iónico que participan en distintos procesos fisiológicos son los canales TRP, los cuales son sensores celulares para un amplio espectro de estímulos físicos y químicos. Están involucrados en la fisiología de la visión, audición, el tacto, el olfato, el gusto, la temperatura y la sensación de dolor. Los canales TRP también desempeñan funciones fundamentales en la señalización celular y permiten que la célula receptora responda a cambios ambientales benignos o perjudiciales. Dado que la activación del canal TRP está controlada por procesos muy diversos y, en muchos casos, presenta propiedades polimodales complejas, es crucial y desafiante entender cómo responde cada canal TRP a sus formas únicas de activación (Zheng 2013).

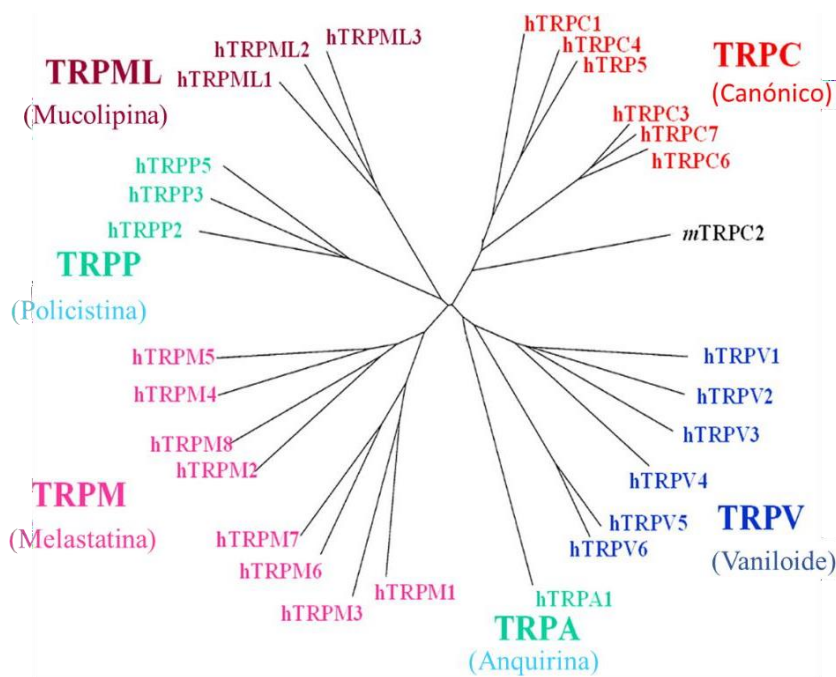
### **1.3 Canales TRP**

La familia de canales iónicos TRP fue descrita en una mutante de la mosca *Drosophila melanogaster*, en la cual había la presencia de canales iónicos que al ser estimulados por la luz respondían de manera transitoria (Minke, 1977). La familia TRP se caracteriza por que muchos de sus miembros se activan ante la presencia de diversos estímulos, es decir, son canales polimodales que responden a estímulos térmicos, químicos, mecánicos y osmóticos (Moran, et al, 2004). Actualmente en mamíferos esta familia se clasifica en seis subfamilias denominadas: vaniloide (TRPV), Canónica (TRPC), Anquirina (TRPA), Melastatina (TRPM), Policistina (TRPP) y Mucolipina (TRPML) (Nilius & Owsianik, 2011) (Figura 1).

Los canales de la familia TRP están constituidos por cuatro subunidades (tetrámeros) dando así origen a la proteína funcional; cada subunidad posee seis dominios transmembranales (S1-S6) y entre el dominio S5 y S6 presentan una región permeable a cationes denominada poro (Revisado en Morales- Lázaro et al.,

2013; Nilius & Flockerzi, 2014). El extremo amino y carboxilo terminal se encuentran en la región intracelular, además el carboxilo terminal posee una secuencia conservada en las subfamilias TRPC, TRPV y TRPM es la caja TRP, y sirve como un zipper en espiral que mantiene el canal en una conformación cerrada. (Clapham David *et al.*, 2003). En el caso de las regiones de la caja TRP de TRPM8, TRPV5 y TRPM5 se han implicado recientemente en la detección de niveles de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>); una disminución de PIP<sub>2</sub> provocó el cierre de los canales. Siguiendo la hipótesis estructural anterior, PIP<sub>2</sub> podría sensibilizar canales desestabilizando el zipper en espiral, permitiendo que otros estímulos establezcan una conformación de canal abierto (Rohacs T, et al 2005).

Uno de los miembros más estudiado de esta familia es el denominado canal TRPV1, el cual se encuentra ampliamente asociado a detección de estímulos nocivos los cuales conllevan a la generación de dolor agudo y crónico (neuropatías) y se expresa predominantemente en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (neuronas DRG) y del ganglio trigeminal (TG) (Willis & Coggeshall, 2004).

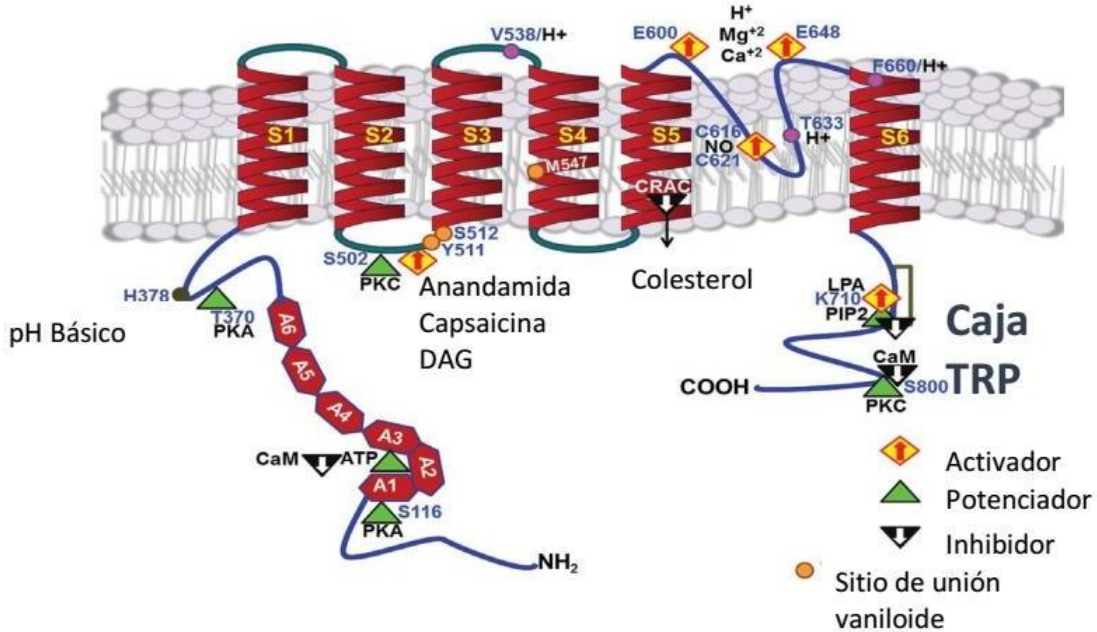


**Figura 1. Árbol filogenético de la superfamilia de canales TRP de mamíferos.** TRPC (canónico), TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPA (anquirina), TRPP (policistina) y TRPML (mucolipina) (Modificado de Nilius et al2007).

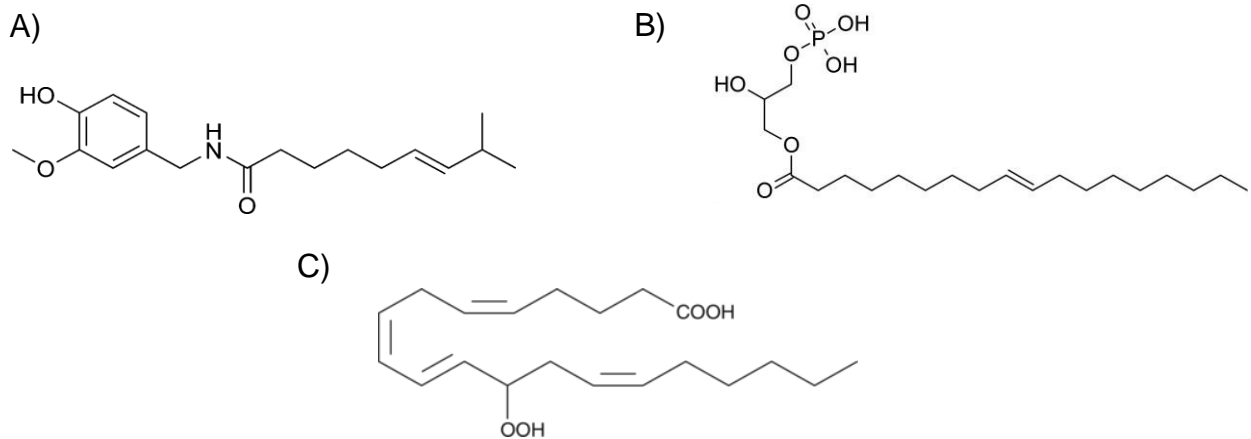
#### **1.4 Canal TRPV1**

El canal TRPV1 se expresa principalmente en neuronas pertenecientes al sistema nervioso periférico, aunque también se expresa en áreas específicas del sistema nervioso central como en la corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, tálamo, bulbo olfatorio y amígdala (Menigoz & Boudes, 2011; Tóth *et al.*, 2005).

La región amino terminal del canal TRPV1 se caracteriza por poseer un dominio de seis dominios de anquirinas, lo cual genera la interacción del canal con proteínas del citosol y que pueden regular la actividad del canal, además de que también ha sido relacionado como un dominio que permite adecuadamente el tráfico de algunos miembros de la familia vaniloide a la membrana plasmática y que el canal se oligomerice correctamente (Erler *et al.*, 2004; RNAiges *et al.*, 2006) (Figura 2). Se ha comprobado que la región carboxilo terminal de TRPV1 interacciona con  $\beta$ -tubulina, indicando que el canal puede ser modulado a través de las interacciones con el citoesqueleto (Revisado en Morales-Lázaro S. *et al.*, 2013). En el carboxilo terminal presenta aminoácidos positivos permitiendo que el canal interactue directamente con fosfatidilinositoles como el PIP<sub>2</sub>, compuesto muy importante cuando el canal es activado por capsaicina (revisado en Morales-Lázaro S. *et al.*, 2013) (Figura 2). En cuanto a los dominios transmembranales hay sitios para la unión de ligandos, tal es el caso del S5, el cual posee la región para la unión de colesterol, el cual actúa como un inhibidor del canal (Picazo-Juárez Giovanni *et al.*, 2011). Además, en la región intracelular que une al S3 y S4 se encuentra el sitio de unión a capsaicina, anandamida y diacilglicerol (Revisado en Morales-Lázaro S. *et al.*, 2013) (Figura 2). La activación de TRPV1 esta mediada por estímulos químicos de naturaleza exógena como el compuesto vaniloide denominado capsaicina (Catherine *et al.* 1997). Además, la activación del canal TRPV1 puede producirse por temperaturas de  $\geq 42^{\circ}\text{C}$  y por pH extracelular ácido o intracelular básico (revisado en Morales-Lázaro S, *et al.* 2013). Los compuestos endógenos que destacan son aquellos que son liberados durante el proceso de daño tisular o inflamación tales como la anandamida, el ácido lisofosfatídico (LPA), productos derivados de la lipooxigenasa como el ácido 12-Hidroxieicosatetraenoico, entre otros (revisado en Morales-Lázaro S, *et al.* 2013) (Figura 3).



**Figura 2. Representación de la subunidad de TRPV1.** Se muestran los seis dominios transmembranales de TRPV1 (S1-S6) así como el amino y carboxilo terminal localizados de manera intracelular. Destacando en la región del amino terminal los seis dominios de anquirina (A1-A6), mientras que en el carboxilo terminal destaca la presencia de la caja TRP. Además, se muestran distintos ligandos del canal tanto activadores, inhibidores y potenciadores (modificado de Morales-Lázaro S. et al., 2013)



**Figura 3. Distintos activadores del canal TRPV1.** A) El compuesto Vaniloide capsaicina B) Ácido Lisofosfatídico C) Ácido 12-Hidroieicosatetraenoico.

Aunado a lo anterior, la función de TRPV1 es regulada por fosforilaciones catalizadas por distintas cinasas que participan en este proceso, entre las cuales se destacan la proteína cinasa "C" (PKC) que fosforila a los residuos de serina S502 localizado entre los dominios S2-S3 y S800 localizado en el carboxilo terminal; la proteína cinasa "A" (PKA) que fosforila a residuos de serina y treonina: S116, T144, T370 ubicados en la región amino terminal y también es capaz de fosforilar a S502. Por último, la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina cinasa II (CaMKII) que fosforila residuos de treonina T704 y Serina Ser 502, con lo que beneficia la unión a la capsaicina (Szallasi *et al.*, 2007; Btsh *et al.*, 2015; Samelson *et al.*, 2015, Rosenbaum & Simon, 2007). Estas fosforilaciones están asociadas a la sensibilización del canal, proceso definido como una reducción en el umbral de activación del canal y un aumento en la magnitud de la respuesta a la estimulación causada por un ligando (Gold, M, et al; 2010), lo cual produce que el canal se pueda activar incluso a la temperatura corporal (Morales-Lázaro et al., 2013). Aunque el canal no solamente se vuelve más sensible a temperaturas más bajas sino también a ser activado a concentraciones más bajas de sus agonistas como la capsaicina.

Por otro lado, el canal TRPV1 también se regula por medio de la desfosforilación, esto a través de la acción de las fosfatasas dependientes de calcio como la calcineurina (PP2B o serina-treonina proteína fosfatasa 2B) (Jung *et al.*, 2004; Szallasi & Blumberg, 2007). Esta desfosforilación se presenta después de la activación continua del canal TRPV1, conllevándolo a un estado refractario en el que, ya que no hay respuesta del canal incluso en presencia de agonistas, este estado es reversible y es denominado desensibilización (Szallasi & Blumberg, 2007). Un mediador muy importante para esta desensibilización es la calmodulina (CaM), proteína que interacciona directamente en el amino terminal (residuos 189-222) y en el carboxilo terminal (residuos 767-801) del canal (Liedtke & Heller, 2007, Rosenbaum et al 2004). La calmodulina se activa por el calcio que pasa a través del canal TRPV1, esto permite el reclutamiento y la activación de la calcineurina 2B, la responsable de la desfosforilación del canal TRPV1 (Por E. D., 2010).



### **1.5 Interacción de TRPV1 con otras proteínas.**

A la fecha, existe un gran número de estudios enfocados en la regulación de la activación del canal TRPV1 por diversos ligandos, sin embargo, pocos son los trabajos acerca de la regulación del canal TRPV1 por medio de interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, se ha descrito su interacción con la proteína de andamiaje AKAP79. Las proteínas de anclaje a cinasas A (AKAP) son bien conocidas por su capacidad para acoplar proteínas reguladoras a efectores posteriores. Por ejemplo, AKAP79 (también conocido como AKAP5 o AKAP150 en ratón) sirve de andamios para las cinasas PKA, PKC y PP2B (calcineurina) las cuales ejercen sus efectos sobre un gran número de canales diferentes (Zhang et al., 2008).

AKAP79/150 organiza un complejo multiproteico para posicionar a la proteína cinasa A (PKA) o a la proteína cinasa C (PKC) en la proximidad inmediata de los canales TRPV1 y mejorar la eficiencia de la fosforilación. Se ha demostrado también que AKAP79/150 facilita un complejo que contiene TRPV1 y adenilil ciclasa (AC). El anclaje de AC a este complejo genera grupos locales de cAMP sensibilizando al canal a ciertos agonistas (Zhang et al., 2008) La interacción de AKAP79 y TRPV1 es por medio de sus carboxilos terminales, específicamente en los residuos 326–336 de AKAP79 y 736–745 del canal (Btesh; et al2013).

Otra importante interacción del canal TRPV1 es con la proteína GABARAP (Proteína asociada al receptor GABA) (Lainez, S, et al; 2010). La cual aumenta los niveles de proteína total de TRPV1 y estimula la agrupación de receptores en la superficie de la célula. Funcionalmente, la expresión de GABARAP modifica la dependencia al voltaje y la sensibilidad de TRPV1 a capsaicina, aunado a ello, en particular, la presencia de GABARAP aumenta selectivamente la interacción de tubulina con el dominio C- terminal de TRPV1. La interrupción del citoesqueleto de tubulina con nocodazol reduce las corrientes provocadas por capsaicina en las células que expresan TRPV1 y GABARAP, sin afectar la cinética de la desensibilización inducida por vaniloides. (Lainez, S, et al; 2010)

Otro mediador molecular importante para regular la cantidad relativa de canal TRPV1 expresada en la superficie celular, es la proteína Kv $\beta$ 2 (subunidad  $\beta$ 2 de los canales de potasio dependientes de voltaje). Ensayos de coimmunoprecipitación y experimentos de inmunofluorescencia en neuronas DRG indican una interacción íntima entre las dos proteínas, y relacionan a la subunidad Kv $\beta$ 2 con el transporte del canal de TRPV1 a la membrana plasmática (Bavassano et al., 2013).

La subunidad Kv $\beta$ 2 hace que el canal TRPV1 sea significativamente más sensible a la capsaicina. Efectos similares se reportaron previamente para algunos canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), ya que se demostró que esta proteína es capaz de alterar la farmacología de estos canales (Beekwilder et al2003, González et al2002). Como explicación de este efecto, se propuso que la proteína Kv $\beta$ 2 podría inducir un cambio alostérico en la conformación tridimensional de TRPV1, dando como resultado una mayor respuesta a la capsaicina (Bavassano et al., 2013).

Además, se ha demostrado que TRPV1 interacciona con la proteína Whirlina. Esta proteína interactúa con una calmodulina dependiente de serina cinasa (CASK) y participa en la formación de los complejos proteicos estructurales que facilitan la sinapsis nerviosa en el sistema nervioso central (Mburu et al2003). También se ha demostrado que la expresión heteróloga de Whirlina aumenta los niveles de proteína total y de membrana de TRPV1 y aumenta el tráfico a la membrana plasmática, aunado a esto promueve la agrupación de los canales. El silenciamiento de la expresión de Whirlina favorece la degradación concomitante de TRPV1 que puede prevenir mediante la inhibición del proteasoma. La cinética de co-degradación de TRPV1 y whirlina al detener la traducción de proteínas refleja una degradación concomitante. Cabe destacar que la expresión de Whirlina reduce significativamente la degradación de TRPV1 inducida por la exposición prolongada a la capsaicina (Ciardo et al2015).

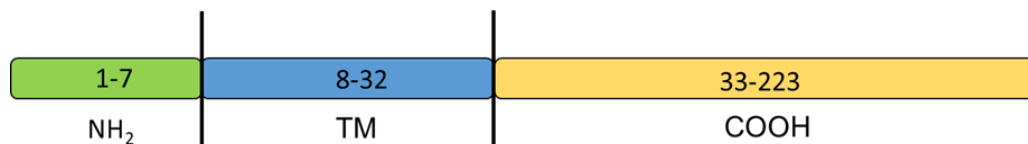
Todos estos ejemplos, demuestran como la interacción del canal TRPV1 con proteínas específicas, regula la cantidad/función de estos canales. Sin embargo, hasta la fecha, no existe ningún reporte para TRPV1 ni para otro miembro de la familia TRP, que haya demostrado la regulación de estos canales con proteínas tipo

chaperonas. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es estudiar la regulación de los niveles proteicos del canal TRPV1 por una proteína con actividad de chaperona, el receptor Sig-1R, que se ha asociado ampliamente a la nocicepción.

### **1.6 Receptor Sigma 1 (Sig-1R)**

El Sig-1R es una proteína implicada en una amplia gama de procesos biológicos que van desde la enfermedad neurodegenerativa hasta el cáncer. Este receptor se expresa de manera ubicua en varios órganos de mamíferos, como el cerebro, el hígado, el páncreas, los testículos, la placenta y la glándula suprarrenal, así como en los tumores malignos (Vilner et al., 1995; Hanner et al., 1996; Spruce et al., 2004). Varios estudios que utilizan ligandos selectivos de Sig-1R han demostrado que están involucrados en la regulación de la morfogénesis de las células neuronales (p. Ej., sinaptogénesis, diferenciación neuronal, mielinización), neuroprotección, dolor, fisiopatología de ciertas enfermedades humanas, como depresión, abuso de drogas, así como en la enfermedad de Alzheimer y cáncer (Nakazawa et al., 1998; Goyagi et al., 2001; Maurice, 2004; Spruce et al., 2004; Liu et al., 2005; Marrasso et al., 2005; Achison et al., 2007; Bermack & Debonnel, 2007; Dun et al., 2007; Martin-Fardon et al., 2007; Mei y Pasternak, 2007; Renaudo et al., 2007; Hayashi & Su, 2008; Smith et al., 2008; Tchedre & Yorio, 2008).

Este receptor es una proteína transmembranal de 223 aminoácidos (Figura 4.) (Hanner, M. et al. 1996), que se localiza en el retículo endoplasmático (ER) y que está altamente enriquecida en la interfase del ER y la mitocondria (Hayashi & Fujimoto, 2010; Su, *et al.*, 2010). También se ha reportado su localización en la membrana plasmática (Roth, M.D. *et al.* 2005)



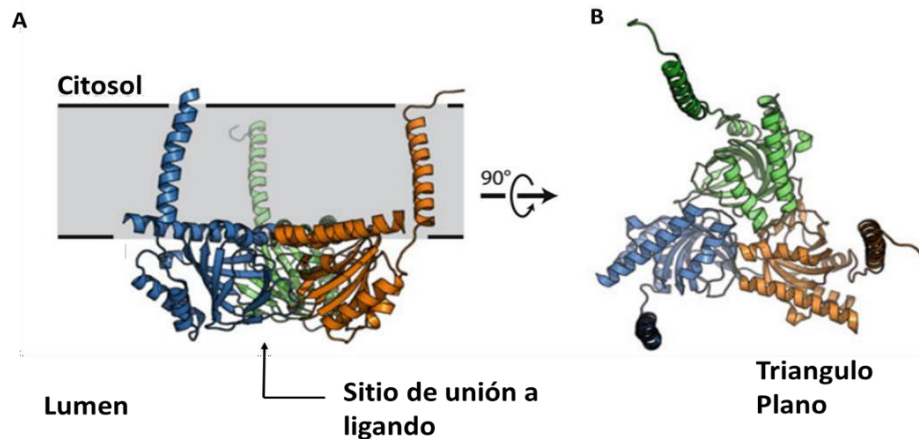
**Figura 4. Modelo lineal de Sig-1R:** En este esquema se muestran los dominios del Sig-1R, el amino terminal (NH<sub>2</sub>), la región transmembranal (TM) y el carboxilo terminal (COOH). La numeración indica los aminoácidos que constituyen cada dominio.

La determinación de la secuencia primaria de Sig-1R condujo a una extensa predicción y especulación con respecto a su estructura tridimensional. El primer modelo de Sig-1R establece que el receptor posee un segmento hidrofóbico sencillo cercano al amino terminal y con una pequeña porción en el lado del lumen. Por lo tanto, el resto de la proteína se debía encontrar en el lado citosólico, unido a la membrana del Retículo (Moebius, et al,1996).

Un segundo modelo (Aydar et al. 2002) propuso una arquitectura transmembranal de dos pases en base a la detección de Sig-1R fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP) en el amino y/o carboxilo terminal, indicando que estos dos dominios se encuentran del lado citosólico. El modelo de dos pases fue ampliamente aceptado como un hecho establecido, sirviendo como base para los esfuerzos de mapeo de la posición del supuesto dominio de chaperona (Ortega-Roldan et al. 2013). Un tercer modelo surgió, el cual es similar al anterior, solamente que este modelo propone que los extremos amino y carboxilo se encuentran en el lumen del retículo, (Hayashi & Su 2007).

La cristalización de Sig-1R mostró que a diferencia de los modelos anteriores, el receptor posee un solo dominio transmembranal, el cual corresponde al amino terminal que abarca de los residuos 8 a 32 (Schmidt, et al; 2016). El resto del receptor es una estructura de dominio simple, con el sitio de unión a ligando localizado en el centro del carboxilo terminal. Este estudio cristalográfico se realizó con Sig- 1R unido a dos ligandos químicamente distintos: PD144418, un antagonista selectivo de alta afinidad (Lever et al., 2014; Akunne et al., 1997) y 4-IBP, otro ligando de alta afinidad (John et al., 1994). En la estructura cristalográfica se observó que el receptor existe en un arreglo de homotrímero, con cada monómero formando un triángulo

plano, con un dominio transmembranal en cada esquina (perteneciente a cada monómero), mientras que el carboxilo terminal, altamente hidrofóbico, se encuentra insertado en la membrana. El carboxilo terminal es la parte más grande de la proteína ya que forma un conglomerado por las estructuras de  $\beta$ -barril, las cuales constituyen el sitio de unión a ligando, y corresponde al dominio citosólico abarcando del residuo 33 al 223 (Schmidt, et al; 2016)



**Figura 5. Estructura general de Sigma1:** Sig-1R está constituido por tres monómeros, formando una estructura triangular con una sola hélice transmembrana en cada esquina. El carboxilo terminal constituye la mayor parte de la proteína y de acuerdo con la estructura cristalográfica se localiza expuesta hacia el citoplásmica. (a) La estructura muestra la vista paralela al plano de la membrana. (b) La arquitectura triangular del receptor es aparente cuando se ve a través del plano de la membrana frente al citosol (Modificado de Schmidt, et al; 2016).

Recientemente, se propuso un nuevo modelo de acuerdo con evidencias experimentales obtenidas por medio de microscopia electrónica; este modelo también muestra a Sig-1R como un homotrímero en el cual el carboxilo terminal se encuentra hacia el lado del lumen, mientras que gran parte del amino terminal se encuentra embebido en la membrana y una pequeña proporción se encuentra en el citosol (Mavylutov T, et al, 2018).

En la estructura del receptor Sig-1R es importante destacar que el carboxilo terminal se encuentran diversos sitios para la interacción de diferentes ligandos. Esto se ha demostrado por medio de experimentos de mutagénesis sitio dirigida y ensayos de unión a radioligando, identificando a los residuos ácido aspártico 126 (D126) y ácido glutámico 172 (E172) como aminoácidos relevantes para la

interacción con ligandos como el haloperidol, ya que la mutación de estos residuos ocasiona una pérdida de la actividad de unión al ligando (Seth et al., 2001).

Interesantemente, Sig-1R presenta afinidad a una gran variedad de fármacos psicotrópicos y de hormonas esteroideas como la progesterona (Hayashi & Su, 2003); particularmente el hallazgo sobre la progesterona planteó por primera vez la posibilidad de que algunos esteroides funcionan como supuestos ligandos endógenos de Sig-1R (Maurice T, et al., 1988).

La interacción de estos esteroides ocurre por medio de dos sitios de unión a esteroides (SBDL-I, SDBL-II) localizados en el carboxilo terminal de Sig-1R (Chen et al., 2007; Pal et al., 2007, 2008; Fontanilla et al., 2008). Estos sitios fueron identificados usando derivados del compuesto fenpropimorf, un inhibidor de la síntesis de esteroides en levadura que muestra también una alta afinidad por Sig-1R, estos derivados marcan de forma selectiva los aminoácidos 91–109 y 176–194, indicando sitios potenciales de unión para compuestos del tipo esteroideo en Sig-1R (Pal et al., 2007). Estos datos propusieron un modelo en el que el SBDL-I y el SBDL-II se yuxtaponen para formar un sitio de unión en Sig-1R (Pal et al., 2008).

Otra característica importante de Sig-1R es que posee secuencias de aminoácidos similares al motivo de unión al colesterol del receptor de benzodiazepina (L/V-X1-2-Y-X-1-5-K/R), es decir presenta dos motivos CRAC (cholesterol recognition amino acid Consensus sequence, por sus siglas en inglés) localizados en los residuos 171-175 y 199-208 (Palmer et al., 2007).

### **1.7 Interacción de Sig-1R con proteínas**

Diversos estudios han revelado que Sig-1R se encuentran mayoritariamente en los subdominios enriquecidos con colesterol de las membranas ER (es decir, MAM) (Hayashi & Su, 2003b; Hayashi & Su, 2004b). En este sitio Sig-1R interacciona y estabiliza al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3R), y permite modular el calcio

intracelular para liberarlo del retículo (Hayashi, et al. 2015). Otra de sus funciones es encargarse del correcto plegamiento de proteínas (Soriani, O. et al.,1999); una característica de esta chaperona es que su localización subcelular y función puede regularse por diversos ligandos sintéticos y de producción endógena, por ejemplo, esteroides, antipsicóticos, antihistamínicos, antidepresivos, entre otros (McCann, D.J. et al., 1994, Gray, N.M. et al., 1990, Narita, N. et al.,1996), resultando en cambios en la estabilidad, tráfico y/o expresión de sus proteínas blanco, como por ejemplo algunos canales de potasio, calcio, sodio y receptores de NMDA.

Con respecto a esta regulación de canales iónicos se ha reportado una estrecha relación entre Sig-1R y la proteína hERG, un canal de potasio cardíaco también expresado de manera anormal en muchos cánceres humanos primarios (Pillozzi S et al., 2011). Los ligandos de Sig-1R y el silenciamiento de este receptor en células de leucemia mieloide K562, inhibieron la maduración de canales hERG, su abundancia en la membrana plasmática y por lo tanto las densidades de corriente producidas a través de estos canales también disminuyeron, todo ello sin afectar la tasa transcripcional de hERG (Crottes et al., 2011). Como consecuencia directa de estos efectos, se observó una disminución en la adhesión celular a la fibronectina en células K562. Ensayos realizados en células de riñón embrionario humano (HEK293) que expresan hERG y Sig-1R muestran que ambas proteínas co-inmunoprecipitan, demostrándose la formación de un complejo proteico (Crottes et al., 2011).

Estos datos correlacionan con datos obtenidos por medio de microscopía de fuerza atómica, que muestran la unión directa de Sig-1R a monómeros, dímeros y tetrámeros de la proteína hERG (Balasuriya et al., 2014). Al parecer la interacción de estas proteínas es importante para la estabilidad y maduración del canal hERG y es susceptible de ser regulada por medio de los ligandos de Sig-1R.

Dentro de los blancos moleculares de Sig-1R también se encuentran canales de calcio tipo N. Ambas proteínas se expresan en interneuronas colinérgicas (ChIs) del estriado de rata. Estas células al ser tratadas con agonistas de Sig-1R (SKF-10047) mostraron inhibición de las corrientes de  $Ca^{2+}$  de tipo N, efecto que fue abolido mediante el uso de un antagonista de Sig-1R, BD-1063 (Zhang et al., 2017).

La expresión heteróloga de Sig-1R y los canales de calcio de tipo N en ovocitos de *Xenopus*, dio como resultado una disminución de la amplitud de la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo N en acorde al incremento en la expresión de Sig-1R. Además, un agonista de estos receptores como el SKF-10047 suprimió aún más las corrientes de  $Ca^{2+}$  de tipo N registradas en los ovocitos (Zhang et al., 2017). También para estos canales se ha demostrado la interacción con Sig-1R y se postula que esta interacción produce un cambio conformacional en estos canales que disminuye su funcionalidad. (Zhang et al., 2017).

De manera similar se ha demostrado en cultivos primarios de células ganglionares de retina de rata que los canales de calcio tipo L son inhibidos por el agonista de Sig-1, SKF10047, efecto revertido por BD1047 (antagonista de Sig-1R) y los ensayos de co-inmunoprecipitación también demostraron una asociación entre estos canales y Sig-1R (Tchedre et al., 2008).

La interacción de Sig-1R con algunos canales de calcio dependientes de voltaje y la regulación negativa de este tipo de canales por medio de agonistas de Sig-1R, puede estar estrechamente relacionada con efectos neuroprotectores que regulan la entrada de calcio por medio de este tipo de canales.

### **1.8 Sig-1R y dolor**

La participación de Sig-1R en el dolor se ha reportado recientemente (Bangaru *et al.*, 2013; Bae *et al.*, 2001; Entrena *et al.*, 2009; Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los antagonistas de Sig-1R son capaces de disminuir el dolor y acentuar el efecto analgésico de otras drogas (Gris *et al.*, 2016; Kwon *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2012). Por otro lado, los agonistas tienen el efecto contrario, es decir atenúan el efecto de la analgesia y generan dolor por vía de los receptores de NMDA (XiaoFei *et al.*, 2012; Zamanillo *et al.*, 2013; Pabba *et al.*, 2014).

Sig-1R se expresa altamente en diferentes áreas del SNC y la periferia, en particular los ganglios de la raíz dorsal (DRG), e interactúa y modula la funcionalidad de diferentes receptores y canales iónicos. En consecuencia, los efectos antinociceptivos de los antagonistas de Sig-1R que actúan solos y en combinación



con otros analgésicos actúan en sitios centrales y periféricos (Romero L, 2016). A nivel central, los hallazgos conductuales, electrofisiológicos, neuroquímicos y moleculares apoyan el papel de los antagonistas Sig-1R en la inhibición de la excitabilidad aumentada secundaria a la entrada aferente sostenida (Castany et al., 2018). Además, la participación de Sig-1R en los mecanismos que regulan el dolor en la periferia se ha confirmado recientemente (Romero L, 2016). A diferencia de los opioides, los antagonistas Sig-1R no modifican los umbrales de sensibilidad térmica y mecánica sensorial normales, sino que ejercen efectos de antihipersensibilidad en condiciones de sensibilización, lo que permite la reversión de los umbrales nociceptivos a valores normales (Merlos M, et al., 2017). Estas son características distintivas que permiten que los antagonistas Sig-1R ejerzan un efecto modulador específicamente en condiciones fisiopatológicas como el dolor crónico (Merlos M, et al., 2017).

Se ha reportado que agonistas de Sig-1R producen un efecto nociceptivo en pruebas con formalina, que está asociada con la fosforilación de la subunidad 1 del receptor NMDA (pNR1). Además, se ha observado que al aplicar agonistas del Sig-1R estos provocan un incremento de dolor agudo inducido por NMDA. La fosforilación del receptor NMDA en la sensibilización central de las neuronas que participan de la vía del dolor, sugiere que Sig-1R es el responsable del proceso de sensibilización central a través de la modulación de los receptores NMDA (Uitenius C, et.al 2006).

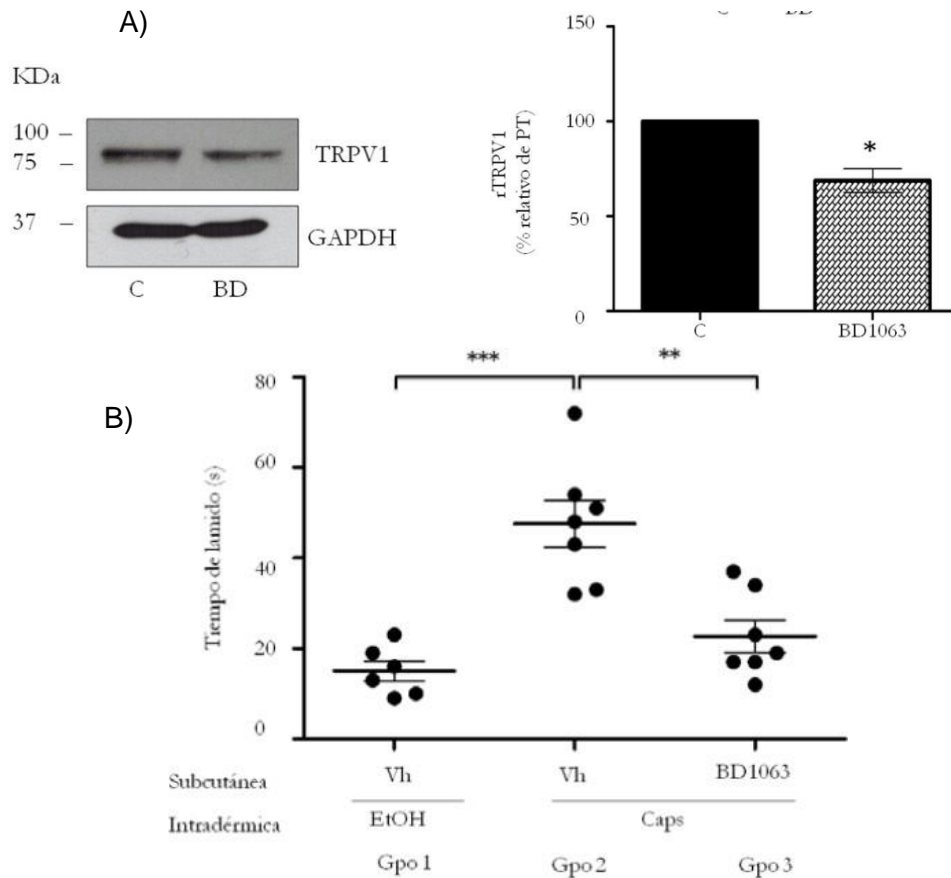
El papel modulador de Sig-1R en la nocicepción también están basado en los hallazgos encontrados en los ratones modificados genéticamente que no expresan Sig-1R (Sig-1R<sup>-/-</sup>). Estos ratones presentan resistencia a la hipersensibilidad mecánica inducida por la aplicación de capsaicina mientras que los ratones silvestres si muestran sensibilidad mecánica por efecto de la capsaicina (Entrena, J.M et.al 2009). Además, los ratones de fenotipo silvestre tratados con los antagonistas de Sigma 1 receptor (BD1047, BD1063 y NE-100) presentaron una respuesta similar a los ratones Sig-1R<sup>-/-</sup>, es decir, una resistencia a la hipersensibilidad mecánica.

También se ha observado en un modelo de ratas con migraña inducida por capsaicina que el pretratamiento de las ratas con el antagonista de Sig-1R, BD1047 disminuye el dolor conforme la concentración de este compuesto aumenta (10, 30 y 100nM) (Kwon, Y et.al; 2009).

Estos datos sugieren una posible asociación entre Sig-1R y el canal TRPV1, que no habían sido explorados. Por lo tanto, el presente trabajo establece las bases moleculares de la relación de los efectos de Sig-1R con el canal TRPV1.

## **2. Antecedentes directos**

Para entender el mecanismo molecular que regula el dolor mediado por el canal TRPV1 a través de antagonistas del Sig-1R, previamente nosotros demostramos una reducción de los niveles del canal TRPV1 en extractos proteicos totales obtenidos de ganglios de la raíz dorsal de ratones tratados con el compuesto BD1063, un antagonista sintético de Sig-1R (Juárez R, 2016) (Fig. 6A). De manera conjunta, también se demostró que los animales inyectados con BD1063 muestran un aumento en el umbral al dolor agudo inducido por la activación del canal TRPV1 en comparación de los animales control inyectados sólo con solución salina (Juárez R, 2016) (Fig. 6B).



**Figura 6. El antagonista de Sig-1R BD1063, disminuye la cantidad de canales TRPV1 y la respuesta de dolor asociada a la activación de este canal.** A) WB representativo que muestra la señal para el canal TRPV1 de proteína total de DRG provenientes de animales control y tratados con BD1063, el panel inferior corresponde al control de carga (GAPDH). El tratamiento con BD1063 disminuye la cantidad de canales TRPV1, de acuerdo al análisis densitométrico (El grupo tratado con BD1063 muestra una reducción del 30% ± 6 con respecto al grupo control B) Gráfica que muestra la respuesta de dolor agudo de ratones inyectados intradérmicamente con capsaicina, respuesta reflejada como el tiempo de lamido acumulado. El grupo control fueron animales inyectados con solución salina subcutáneamente en el lomo y 24 h después inyectados intradérmicamente en la extremidad delantera derecha con solución salina (15±2 s, grupo 1). 24 h previas a la aplicación intradérmica de capsaicina en la extremidad delantera, el grupo 2 fue administrado subcutáneamente en la región lumbar con solución salina y el grupo 3 con BD1063 (32 mg/kg). La gráfica muestra que el grupo 2 presentó una clara respuesta de dolor por efecto de la capsaicina (47±5 s) mientras que el grupo 3 mostró una menor respuesta de dolor (22±3 s) (Tomado de Juárez, R 2016).

Estos resultados fueron las primeras evidencias para establecer el mecanismo molecular que participa en la modulación del dolor asociado al canal TRPV1 por efecto de los antagonistas del Sig-1R y constituyen los antecedentes directos para este trabajo.

### **3. Hipótesis:**

La progesterona (P4), antagonista endógeno de Sig-1R, disminuye los niveles de proteína TRPV1 y el dolor asociado a este canal.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo General:**

Determinar si la progesterona (P4) a través del Sig-1R regula los niveles proteicos de TRPV1.

#### **4.2 Objetivos Particulares:**

4.2.1.- Realizar experimentos de knockdown de Sig-1R y determinar los efectos sobre el canal TRPV1.

4.2.2.- Analizar si un antagonista endógeno de Sig-1R (Progesterona, P4) afecta los niveles proteicos de TRPV1 de manera independiente a los receptores clásicos de este esteroide.

4.2.3.- Determinar si el aumento de P4 en ratones gestantes modifica el umbral de dolor a capsaicina.

4.2.4.- Identificar una posible co-localización entre Sig-1R y TRPV1 (HEK 293 y neuronas DRG)

4.2.5.- Determinar la interacción entre Sig-1R y TRPV1 y si antagonistas de Sig-1R afectan a este complejo proteico.

4.2.6.- Elucidar la región importante de TRPV1 que permite la interacción con Sig-1R.

4.2.7.- Identificar si Sig-1R co-localiza con otro miembro de la familia de los canales TRPs (TRPA1).

## **5. Metodología:**

### **5.1 Cultivo celular**

Para obtener una adecuada expresión de las distintas proteínas, se utilizó la línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) de tipo adherente, la cual sirve como sistema de expresión heterólogo. Las células se cultivaron en DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10,000 unidades de penicilina y 10 mg/ml de estreptomycin a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Cada pasaje se realizó a partir de la adición de solución de tripsina EDTA 0.05% (Invitrogen) con la que se disoció la monocapa de células, la reacción enzimática se bloqueó al agregar el mismo volumen de medio de cultivo y se centrifugó a 1500rpm durante 5 min. El sobrenadante se retiró y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo y se realizaron diluciones para obtener cultivos subconfluentes de alrededor del 50% respecto al original.

### **5.2 Transfección**

Con el objetivo de asegurar la expresión transitoria del canal TRPV1, TRPA1 y de Sig-1R-GFP en el cultivo celular de HEK293 se realizaron transfecciones, para ello se utilizó el agente policatiónico (Jet-Pei®) que permite la internalización del DNA a la célula, al ser policatiónico, el agente Jet-Pei® atrae las moléculas negativamente cargadas del DNA, generando un complejo que interacciona con proteoglicanos de la membrana celular promoviendo su endocitosis. La Tabla 1 muestra todas las condiciones de transfección realizada para cada ensayo.

Ensayos de Co-inmunoprecipitación	
Compuesto (mezcla 1)	Caja P100
pcDNA3.1-TRPV1	1µg
pcDNA3.1-Sig-1R-GFP	2 µg
NaCl 150 mM	500 µl
Compuesto (mezcla 2)	Caja P100
JetPei	5 µl
NaCl 150 mM	495 µl

Ensayos de Co-inmunoprecipitación de Delecciones de TRPV1	
Compuesto (mezcla 1)	Caja P100
pcDNA3.1-TRPV1 ΔCOOH	1µg
pcDNA3.1-TRPV1 ΔNH <sub>2</sub>	1µg
pcDNA3.1-TRPV1 ΔTM 1-6	1µg
pcDNA3.1-Sig-1R-GFP	2 µg
NaCl 150 mM	500 µl
Compuesto (mezcla 2)	Caja P100
JetPei	5 µl
NaCl 150 mM	495 µl
Ensayos de Fluorescencias	
Compuesto (Mezcla 1)	Volumen (Por pozo)
pcDNA3.1-Sig-1R-GFP	500ng
pcDNA3.1-rTRPV1-Cherry	500ng
NaCl 150 mM	100 µl
Compuesto (mezcla 2)	Volumen (Por pozo)
JetPei	3 µl
NaCl 150 mM	100 µl
Ensayos de Inmunofluorescencias	
Compuesto (Mezcla 1)	Volumen (Por pozo)
pcDNA3.1 hTRPA1	1µg
pcDNA3.1-Sig-1R-GFP	500ng
NaCl 150 mM	100 µl
Compuesto (mezcla 2)	Volumen (Por pozo)
JetPei	3 µl
NaCl 150 mM	100 µl
Ensayos de siRNA Sig-1R	
Compuesto (Mezcla 1)	Volumen (Por pozo)
pcDNA3.1-rTRPV1	50ng
siRNA Sig-1R	75 pmol
NaCl 150 mM	100 µl
Compuesto (mezcla 2)	Volumen (Por pozo)
JetPei	3 µl
NaCl 150 mM	100 µl

**Tabla 1.** Mezclas de reacciones para las distintas transfecciones.

### **5.3 Extracción de DRG**

En este procedimiento primero se decapita al ratón lo más cercano al cráneo, una vez decapitado se baña perfectamente el cuerpo con etanol y se coloca en una base de unicel boca abajo estirando cada extremidad y asegurando con una aguja. Después se expone la columna hacia arriba y se corta la piel desde la base del cuello hasta la base de la cola. De cada mitad de piel se corta el tejido conectivo y se pliega la piel sobre los costados sobre los cuales se coloca papel con etanol para evitar que el área expuesta se llene de pelo. Se retira el exceso de grasa y tejido muscular que tenga sobre y cerca de la columna vertebral, esto con el fin de acceder a la misma con facilidad. Ya limpia el área de trabajo, se corta a lo largo toda la columna en un ángulo de 90° y posteriormente se hacen dos cortes a 0° y se retiran los restos de la columna. Con las pinzas se quita la médula esto con el fin de que el canal de la columna quede limpio y se espongan los ganglios. Una vez extraídos los ganglios se colocan en una caja Petri con DMEM sin Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup>. Estos ganglios posteriormente se lavaron con 1.5 ml de DMEM. Los ganglios se resuspendieron en una solución de colagenasa tipo II/tripsina en DMEM (4 y 1.25 mg/ml, respectivamente) y se incubaron durante 15 min en un baño de agua a 37°C. Luego, los ganglios se centrifugaron durante 1 minuto a 1200rpm (1464xG) para formar un botón celular, tras lo cual se eliminó la solución de colagenasa/tripsina. Finalmente, la suspensión celular se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo precalentado a 37°C (DMEM con 10% de SFB y penicilina/estreptomicina) y se cultivó en placas de 35 mm. Las células se incubaron a 37 ° C con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Dos horas después de la siembra, se agrega medio fresco con 100 ng/mL de factor de crecimiento nervioso (NGF).

#### **5.4 Fluorescencia y microscopía confocal.**

Se cultivaron células HEK293 en cubreobjetos tratados con poli-D lisina (1mg/ml) y se transfectaron transitoriamente con rTRPV1-mCherry, Sig-1R-GFP o con hTRPA1 y Sig-1R-GFP.

Para la tinción de la membrana plasmática, las células se incubaron durante 5 min con CellMask Deep Red a 37°C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific). CellMask Deep Red son moléculas anfipáticas que proporcionan un ambiente lipófilo para un alto reparto en la membrana y un tinte hidrófilo con carga negativa para el "anclaje" de la sonda intercalándose en la membrana plasmática.

Para el análisis microscópico, después de 48 h de transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 10 min, se lavaron con PBS 1X y se montaron en portaobjetos con VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc.).

En el caso del marcaje para el Retículo Endoplásmico, se realizó la inmunocitoquímica de Calnexina; para ello se transfectaron las células con rTRPV1-mCherry y Sig-1R-GFP, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 15 min, se lavaron con PBS 1X, después las células fueron permeabilizadas (Triton X-100 al 0,2% en PBS), y bloqueadas (2.5% FBS y 1% gelatina, todo en PBS). La primera incubación se realizó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-calnexina (H70; Santa Cruz Biotechnologies) a 4°C toda la noche. Después las células recibieron tres lavados con PBS 1X y por último se incubaron con anticuerpo IgG anti-conejo acoplado a Cy5 (Thermo Fisher Scientific) por una hora a 4°C y se montaron en portaobjetos de microscopio con VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc.) para el análisis de inmunofluorescencia confocal.

Las células co-transfectadas con Sig-1R-GFP y hTRPA1 se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 15 min, se lavaron con PBS 1X, y se bloquearon durante 30 min (2.5% FBS y 1% gelatina, todos en PBS). Las células fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo anti-TRPA1 de conejo (Alomone ACC-037) diluido 1:50 en BSA al 3 %.



Finalmente, las células fueron lavadas tres veces con PBS 1X e incubadas por 1 hora con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa594 (dilución 1:500 en BSA 3%). Después de tres lavados exhaustivos con PBS 1X, las células se montaron en portaobjetos con VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc.), para su visualización por microscopia confocal.

Para experimentos de inmunocitoquímica con cultivos primarios de neuronas DRG, las células fueron fijadas con PFA al 4% en PBS, permeabilizadas (Triton X-100 al 0,2% en PBS, 2 min), y bloqueadas (2.5% FBS y 1% gelatina, todos en PBS, 30 min). Para la inmunodetección de TRPV1, las neuronas DRG se incubaron secuencialmente con anticuerpo antiTRPV1 de cabra (P19; Biotecnología de Santa Cruz) y un IgG anticuerpo secundario anti-cabra de pollo acoplado a Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las células fueron incubadas con el anticuerpo de conejo anti-Sig-1R (NBP1-82479; Novus Biologicals) y el anticuerpo secundario IgG de pollo anti-conejo Alexa Fluor 594. Los anticuerpos primarios se diluyeron en BSA al 3% (1: 100) y se incubaron toda la noche a 4 ° C. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó durante 1 h en diluciones de 1: 500 (BSA al 3%, PBS) a 4°C. En el caso de TRPA1 se utilizó el anticuerpo de conejo Anti-TRPA1 conejo (Alomone ACC-037) diluido 1:50 en BSA al 3 % y y se incubó toda la noche a 4°C, mientras que el anticuerpo secundario corresponde al anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor 594 incubado 1:500 por 1h a 4°C. Para el Sig-1R se utilizó el anticuerpo anti-Sig-1R de cabra diluido 1:100 en BSA al 3 % incubado a a 4°C toda la noche y Alexa Fluor 488 secundario anti-cabra diluido 1:500 incubado por 1h a 4°C.

La visualización de las células se llevó a cabo utilizando un microscopio de barrido láser confocal (LSM710 Zeiss) empleando un objetivo de inmersión en agua W Plan-Apochromat 63 x (NA 1.0). Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ.

### **5.5 Ensayos de Co-inmunoprecipitación.**

La co-inmunoprecipitación generalmente se utiliza para el análisis de las interacciones entre proteínas. La inmunoprecipitación se realiza mediante el uso de un anticuerpo específico, así, aquellas proteínas que se encuentran asociadas al blanco inmunoprecipitado se pueden identificar posteriormente mediante ensayos de Western blot. En este caso nos permitiría observar una posible interacción entre TRPV1 y Sig-1R.

Los 100  $\mu$ l de PGA (Perlas de agarosa con la proteína G acoplada) fueron lavadas 3 veces con 1 ml de amortiguador de lisis 1X (tabla 2, sin complete), centrifugando entre cada lavado a 7500 rpm durante 3 min. Posteriormente, la PGA se incubó 2 hr a 4°C con 1ml de amortiguador de lisis 1X adicionado con 2% de BSA (paso de pre-equilibración de las perlas). Finalmente, la PGA fue lavada dos veces y resuspendida en 100  $\mu$ l de amortiguador de lisis con 1X, quedando ya lista para agregar a cada uno de los inmunoprecipitados.

Pasadas 48 h de transfección, las células se lisaron para aislar la proteína total a utilizar en cada inmunoprecipitado; esta proteína fue pre-clarificada por 2 h a 4°C con 50 $\mu$ l de la PGA pre-equilibrada (este paso permite eliminar el fondo que es generado por interacciones de aquellas proteínas que muestran cierta afinidad a la PGA), el pre-clarificado se centrifugó por 3 min a 7500 rpm y se recuperó el sobrenadante. Los lisados pre-clarificados se incubaron con 2  $\mu$ g de conejo anti-TRPV1 (VR1 ACC- 030; Alomone Laboratories) y anticuerpos de cabra anti-Sig-1R (S-18; sc-22948; Santa Cruz Biotechnology) e IgG de conejo o de ratón como control irrelevante y se agitaron por 2 h a 4°C. Finalmente, se agregaron 20  $\mu$ L de PGA a las muestras y se incubaron durante la noche a 4°C.

La inmunodetección de las proteínas co-inmunoprecipitadas Sig-1R y TRPV1- $\Delta$ NH2 se llevó a cabo con un anti-Sig-1R de cabra (S-18; Santa Cruz Biotechnology). La proteína obtenida de las células que co-expresan Sig-1R-GFP y TRPV1- $\Delta$ COOH se co-inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo de cabra anti-TRPV1 que se dirige contra un epítotope localizado en el extremo N-terminal de TRPV1 (P-19; Santa Cruz Biotechnology). Mientras que la proteína Sig-1R-GFP co- inmunoprecipitada

se detectó con el anticuerpo anti-Sig-1R de conejo (NBP1- 82479; Novus Biologicals). Los ensayos de co-inmunoprecipitación para las interacciones entre Sig-1R y los dominios transmembranales (TM1–6) de TRPV1 se llevaron a cabo con un anticuerpo de conejo anti-TRPV1 dirigido contra un epítipo extracelular del canal (ACC-029; Alomone Laboratories), y el anticuerpo de cabra anti Sig-1R, (S-18; Biotecnología Santa Cruz) se utilizó para detectar al Sig-1R-GFP inmunoprecipitado.

Los complejos inmunoprecipitados se lavaron tres veces con 1 ml de amortiguador de lisis 1X y se agitaron durante 10 min en hielo y dos veces durante 5 min con 1 ml de PBS. Las muestras se calentaron durante 5 min en 50 µl con amortiguador Laemmli 1X a 95 °C. Las proteínas fueron analizadas por Western blot.

### **5.6 Lisis celular.**

Las células fueron cosechadas en PBS y centrifugadas a 1600 rpm por 3 min. El botón celular obtenido se homogeneizó en 100µl de amortiguador de lisis 1x (Tabla 3). Por último, cada muestra se centrifugó a 13,500rpm durante 3 min y se recolectó el sobrenadante, el cual contiene las proteínas totales solubilizadas.

Amortiguador de lisis		
Compuesto	Concentración 5X	Concentración 1X
Tris Cl pH 8	250mM	50mM
NaCl 5M	750mM	150mM
Triton	5%	1%

**Tabla 2.** Composición de amortiguador de lisis 5X

Amortiguador de lisis 1 X	
Componente	Volumen
Amortiguador de lisis 5x	200µl
Complete 25x (1X final)	40µl
NaF 100mM (2.5mM final)	25µl
H2O	735µ

**Tabla 3.** Composición de amortiguador de lisis 1X

### **5.7 Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de las proteínas se usó el método del ácido bicinconínico (BCA). El BCA es una sal sódica estable en agua capaz de formar un complejo con iones cuprosos ( $\text{Cu}^{1+}$ ) que en un ambiente alcalino reacciona con las proteínas presentes con lo que forma iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (reacción de Biuret) lo que genera una coloración morada (Smith, *et al.*, 1985). Se preparó una solución de trabajo con 9 ml de ácido bicinconínico (B964350 Sigma-aldrich) 180  $\mu\text{l}$  de  $\text{CuSO}_4$  al 4%. Se realizó una curva de diferentes concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) (Tabla 4), así 10  $\mu\text{l}$  correspondiente a cada concentración conocida de BSA y de muestra problema fueron cargadas por duplicado a pozos de una caja de ensayo tipo ELISA, y 160  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo por pozo. Se realizó una incubación por 30 min a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente se leyeron las absorbancias de cada muestra a una longitud de onda de 562nm por medio del lector ELx808 Bio Tek.

Concentración	Volumen
2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Stock de Albúmina Sérica Bovina BSA
1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	45 $\mu\text{l}$ del Stock de BSA + 30 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$
1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$ de 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA + 30 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$
0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$ de 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA + 30 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$
0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$ de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA + 30 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$
0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$ de 0.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA + 30 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$

**Tabla 4.** Curva patrón de BSA

### **5.8 Inmunodetección de proteínas en fase sólida (Western blot).**

Los 20 µg de proteína total fueron mezclados con amortiguador Laemmli 6X (Tabla 5) y llevados a un volumen final máximo de 48 µl con agua. La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 10% (sistema SDS-PAGE, Tabla 6), los cuales se corrieron por 2 h con una corriente constante de 20 mA por cada gel a un voltaje máximo en amortiguador de corrida 1X (Tabla 7) y posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P; Merck Millipore) mediante el uso del sistema de transferencia Hoefer Semi-Dry, las condiciones fueron 220 mA por 2 h. Las membranas se bloquearon con leche en polvo libre de grasa al 6% en PBS-T (PBS con 0.1% de Tween-20) y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario específico para la inmunodetección de la proteína de interés.

Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-T e incubadas con el anticuerpo 2° acoplado a peroxidasa de rábano. Las proteínas se detectaron utilizando un sustrato quimioluminiscente (ECL; Amersham Pharmacia). Las placas se digitalizaron y procesaron con el programa ImageJ, mismo que sirvió calcular el valor del área de bajo de la curva para cada señal. Finalmente se realizó normalización de la señal de TRPV1 respecto a los niveles de GAPDH, como control de carga. En las tablas 8-10 se enlistan cada uno de los anticuerpos utilizados para la realización de los experimentos de co-inmunoprecipitación y de western blot.

Componente	Concentración
4xTrisCl/SDS, pH 6.8	0.35 M
Glicerol	30 %
SDS	10 %
DTT	0.6 M
Azul de bromofenol	0.012 %

**Tabla 5.** Preparación de Amortiguador de carga 6X (al mezclar con muestra problema y llevar al volumen final deseado la concentración de cada uno de los componentes resulta ser 1X)

Gel Separador 10%	
Solución	Volumen utilizado
30% acrilamida/ 0.8% bis acrilamida	7.5 mL
4X TrisCl/SDS, pH 8.8	5.625 mL
H <sub>2</sub> O	9.375 mL
10% (w/v) persulfato de amonio	75 µL
TEMED†	30 µL
Gel concentrador	
Solución stock	Volumen utilizado
30% acrilamida/ 0.8% bis acrilamida	1.3 mL
4X TrisCl/SDS, pH 6.8	2.5 mL
H <sub>2</sub> O	6.1 mL
10% (w/v) persulfato de amonio	50 µL
TEMED	20 µL

**Tabla 6.** Preparación de mezclas para geles de poliacrilamida (Mezcla para 2 geles)

Componente	Concentración final
Tris base	0.125 M
Glicina	0.96 M
SDS	0.5 %

**Tabla 7.** Preparación de Amortiguador de corrida 5X (1X para la corrida)

Proteína	Anticuerpo	Peso (KDa)	Dilución	Condiciones	Marca	Epítotope
TRPV1	Policlonal de Cabra	95	1:1000 en leche al 3% con PBS-T	Incubar toda la noche a 4°C	Santa Cruz P19	N-terminal
Receptor Sigma 1 (SIG-1R)	Policlonal de Cabra	26	1:1000 en leche al 3% con PBS-T	Incubar toda la noche a 4°C	Santa Cruz S18	C-terminal (residuos 140-200)
SIG-1R	Policlonal de Conejo	26	1:1000 en leche al 3% con PBS-T	Incubar toda la noche a 4°C	NBP1-82479; Novus Biologicals	N-Terminal
GAPDH	Monoclonal de Conejo	36	1:5000 en PBS-T	Incubar toda la noche a 4°C	Cell signaling 14C10	C-terminal

**Tabla 8** Anticuerpos primarios

Proteína	Anticuerpo	Epitope
TRPV1	Policlonal de Conejo (Alomone Labs ACC-030)	C-Terminal
TRPV1	Policlonal de Cabra (Santa Cruz, P19)	N-terminal
TRPV1	Policlonal de Conejo (Alomone Labs ACC-029)	Epitope extracelular
GFP	Policlonal de conejo (Sigma-Aldrich G1544)	N-terminal

**Tabla 9** Anticuerpos Primarios para ensayos de co-inmunoprecipitación

Inmunoglobulina	Dilución	Condición en amortiguador	Condiciones de incubación	Marca
Anti Cabra-HRP	1:5000	Leche al 3% en PBS-T	1 hr a temperatura ambiente	Santa Cruz
Anti Conejo-HRP	1:7500	Leche al 3% en PBS-T	1 hr a temperatura ambiente	GE Healthcare life Sciences
Anti Ratón-HRP	1:5000	En PBS-T	1 hr a temperatura ambiente	GE Healthcare life Sciences

**Tabla 10** Anticuerpos secundarios

### **5.9 Ensayos de conducta de dolor**

Estos ensayos de conducta de dolor consisten en aplicar intradérmicamente en la extremidad de un animal una solución que contiene un agente químico que causa dolor, y evaluar el tiempo acumulado de lamido de la extremidad afectada durante 10 min. Los experimentos se realizaron utilizando ratones hembra embarazadas (15 días de gestación) y hembras no embarazadas de la cepa C57BL/6J.

Los ratones se colocaron en cajas individuales 1 h antes del experimento, esto con el fin de lograr la adaptación a las condiciones experimentales. Se preparó una solución de 20 µg/µL de capsaicina en etanol, de la cual se realizó una dilución de 0.28 µg/µL de capsaicina en solución salina. Adicionalmente se preparó una solución control, que consiste en una mezcla de etanol al 1.4% (vehículo de la capsaicina) en solución salina.

Los animales fueron inyectados en su extremidad delantera derecha con 10 µL de la solución de capsaicina diluida 0.28 µg/µL o con 10 µL de la solución control. La inyección se realizó mediante el uso de jeringas para insulina (31G x 6mm). El comportamiento de lamido de pata, como reflejo de dolor agudo, se midió como el tiempo acumulado de lamido durante 10 min.



### **5.10 Tratamientos con siRNA**

Las células se co-transfectaron con 50 ng de plásmido pcDNA3.1/rTRPV1 y 75 pmol de siRNA específico para Sig-1R (SASI\_Hs01\_00189688 prediseñado) o con un siRNA sin especificidad (scramble) como control negativo (siRNA Control Negativo Universal # 1; Sigma- Aldrich). A las 48 h después de la transfección, las células se cosecharon para el aislamiento y cuantificación de proteínas y posteriormente analizar por WB la eficiencia de disminución en la expresión de Sig- 1R.

### **5.11 Tratamientos con P4 y RU**

Los tratamientos con P4, P4+BSA y RU (antagonista de los receptores nucleares de progesterona A y B) fueron hechos a una concentración de 25µM por 24hrs en células HEK293 transfectadas con rTRPV1. Finalmente, las células se lisaron para obtener proteína total para su análisis por Western blot para la inmunodetección de la proteína TRPV1.

### **5.12 RT-PCR**

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se aisló el RNA total con TRIzol (Invitrogen) de DRG's y de células HEK293. El RT-PCR se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando 2.5 µg de RNA total, 100 ng de random primers y 200 U de SuperScript III (Invitrogen). La PCR se llevó a cabo con 5 µL de DNAc, 30 pmol de cada primer y 2.5 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguida de 30 ciclos de reacción, luego una etapa de desnaturalización a 95°C durante 30 s, alineación durante 30 s y por último elongación durante 45 s a 72°C. Los pares de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento utilizadas para la amplificación de cada blanco están especificados en la tabla 11.

mRNA blanco/Número de acceso en el GenBank	Secuencia del primer	Tamaño (PB)	Temperatura de alineamiento
<p><b>Receptores de progesterona</b></p> <p>Receptor de Progesterona <i>Homo sapiens</i> (PGR) variante 2, NM_000926</p> <p>Receptor de progesterona <i>Homo sapiens</i> (PGR) variante 1. NM_001202474</p> <p>Receptor de Progesterona <i>Mus musculus</i> (Pgr), NM_008829</p>	<p>Sentido: 5'-CTGGAGTGCATCCTGTACAAA-3'</p> <p>Antisentido: 5'-TACAGCTCCCACAGGTAAGGA-3'</p>	369-371	60°C
<p><b>Receptores de Progestina y adiponectina Q miembro de la familia 7</b></p> <p>Receptores Progestina de y adiponectina Q <i>Homo sapiens</i> miembro de la familia 7 (PAQR7 or mPR<math>\alpha</math>). NM_178422</p> <p>Receptores Progestina de y adiponectina Q <i>Mus musculus</i> miembro de la familia VII (Paqr7 or mPr<math>\alpha</math>), NM_027995</p>	<p>Sentido: 5'-TTCTGGAAGCCGTACATCTAT-3'</p> <p>Antisentido: 5'-GAAGAAGAAGCTGTAATGCCA-3'</p>	296-297	57°C
<p><b>Receptores de Progestina y adiponectina Q miembro de la familia 5</b></p> <p>Receptores Progestina de y adiponectina Q <i>Homo sapiens</i> miembro de la familia 5 (PAQR5 or mPR<math>\gamma</math>). NM_001104554</p> <p>Receptores Progestina de y adiponectina Q <i>Mus musculus</i> miembro de la familia V (PAQR5 or mPR<math>\gamma</math>), NM_028748</p>	<p>Sentido: 5'-TGAGACTCTCAACATTTGGAC-3'</p> <p>Antisentido: 5'-CAAGAAACCTGGAGTAGCAGG-3'</p>	380	55°C
<p><b>Receptores de Progestina y adiponectina Q miembro de la familia 9</b></p> <p>Receptores Progestina de y adiponectina Q <i>Homo sapiens</i> miembro de la familia 9 (PAQR9 or mPR<math>\epsilon</math>). NM_198504</p>	<p>Sentido: 5'-CCTTCTTCAACGTGAGCAAGA-3'</p> <p>Antisentido: 5'-AGGAACTTCCTGATTACCAGC-3'</p>	241	57°C

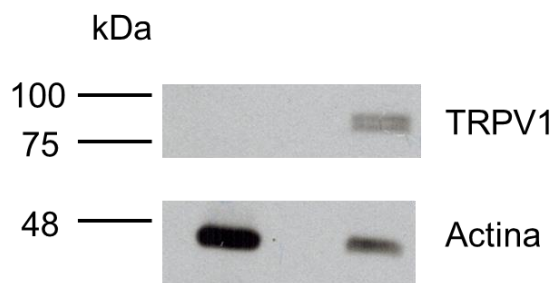
Receptores Progestina de y adiponectina Q Mus musculus miembro de la familia IX (Paqr9 o mPRε), NM_198414			
<p><b>Componente 1 de Receptores de progesterona de Membrana</b></p> <p>Componente 1 de Receptores de progesterona de Membrana de Homo sapiens (PGRMC1) variante 1 NM_006667</p> <p>Componente 1 de Receptores de progesterona de Membrana de Mus musculus (Pgrmc1) NM_016783</p>	<p>Sentido: 5'-ATACTCATGGCCATCAACGGC-3'</p> <p>Antisentido: 5'-CAGTTTGCCACGTGATGATA-3'</p>	246	56°C
<p><b>Componente 2 de Receptores de progesterona de Membrana</b></p> <p>Componente 2 de Receptores de progesterona de Membrana de Homo sapiens (PGRMC2) variante 1 NM_006320</p> <p>Componente 1 de Receptores de progesterona de Membrana de Mus musculus (Pgrmc2) NM_027558</p>	<p>Sentido: 5'-GGTCAATGGGAAAGTCTTCGA-3'</p> <p>Antisentido: 5'-GTCTGCCTACATAATCATATT-3'</p>	233-243	50°C

**Tabla 11** Secuencia de primer utilizados para determinar los receptores de progesterona vía RT-PCR

## **6. Resultados:**

### **6.1 Estandarización del anticuerpo policlonal de cabra para TRPV1.**

La estandarización del anticuerpo policlonal de TRPV1 obtenido de cabra (Santa Cruz (P19)) se realizó a partir de extractos proteicos de células HEK293 transfectadas con TRPV1 (100ng) y como control de especificidad se usaron extractos de células sin transfectar. El anticuerpo primario de TRPV1 (P-19) se diluyó a una concentración 1:1000 en leche al 3%. En la figura 7 se muestra la inmunodetección de TRPV1 como una banda a la altura de 95 kDa, obsérvese que en células sin expresión del canal TRPV1, la señal es nula (STF, carril izquierdo). La estandarización del anticuerpo de TRPV1 permitió la inmunodetección de la proteína en experimentos posteriores.

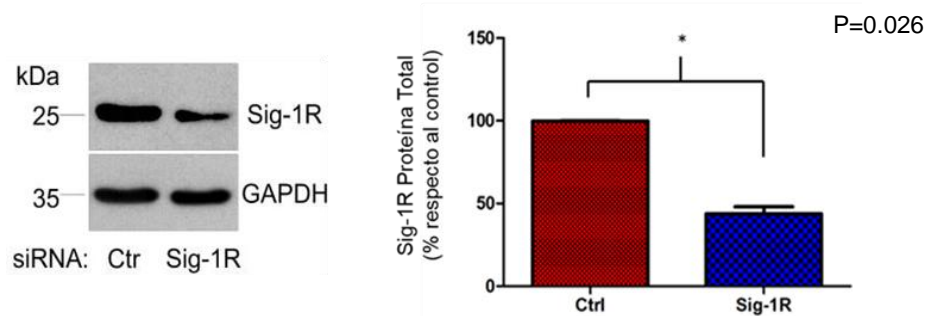


**Figura 7. Inmunodetección de TRPV1 en extractos proteicos totales.** En la parte superior izquierda se muestra la ausencia del canal rTRPV1 en las células sin transfectar, mientras que la parte superior derecha se muestra al canal rTRPV1 en las células transfectadas. En la parte inferior se muestra a actina como control de carga.

## **6.2 Alteraciones en la expresión del Sig-1R modifican los niveles proteicos del canal TRPV1.**

Previamente se había reportado que ratones transgénicos que carecen de la expresión del Sig-1R (Sig-1R<sup>-/-</sup>) muestran reducción en la hipersensibilidad mecánica inducida por capsaicina (Entrena et al., 2009). Como ese trabajo no mostró el mecanismo molecular que explique este efecto, nosotros nos propusimos elucidarlo.

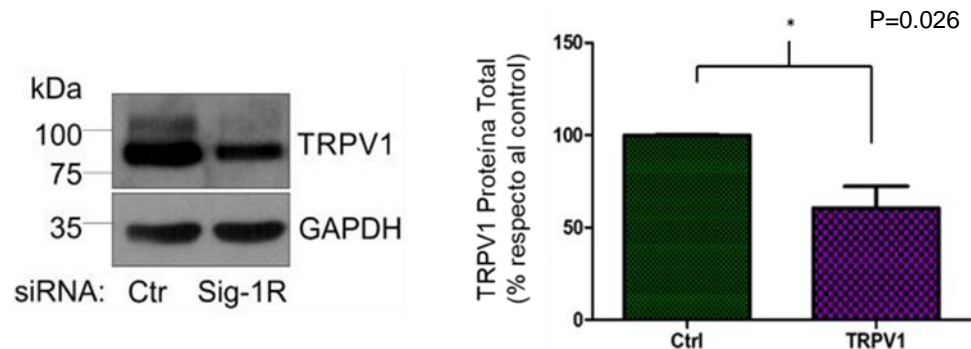
Como primer acercamiento, realizamos experimentos de disminución de los niveles proteicos del Sig-1R (knockdown) en la línea celular HEK293 y preguntamos cuál sería el posible efecto sobre los niveles de los canales TRPV1. Para ello, células HEK293 fueron transfectadas con un pequeño RNA interferente (siRNA) específico para la secuencia del transcrito de Sig-1R y 48 h post-transfección las células fueron cosechadas y lisadas para evaluar los cambios a nivel de proteína total del Sig-1R. La figura 8 muestra que 48 horas después de la transfección, los niveles de proteína Sig-1R disminuyeron un 55.2% por efecto del siRNA, en comparación con las células transfectadas con el siRNA control.



**Figura 8. Descenso en los niveles de expresión de Sig-1R por efecto del siRNA específico de Sig-1R.** Células HEK 293 transfectadas con el siRNA control (Ctr) o con siRNA específico de Sig-1R. 48 h después de la transfección se aislaron las proteínas totales para la inmunodetección de Sig-1R. La inmunodetección de GAPDH se realizó como control de carga. Los gráficos muestran la señal de la densitometría de Sig-1R normalizada con el control de carga. Las células transfectadas con el siRNA específico mostraron un 44±8.2% de expresión del Sig-1R en comparación del 100% de expresión de Sig-1R en las células transfectadas con el siRNA control. n =4, t-student, \*p<0.05

Una vez validada la disminución de los niveles proteicos del Sig-1R mediante el uso del siRNA específico, se procedió a realizar experimentos de co-transfección de los siRNA y del vector que expresa al canal TRPV1 (pcDNA3.1+TRPV1), observándose a la par una disminución del 55% del Sig-1R y 39.5 % de TRPV1 en comparación con las células co-transfectadas con pcDNA3.1+TRPV1 y siRNA control,

(figura 9).

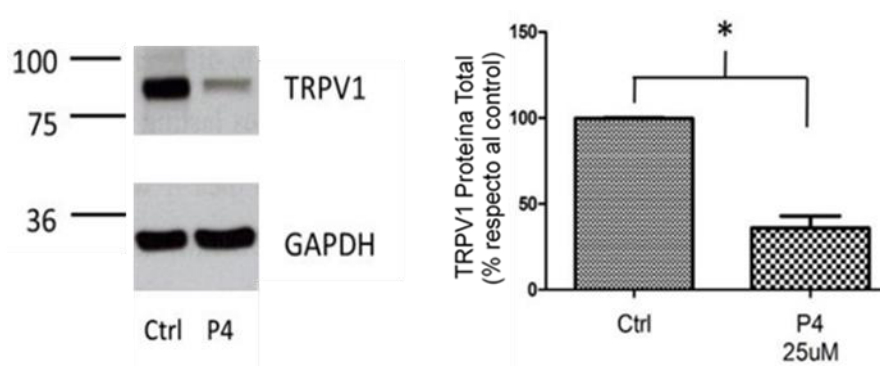


**Figura 9. Descenso en los niveles de los niveles proteicos de TRPV1 por efecto del siRNA específico de Sig-1R.** La inmunodetección de TRPV1 en extractos proteicos totales de células co-transfectadas con siRNA-Sig-1R y el vector pcDNA3.1+TRPV1 muestran un 53±9 % de expresión del canal TRPV1 con respecto al 100% e expresión del canal en las células co-transfectadas con el siRNA control, \*p<0.05.

Por lo tanto, la disminución en la expresión del Sig-1R mediante el uso de un siRNA específico trae como consecuencia una disminución en los niveles de proteína total del canal TRPV1.

### **6.3 Tratamientos con progesterona generan una disminución en los niveles de TRPV1.**

Con los resultados anteriores se demostró que el knockdown de Sig-1R genera un descenso en los niveles proteicos del canal TRPV1, por lo tanto, nos preguntamos si algún antagonista endógeno del Sig-1R, como la progesterona, podría afectar los niveles proteicos del canal TRPV1 de manera dependiente del Sig-1R. Para ello células HEK293 con expresión transitoria de TRPV1 fueron tratadas con 25µM de P4 por 24 h y posteriormente se evaluó si existían cambios a nivel de proteína total del canal TRPV1 por efecto del tratamiento. El tratamiento con progesterona causó un descenso de aproximadamente el 60% en los niveles proteicos del TRPV1 en comparación de las células control (Figura 10).

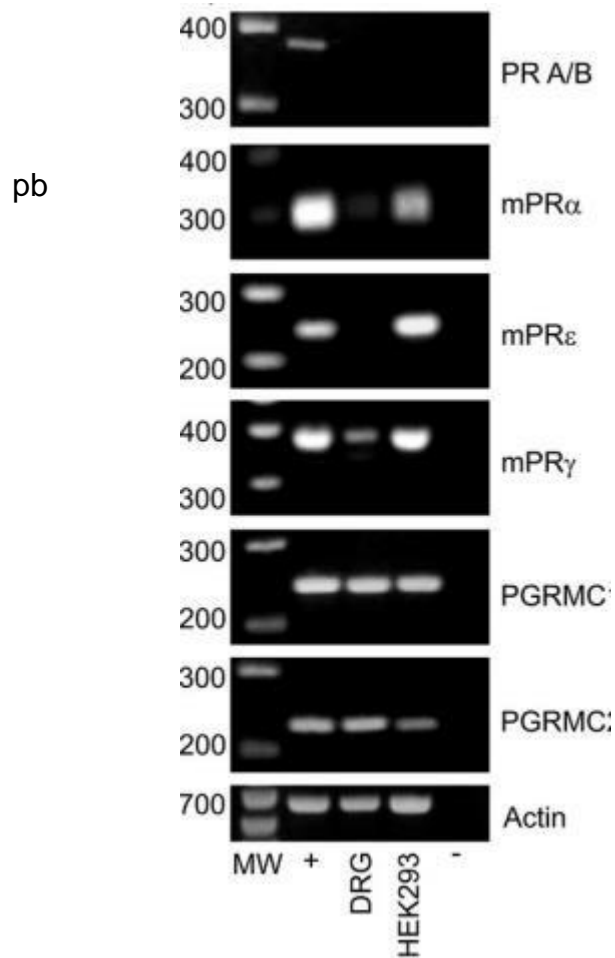


**Figura 10. Disminución en la proteína total del canal TRPV1 en células tratadas con progesterona (P4).** Los niveles de proteína total TRPV1 en las células control y células tratadas con 25  $\mu$ M de progesterona durante 24 h, fueron analizados por Western blot (panel superior, izquierda). La inmunodetección de GAPDH se usó como control de carga (panel inferior, izquierda). Los niveles de proteína TRPV1 normalizados de las células tratadas con P4 con respecto al control fueron del  $37 \pm 25\%$ ,  $n=3$ ,  $*p<0.05$ , t-student.

#### **6.4 Progesterona modifica los niveles proteicos de TRPV1 de manera independiente a sus receptores clásicos**

La progesterona es un esteroide que principalmente ejerce sus efectos por medio de sus receptores nucleares clásicos y receptores de membrana. Es por ello que fue esencial determinar si el efecto de este esteroide sobre el canal TRPV1 era mediado a través de estos receptores.

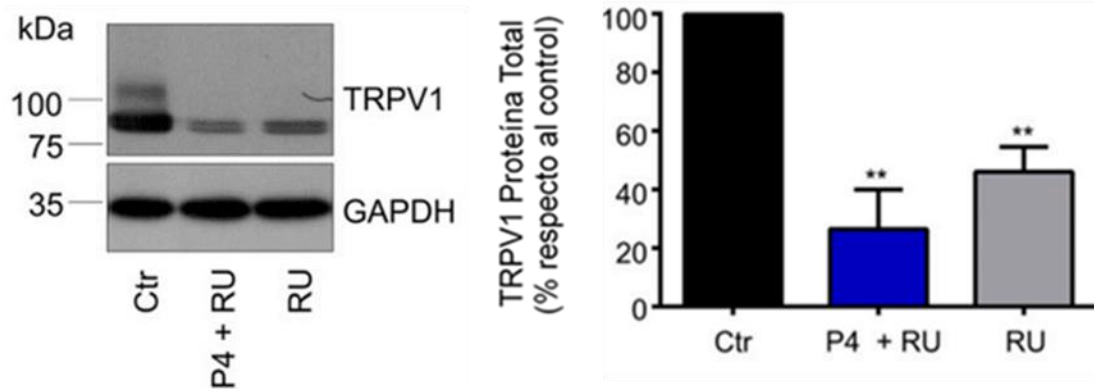
En primer lugar, se evaluó la expresión de los receptores a progesterona en los sistemas biológicos usados en este trabajo, células HEK293 y ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratón. Por medio de ensayos de RT-PCR convencional no se detectaron los mRNA para los receptores nucleares a progesterona nuclear A y B (PR A/B) (Figura 11). Otra posible explicación de los efectos de P4 en los niveles proteicos de TRPV1 podría ser a través de la activación de receptores de membrana plasmática de P4, como los receptores de membrana  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  o por los componentes de membrana del receptor de P4 1 y 2 (PGRMC1 y PGRMC2). Los ensayos de RT-PCR muestran claramente que mPR $\alpha$ , mPR $\gamma$ , PGRMC1 y PGRMC2 se expresan en DRG y HEK293, mientras que mPR $\epsilon$  se expresa solo en células HEK293. Estos resultados implican que al menos cuatro de los cinco receptores de membrana analizados podrían estar potencialmente implicados en los efectos de P4 sobre el canal TRPV1 (Figura 11).



**Figura 11. Experimentos de RT-PCR para la detección de receptores a progesterona.** Se aisló RNA total de DRG de ratón y de células HEK293 para analizar la expresión de RNAm del receptor de progesterona nuclear A/B y de los receptores de progesterona de membrana mPR $\alpha$ , mPR $\epsilon$  mPR $\gamma$ , PGRMC1 y PGRMC2. Los carriles son los siguientes: marcadores de DNA MW; +, control positivo RNA total de oviductos de ratones se utilizó como un control positivo de la expresión de RNAm de PR A/B (391 pb), mPR $\alpha$  (296 pb), mPR $\epsilon$  (241 pb), mPR $\gamma$  (380 pb), PGRMC1 (246 pb) y PGRMC2 (240 pb); el RNA total de la línea celular CHO se usó como control positivo de expresión para mPR $\epsilon$ ; amplificación de actina (700 pb) como control positivo de expresión de RNAm;

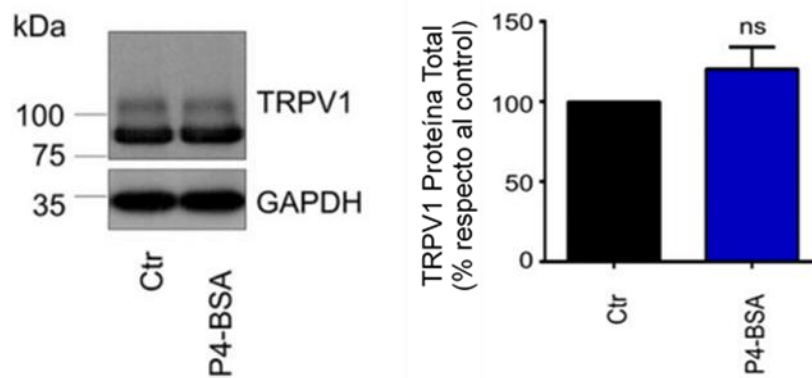


Para descartar por completo los efectos de P4 por medio de este tipo de receptores, utilizamos un antagonista de los receptores nucleares A/B de progesterona, el compuesto sintético RU486 (RU) a una concentración de 25µM y determinamos si revertía los efectos negativos de P4 sobre los niveles de proteína TRPV1. Si los efectos de P4 en los niveles proteicos de TRPV1 se debían a la activación de los receptores nucleares, la inhibición de estos receptores debería revertir el proceso en la disminución del canal TRPV1. Inesperadamente, los resultados mostraron que la incubación con 25 µM de RU solo o junto con 25 µM P4 durante 24 hr no contrarrestó los efectos negativos de P4 sobre el canal TRPV1, por el contrario, redujo aún más los niveles de proteína TRPV1 total ( $73.5 \pm 13.5\%$  y  $54 \pm 8\%$  para P4+RU y RU, respectivamente) como se muestra en la figura 12. Por lo tanto, estos experimentos demuestran que la vía de señalización clásica de la progesterona mediante sus receptores nucleares no está participando en la regulación negativa de la progesterona sobre el canal TRPV1.



**Figura 12. El antagonismo de los receptores nucleares a progesterona nuclear no restablece los niveles del canal TRPV1.** La proteína total de las células de control y de las células tratadas con 25 µM de progesterona + 25 µM de RU486 (RU) o 25 µM de RU486 se analizaron por Western blot. El panel de la derecha muestra la inmunodetección TRPV1 (superior) y GAPDH (inferior). El porcentaje de la proteína total de TRPV1 normalizados de las células tratadas con P4 + RU con respecto al control fueron del  $27 \pm 14\%$  y de las células tratadas con RU fueron del  $46 \pm 8\%$ . \*\*  $p < 0.01$ ; t-student.

Otra explicación de los efectos de P4 sobre los niveles proteicos de TRPV1 podría ser la activación de los receptores de membrana plasmática de P4, como los receptores de membrana  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  o los componentes de membrana del receptor a progesterona 1 y 2 (PGRMC1 y PGRMC2). Por RT-PCR nosotros determinamos que los receptores mPR $\alpha$ , mPR $\gamma$ , PGRMC1 y PGRMC2 se expresan en células DRG y HEK293, mientras que mPR $\epsilon$  se expresa solo en células HEK293 (figura 11). Estos resultados implican que al menos cuatro de los cinco receptores de membrana analizados podrían estar participando en los efectos de P4 sobre el canal TRPV1. Probamos esta posibilidad utilizando una P4 acoplada a albúmina sérica bovina (P4-BSA), este compuesto es impermeable a la membrana plasmática, por lo tanto, los posibles efectos de esta progesterona impermeable solo podrían llevarse a cabo por medio de receptores localizados en la membrana plasmática. Como se muestra en la figura 13, el tratamiento durante 24 horas con 25  $\mu$ M de P4-BSA en células HEK293 no produjo cambios en los niveles de proteína TRPV1 total, por lo tanto, se excluye la participación de los receptores a progesterona de membrana en la regulación a la baja del nivel de proteína TRPV1, quedando como única posibilidad que P4 ejerce estos efectos por medio del Sig-1R.



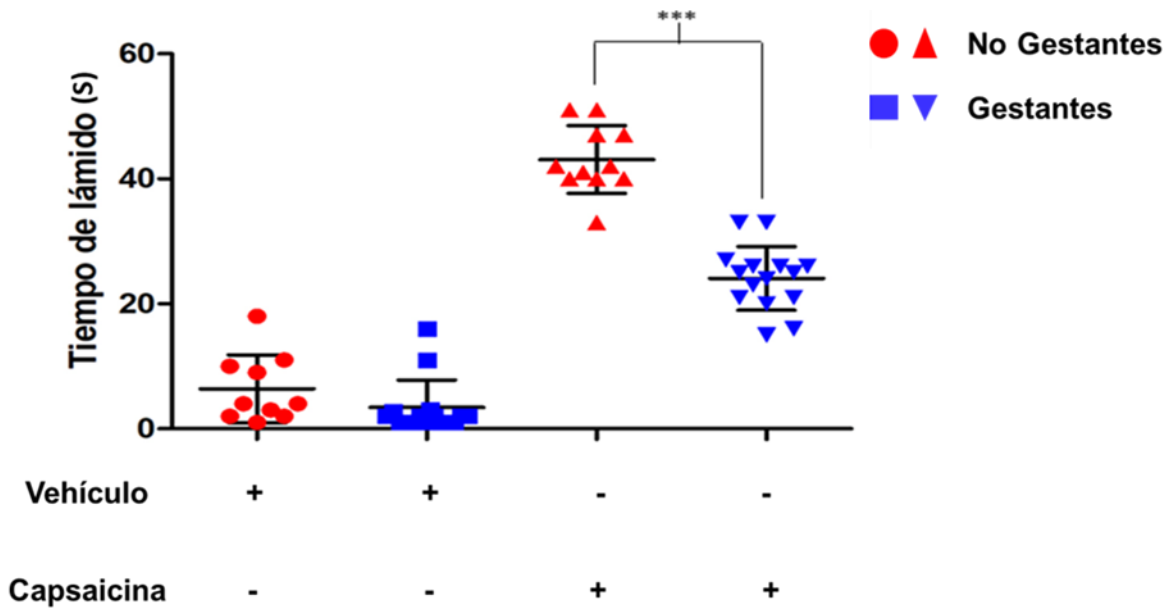
**Figura 13. Los niveles de proteína de TRPV1 no se ven afectados por la progesterona impermeable a la membrana (P4-BSA).** La proteína total de TRPV1 se obtuvo de células de control y células tratadas durante 24 h con progesterona 25  $\mu$ M acoplada a BSA (P4-BSA). (Izquierda) Se muestra un experimento representativo de inmunodetección de TRPV1 y GAPDH (control de carga). El nivel de proteína TRPV1 de células tratadas con P4-BSA fue 120  $\pm$  13%. (Derecha) Los datos se representan como media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes; ns, no estadísticamente significativo.

### **6.5 La nocicepción dependiente de TRPV1 disminuye en ratones hembras gestantes**

La posible repercusión fisiológica de la disminución de la proteína total del canal TRPV1 por efecto de la progesterona, se abordó usando ratones en un estado fisiológico donde la progesterona se encuentra altamente elevada, el embarazo. Se ha reportado que durante la etapa de embarazo hay un incremento en los niveles de progesterona (P4) en las hembras (Holinka et al., 1979) a su vez aumentan los umbrales de dolor en las hembras aumentan durante este periodo (Dawson-Basoa y Gintzler, 1998; Dawson-Basoa y Gintzler, 1996) Además, que durante este estado fisiológico, los agonistas de Sig-1R no pueden interactuar con Sig-1R ya que P4 compite por el sitio de unión de este receptor (Maurice et al., 1996).

Por esta razón se procedió a la realización de ensayos de conducta en ratones hembra gestantes (de 15 días de gestación) y ratones hembras no gestantes de la cepa C57BL/6J a las cuales se les inyectó 2.8µg de capsaicina en la pata delantera y se midió el tiempo de lamido acumulado por 10 min.

Como se puede observar en la gráfica (figura 14) las hembras embarazadas tienen una respuesta menor de dolor al estímulo de capsaicina ( $24.07 \pm 1.318$  s) en comparación a las hembras no embarazadas ( $43.09 \pm 1.6$  s). Esto se debe a que en las hembras embarazadas Sig-1R se encuentra bloqueado por los altos niveles de progesterona, lo cual podría estar causando una regulación negativa sobre el canal TRPV1.

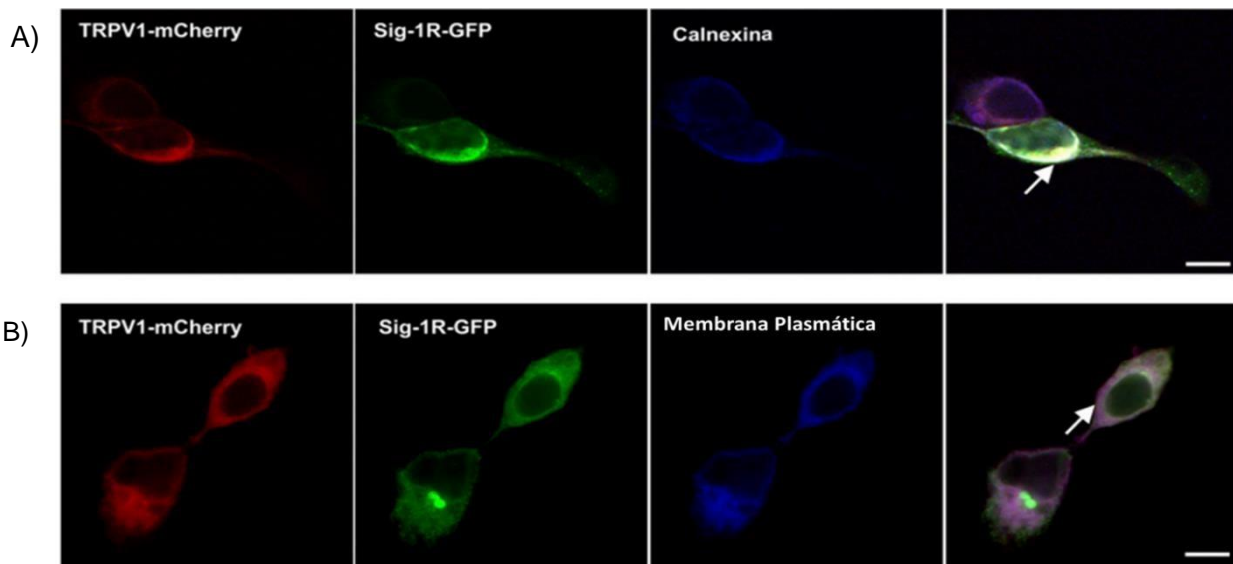


**Figura 14. Disminución del dolor mediado por el canal TRPV1 en hembras embarazadas.**

Los dos primeros grupos fueron inyectados intradérmicamente en la extremidad delantera con solución control: etanol al 1.4 % (vehículo de capsaicina) en solución salina (SS). Ambos grupos mostraron muy poca respuesta dolorosa ante la SS: no embarazadas =  $6.4 \pm 1.72$  s (n=10) y embarazadas =  $3.4 \pm 1.18$  s (n=14). El tercer y cuarto grupo fueron inyectadas con capsaicina (2.8 $\mu$ g), hembras no embarazadas =  $43.09 \pm 1.6$  s (n=11) y embarazadas =  $24.07 \pm 1.3$  s n=15) \*\*\*P<0.05.

### **6.6 TRPV1 y Sig-1R co-localizan en el retículo endoplasmático de las células HEK293**

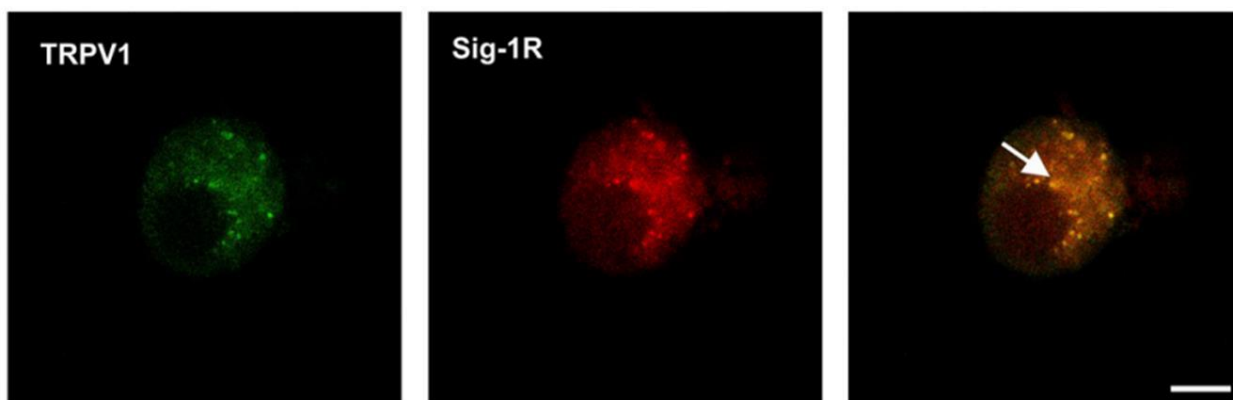
Para determinar en qué compartimentos celulares específicos podrían estar interaccionando Sig-1R y TRPV1, se evaluó si ambas proteínas estaban presentes en el retículo endoplasmático, para ello exploramos la colocación de ambas proteínas con calnexina. La figura 15A muestra que las proteínas marcadas con TRPV1-mCherry (panel 1) y Sig-1R-GFP (panel 2) colocación (panel 4) en la región marcada con calnexina (panel 3). También fue importante determinar, si ambas proteínas colocación en la región de la membrana plasmática. Para ello se realizó el marcaje de la membrana plasmática con una molécula anfipática fluorescente (CellMask Deep Red label, molecular probes). La figura 15B muestra que Sig-1R y TRPV1 no colocación predominantemente en la membrana plasmática (panel 4), aunque TRPV1 está altamente enriquecido en esta estructura celular, como se muestra por la señal púrpura que representa el traslape de la señal fluorescente entre TRPV1 y la señal de la membrana plasmática (panel 4).



**Figura 15. Co-localización de TRPV1 y Sig-1R en células HEK293 mediante microscopía confocal.** (A) Los paneles 1 y 2 muestran las señales detectadas para las proteínas TRPV1-mCherry (1, rojo) y Sig-1R-GFP (2, verde). El panel 3 muestra la inmunodetección de calnexina, (marca del retículo) por anticuerpos anti-calnexina de conejo y Cy5 anti-conejo (azul). La co-localización de TRPV1 y Sig-1R con calnexina, se muestra en el panel 4 (la flecha indica la fusión en blanco). (B) Panel 1, TRPV1- mCherry (rojo) y panel 2 Sig-1R-GFP (verde). El panel 3 muestra el marcaje de la membrana plasmática marcada con CellMask Deep Red (azul). El panel 4 se muestra la imagen de la co-localización de TRPV1 en púrpura en la membrana plasmática. La barra blanca indica la escala 10  $\mu$ m.

### **6.7 Sig-1R y TRPV1 colocalizan en neuronas DRG**

Adicionalmente, se evaluó si TRPV1 y Sig-1R co-localizaban en el sistema de expresión endógeno del canal TRPV1, las neuronas DRG. Esto se realizó con el fin de evaluar si la interacción de estas dos proteínas se lleva a cabo endógenamente. Para la inmunodetección de las proteínas individuales se realizó mediante el uso de anticuerpos primarios específicos anti-TRPV1 (P-19) y anti-Sig-1R (*NBP1-82479*). Las imágenes en la figura 16 confirman que ambas proteínas co-localizan en neuronas del ganglio de la raíz dorsal.



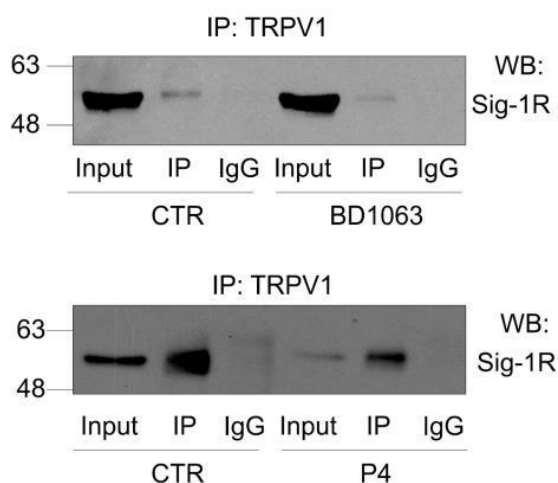
**Figura 16. Co-localización de TRPV1 y Sig-1R en neuronas DRG de ratón.** Inmunodetección TRPV1 con anti-TRPV1 de cabra y anticuerpos secundarios anti-cabra Alexa Fluor 488 (verde, panel 1) e inmunodetección Sig-1R con anticuerpos anti-Sig-1R de conejo y Alexa Fluor 594 secundario anti-conejo (rojo, panel 2). Merge (amarillo, panel 3) muestra la co-localización de ambas proteínas. (barra de Escala: 10  $\mu$ m).

### **6.8 Antagonistas de Sig-1R interrumpen la interacción entre Sig-1R y TRPV1**

Se ha reportado que los antagonistas de Sig-1R fortalecen la interacción de este receptor con otra proteína residente del retículo endoplásmico llamada BiP (proteína de unión a inmunoglobulina) (Hayashi & Su, 2007). Esta genera un bloqueo o inhibición en la actividad de chaperona Sig-1R por lo cual no puede asistir en el plegamiento de sus proteínas blanco (Hayashi & Su, 2007; Ortega-Roldan et al., 2013).

Aunado a los ensayos de microscopia confocal que mostraron que ambas proteínas muestran una co-localización en el ER, esta asociación proteica fue observada en ensayos de co-inmunoprecipitación. Por lo tanto, ahora nos preguntamos si el uso de antagonistas sintéticos (BD1063) o endógenos (P4) podrían inhibir la asociación entre estas dos proteínas.

Los ensayos de co-inmunoprecipitación entre TRPV1 y Sig-1R en células tratadas con los antagonistas de Sig-1R, BD1063 o P4 (25 $\mu$ M), mostraron que la asociación de ambas proteínas disminuye, en comparación con las células control sin tratamiento (figura 17). Por lo tanto, los antagonistas de Sig-1R disminuyen la interacción con TRPV1.



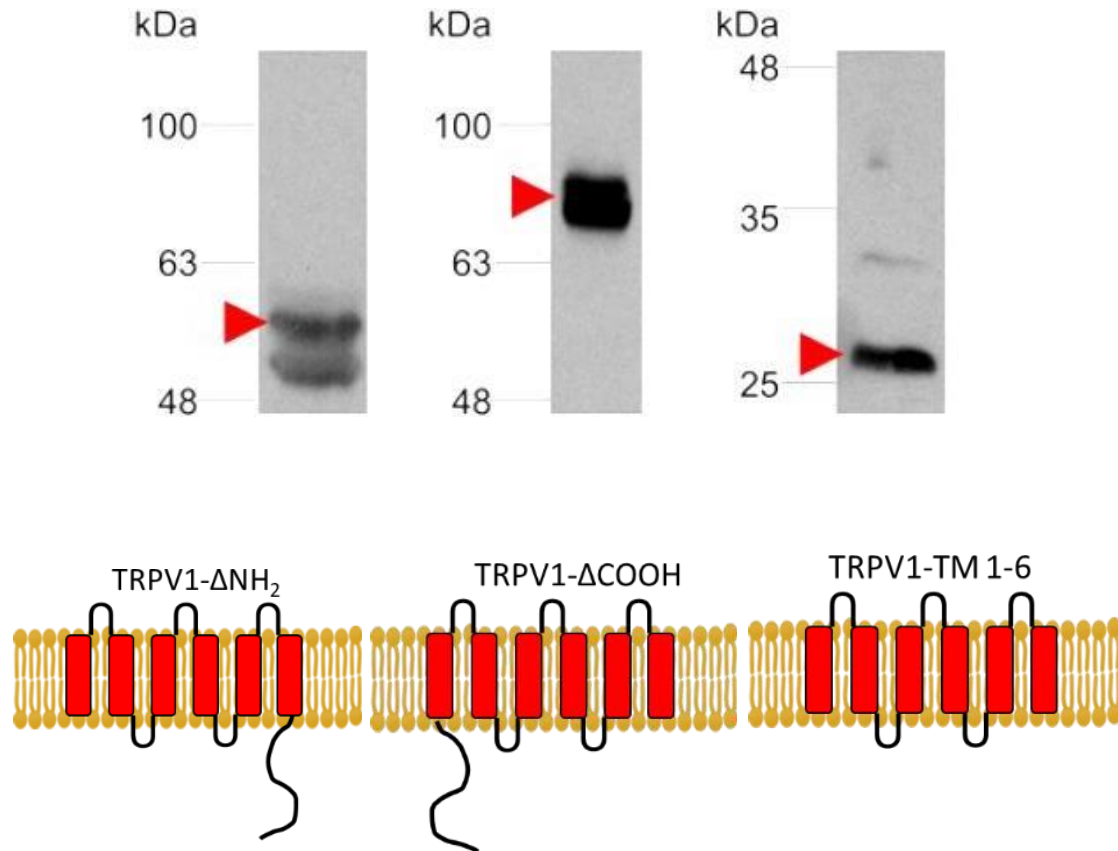
**Figura 17. Disminución en la interacción entre Sig-1R y TRPV1 por efecto de antagonistas de Sig-1R.** (Arriba) La inmunoprecipitación se llevó a cabo con el anticuerpo TRPV1 y extractos de proteína total de células HEK293 co-expresando TRPV1 y Sig-1R, en condiciones control (Ctr, izquierda arriba) y tratadas con BD1063 (derecha, arriba). La co-inmunoprecipitación se llevó a cabo con el anticuerpo TRPV1 para la proteína total de las células de control (Ctr, izquierda, abajo) y las células tratadas con P4 (derecha, abajo). Se determinaron las diferencias en la señal correspondiente al Sig-1R co-inmunoprecipitado entre las células tratadas con respecto a las células control (Ctr) (n=3).

### **6.9 Inmunodetección de distintas construcciones de DNA del canal TRPV1**

Anteriormente habíamos demostrado que al sobre expresar TRPV1 y Sig-1R e inmunoprecipitar a cualquiera de estas proteínas, ocurría una interacción entre ambas proteínas (Ortíz, M 2018) y que los inmunoprecipitados realizados con extractos de proteína total de las células tratadas con distintos antagonistas de Sig- 1R (BD1063 o P4) muestran una disminución en la interacción entre TRPV1 y Sig- 1R. Estas evidencias sugieren que Sig-1R puede asociarse con TRPV1 en una interacción proteína-proteína y que esta interacción regula la abundancia de TRPV1 en la membrana.

Con estas evidencias, decidimos determinar qué región del canal TRPV1 es determinante para la interacción con Sig-1R. Para ello, se realizaron construcciones de DNA en las que se eliminó el amino o carboxilo terminal de TRPV1, así mismo también se realizó una construcción que presentara solamente los dominios transmembranales de TRPV1. Para comprobar que las construcciones fueran adecuadas se analizaron a través de Western Blot. En la figura 18 en el primer recuadro se muestra la señal para la construcción de TRPV1 que carece del amino terminal, observándose como una banda de aproximadamente 58kDa, (para la inmunodetección de este canal sin amino terminal se utilizó un anticuerpo de conejo anti-TRPV1, que reconoce un epítipo localizado en el extremo C-terminal de TRPV1). En el panel medio se muestra la señal para la construcción carente del carboxilo terminal con un peso de alrededor de 77kDa (para esta construcción se utilizó un anticuerpo de cabra anti-TRPV1 que reconoce un epítipo localizado en el extremo N-terminal de TRPV1). Mientras que en el último panel se muestra la señal de la construcción de TRPV1 con sus segmentos transmembranales únicamente, es decir carece tanto del amino como del carboxilo terminal y su detección fue posible utilizando un anticuerpo de conejo anti-TRPV1 que reconoce un epítipo localizado en un asa extracelular, esta construcción tiene un peso alrededor de 28 kDa.

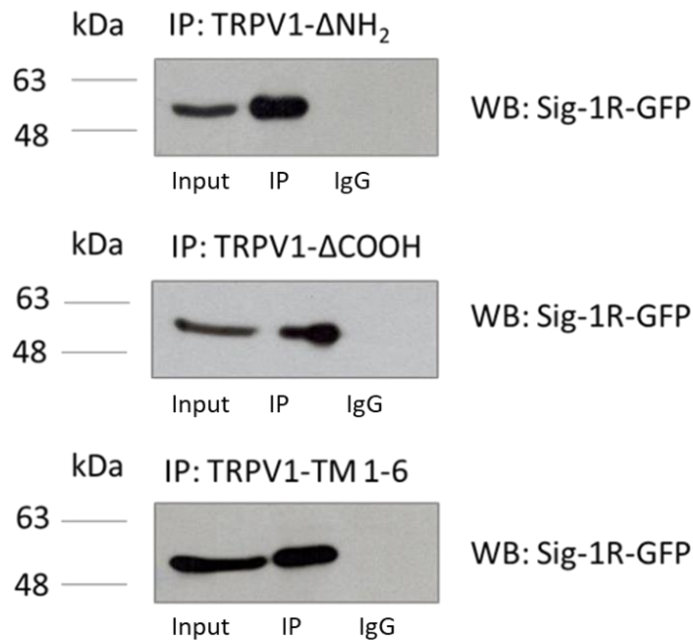




**Figura 18. Diferentes construcciones de TRPV1.** El análisis por Western blot de las distintas construcciones del canal TRPV1 muestra las bandas correspondientes a los tamaños esperados: TRPV1-ΔNH<sub>2</sub> (58 kDa, izquierda), TRPV1-ΔCOOH (77 kDa, centro) y TRPV1-TM1-6 (28 kDa, Derecha).

### **6.10 Sig-1R interacta con los dominios transmembranales de TRPV1**

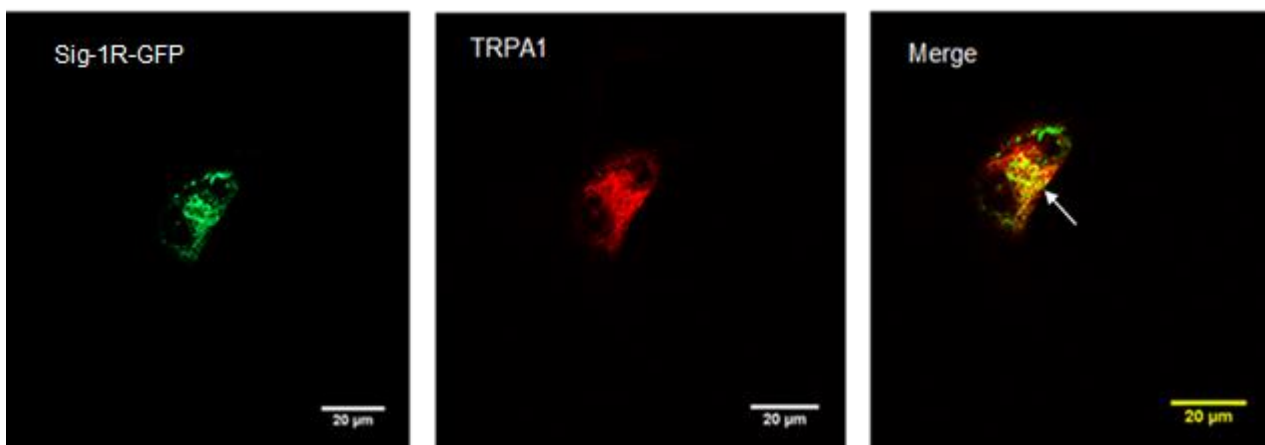
Las construcciones de DNA con eliminaciones de segmentos del canal TRPV1, fueron utilizadas para determinar con cuál de ellas se perdía o mantenía la interacción con Sig-1R. Para ello, se inmunoprecipitó a las diferentes construcciones de TRPV1 (utilizando su debido anticuerpo) y se realizó el WB para detectar a Sig-1R-GFP. Como se muestra en la figura 19, Sig-1R co- inmunoprecipita con todas las construcciones. Esto nos indica que al eliminar los extremos amino y carboxilo del canal TRPV1, el receptor Sig-1R sigue interactuando con el canal por medio de los segmentos transmembranales.



**Figura 19. Ensayos de co-inmunoprecipitación de diferentes construcciones del canal TRPV1 con Sig-1R-GFP.** Co-inmunoprecipitación de las construcciones de las deleciones de TRPV1- $\Delta$ NH<sub>2</sub> (Superior), TRPV1- $\Delta$ COOH (Medio) y de los dominios transmembranales TM1-6 solamente (Inferior) con Sig-1R. Cada construcción de deleción de TRPV1 se inmunoprecipitó usando un anticuerpo específico contra un epítoto específico del segmento para la posterior inmuno detección del Sig-1R-GFP coimmunoprecipitado.

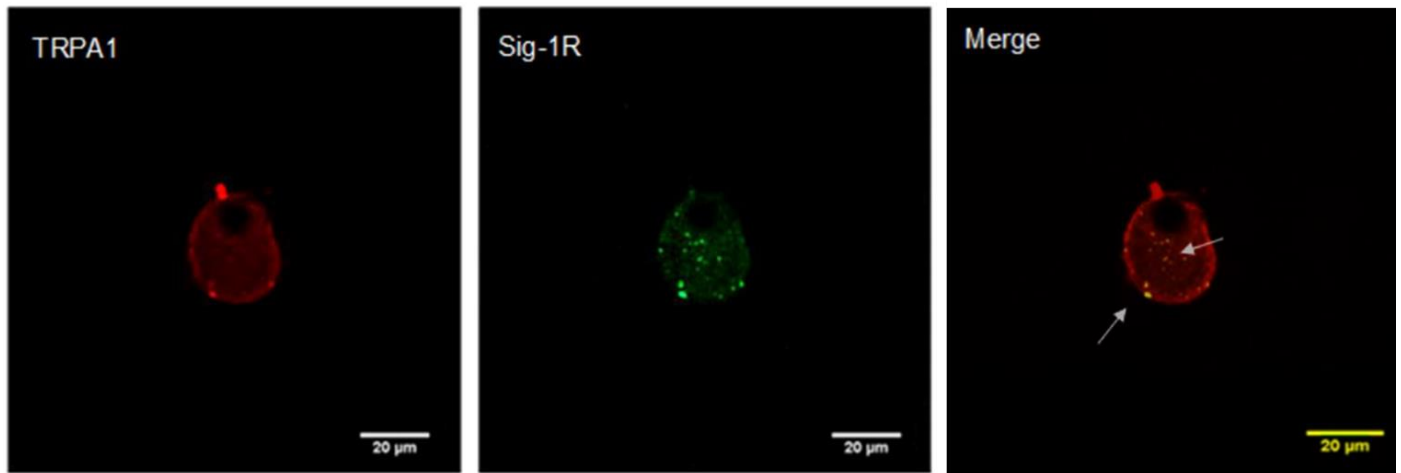
### **6.11 Co-localización de Sig-1R con el canal TRPA1**

En este trabajo hemos demostrado que TRPV1 y Sig-1R son dos proteínas que interactúan de forma directa y que la actividad de Sig-1R repercute sobre el canal TRPV1, por lo tanto, nos preguntamos si otro canal de la familia TRP también interactúa con Sig-1R, en este caso el canal TRPA1. Para ello realizamos experimentos de co-transfección del canal TRPA1 con el receptor Sig-1R fusionado a GFP en células HEK293. 48 hr pos-transfección las células fueron fijadas y usadas para la realización de la inmunocitoquímica del canal TRPA1, mediante el uso de un anticuerpo primario que reconoce un epítipo extracelular (Alomone, ACC-037). Posteriormente la incubación con un anticuerpo secundario Alexa 594, permitió la visualización del canal TRPA1 en el canal rojo y al Sig-1R en verde debido a que está fusionado a GFP. Por microscopía confocal se observó que TRPA1 y Sig-1R-GFP, co-localizan en el sistema de expresión heteróloga como se puede observar en el merge.



**Figura 20. Colocalización de TRPA1 y Sig-1R en células HEK293 mediante microscopía confocal.** Sig-1R-GFP (Panel 1), Inmunodetección TRPA1 con anti-TRPV1 de conejo y anticuerpos secundarios anticonejo Alexa Fluor 594 (rojo, panel 2). Merge (panel 3).

También se evaluó por medio de microscopía confocal si TRPA1 y Sig-1R co-localizan en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG), el sistema biológico donde ambas proteínas no están sobre expresadas. Los datos obtenidos muestran que también en las neuronas DRG el canal TRPA1 y el Sig-1R co-localizan, en regiones intracelulares (figura 21).



**Figura 21. Co-localización de TRPA1 y Sig-1R en cultivos primarios de neuronas DRG de ratón.** Inmunodetección TRPA1 con anti-TRPA1 de conejo y anticuerpos secundarios anti-conejo Alexa Fluor 594 (rojo, panel 1) e inmunodetección Sig-1R con anticuerpos anti-Sig-1R de cabra y Alexa Fluor 488 secundario anti-cabra (verde, panel 2). Merge (amarillo, panel 3) muestra la co-localización de ambas proteínas.

## **7. Discusión**

La detección de estímulos ambientales que resultarían ser nocivos para cualquier ser vivo, requiere de sistemas celulares que puedan responder de manera adecuada y evitar el daño. En particular, los mamíferos contamos con un sistema de neuronas sensoriales que transmiten estas señales de forma altamente eficiente (Hille, 2001). La eficiencia de estas neuronas, está dada por la especializada maquinaria molecular con la que cuentan, destacándose una gran diversidad de canales iónicos, entre ellos el canal TRPV1, un miembro de la subfamilia vaniloide que forma parte de la gran familia de canales TRP (Caterina *et al.*, 1997), canales de carácter polimodal ya que pueden ser activados por diferentes vías (Revisado en Morales-Lázaro S, et al. 2013). En particular, la activación del canal TRPV1, está estrechamente relacionada con la producción de dolor agudo, por efecto de algunas toxinas y en el dolor crónico como la neuropatía diabética, el síndrome de colon irritable, la artritis y el dolor en ciertos tipos de cáncer como el óseo (Nilius & Flockerzi, 2014).

El dolor es uno de los problemas médicos más comunes, pero a pesar de su prevalencia, muchas personas todavía sufren de dolor no aliviado o poco tratado. Y aunque los esfuerzos de la ciencia básica y la investigación clínica para prevenir o disminuir el dolor, sigue prevaleciendo su manejo inadecuado. Por lo tanto, sigue siendo un desafío clínico y sobre todo científico, encontrar los blancos moleculares precisos para combatir la respuesta de dolor. Por lo mismo, existe la necesidad de nuevos medicamentos, con nuevos mecanismos de acción, que podrían aumentar la eficacia de las terapias existentes y reducir sus efectos no deseados (Turk et al., 2011). Por ende, el canal TRPV1 se ha vuelto un blanco molecular importante en el tratamiento del dolor, y diversas investigaciones están enfocadas en la búsqueda de antagonistas que inhiban la actividad de este canal para generar un descenso en la respuesta al dolor. Interesantemente, otro mecanismo de regulación de este canal, es por medio de cambios en la cantidad de proteína TRPV1 presente en la membrana plasmática, lo cual en gran medida depende de interacciones con algunas proteínas que favorecen su adecuada localización, por lo que la elucidación de nuevas proteínas intracelulares que interaccionan con TRPV1

y las vías moleculares implicadas para regular a este canal, resultan ser de gran potencial para entender las diferentes formas de modular la función/expresión de este canal.

Una de las interacciones primordiales de cualquier proteína que le confiere un plegamiento, estabilidad y tráfico intracelular adecuado, es lo que sucede con proteínas chaperonas (Ellis RJ, 2006). En particular, en las neuronas sensoriales se ha reportado que existe una chaperona que participa de manera importante en el proceso de la nocicepción, ya que regula la función/expresión de algunos canales iónicos; esta chaperona es el receptor sigma 1 (Sig-1R). Este receptor se activa en condiciones de estrés o por medio de ligandos que funcionan como agonistas (Bangaru *et al.*, 2013; Bae *et al.*, 2009; Entrena *et al.*, 2009), favoreciendo la respuesta de dolor, mientras que los antagonistas de Sig-1R, disminuyen o previenen dicha respuesta, por ello, al igual que el canal TRPV1, Sig-1R es considerado un blanco terapéutico en el campo de la analgesia (Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2012).

Por todo lo anterior, en los últimos años la chaperona Sig-1R se ha vuelto importante para tratar patologías que involucran dolor crónico (Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013) y en este trabajo se exploró si TRPV1 podría ser regulado por este receptor, ya que estudios previos mostraban cierta relación. En primer lugar, ratones transgénicos, que carecen de la expresión de Sig-1R, muestran menor hipersensibilidad mecánica en presencia del agonista de TRPV1, la capsaicina, en comparación con los animales de tipo silvestre (Entrena *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, en un modelo de dolor que mimetiza la producción de migraña en ratas, por la administración de capsaicina en el nervio trigémino, los antagonistas de Sig-1R atenúan el dolor (Kwon, Y *et al.*; 2009), por lo tanto, estos estudios aportaban las primeras evidencias sobre el posible papel de Sig-1R en la nocicepción mediada por el canal TRPV1. Sin embargo, faltaba descifrar el mecanismo molecular por el cual estas dos proteínas podrían estar relacionadas.

En este trabajo, se demuestra que existe una estrecha relación entre estas dos proteínas, ya que la disminución en la expresión del Sig-1R, mediante experimentos

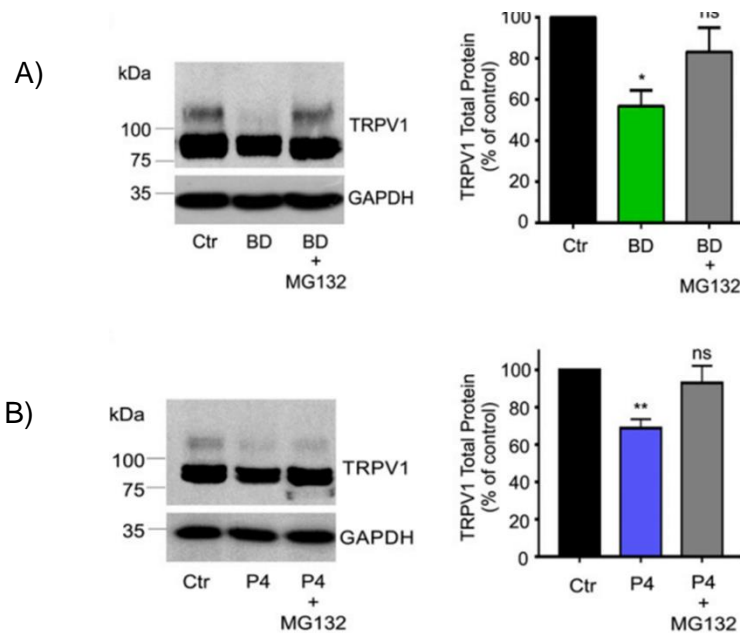
de knockdown afecta de manera concomitante los niveles proteicos de TRPV1 (figura 8 y 9). Este dato nos aportó una evidencia molecular, de la importancia de Sig-1R para mantener adecuadamente los niveles de proteína de este canal. Con respecto a esto, previamente se había reportado que Sig-1R favorece la maduración de los canales de potasio hERG, favoreciendo su adecuado tráfico intracelular (Balasuriya et al., 2014) y alteraciones en las funciones de Sig-1R disminuye el grado de maduración de este tipo de canales y por ende su abundancia.

En este sentido, Sig-1R podría estar llevando a cabo una función parecida con respecto a los canales TRPV1, por lo tanto, al disminuir la expresión de Sig-1R se afecta también los niveles de proteína de TRPV1 lo cual genera pocos canales funcionales en la membrana plasmática, (demostrado colateralmente en experimentos electrofisiológicos, realizados por coautores de este trabajo (Ortíz-Rentería, et al, 2018). Bajo este escenario, existen pocas moléculas de Sig-1R para interactuar con TRPV1, por lo tanto, el canal no madura y no puede translocarse adecuadamente hacia a la membrana plasmática como en el caso de los canales hERG.

Este efecto, también lo pudimos asemejar, mediante el uso de un antagonista endógeno de Sig-1R, como la progesterona (P4). Demostramos, en el sistema de expresión heterólogo del canal TRPV1, que la P4 genera un descenso de los niveles proteicos TRPV1 (figura 10). Esta disminución se debe a que la progesterona al ser un antagonista de Sig-1R, favorece su interacción con otra proteína residente del retículo endoplasmático, BiP; esto mantiene a Sig-1R en un estado “secuestrado” (Hayashi y Su, 2007) dando como resultado el bloqueo de la actividad de chaperona Sig-1R. Esto explicaría que TRPV1 no sea asistida por Sig-1R y no obtenga un plegamiento adecuado y esto promueva su degradación, ya que los polipéptidos mal plegados o incompletamente procesados son expulsados del retículo y degradados por la vía del proteosoma 26S (Merulla et al., 2013). Además, mientras que los agonistas de Sig-1R promueven conformaciones de monómeros y/o dímeros que permiten las interacciones de la chaperona con otras proteínas, los antagonistas tales como la progesterona generan que Sig-1R adquiera una forma

oligomérica, impidiendo que lleve a cabo sus funciones de chaperona (Mishra AK, et al. 2015). Teniendo el mismo resultado sobre las proteínas blanco de Sig-1R, inestabilidad proteica que conlleva a la degradación.

Pero, ¿cómo podemos argumentar a favor de que el antagonismo de Sig-1R por medio de P4 promueve la degradación del canal TRPV1 por medio del proteasoma?, esto también fue demostrado en nuestro grupo de investigación, como parte de experimentos colaterales a este proyecto, en los cuales los tratamientos con progesterona se realizaron en presencia de un inhibidor del proteasoma (MG132), en este caso se previno la disminución de la proteína TRPV1 en contraste con las células tratadas solo con P4, que muestra disminución de la proteína TRPV1 (Ortíz-Rentería et al, 2018).



**Figura 22 El antagonismo de Sig-1R en las células HEK293 produce una baja regulación del nivel de proteína TRPV1 por la vía del proteasoma.** (A y B, izquierda) Proteína total del control, 25  $\mu$ M de BD1063- y 25  $\mu$ M de BD1063 + 25  $\mu$ M de células tratadas con MG132 (A) y del control, 25  $\mu$ M de P4- y 25  $\mu$ M de P4 + 25  $\mu$ M de MG132 (B) se utilizaron células para la inmunodetección de la proteína TRPV1 (superior) y GAPDH (inferior). (A, derecha) Los niveles medios de proteína TRPV1 fueron 55  $\pm$  5% para las células tratadas con BD1063 y 82  $\pm$  8% para las células tratadas con BD1063 + MG132. (B, derecha) Los niveles de proteína TRPV1 fueron del 68  $\pm$  6% para las células tratadas con P4 y del 93  $\pm$  6% para las células tratadas con P4 + MG132; n = 5; \* P <0.05, \*\* P = 0.01, ns, no estadísticamente significativo (Tomado de Ortíz et al, 2018).



Ya que la P4 es un ligando de mayor afinidad por receptores específicos tanto de membrana como nucleares, en este trabajo, resultó de gran relevancia evidenciar que los efectos observados no involucran a estos receptores específicos, como lo demuestra la figura 11. El panorama resultó ser más complejo, ya que, en los sistemas biológicos usados en este trabajo, células HEK293 y neuronas DRG, demostramos por experimentos de RT-PCR que la mayoría de los receptores membranales a progesterona se encuentran expresados (mPR $\alpha$ , mPR $\gamma$ , PGRMC1 y PGRMC2 se expresan en células DRG y HEK293y el receptor mPR $\epsilon$  solo se expresa en las células HEK293). Aunque los receptores nucleares no los pudimos identificar por RT-PCR convencional, quedaba la posibilidad de una expresión muy baja, que escapara a nuestro sistema de detección. Por lo tanto, cualquier de estos receptores podrían estar potencialmente implicados en los efectos de P4 sobre el TRPV1.

Los posibles efectos de los receptores nucleares (PR A/B) fueron excluidos usando un antagonista de estos receptores RU486 (mifepristona), considerando que el co-tratamiento de las células con P4 y el antagonista revirtiera la disminución de TRPV1 por efecto del esteroide, sin embargo, no se observó un rescate los niveles proteicos de TRPV1 (figura 12), e inesperadamente, el tratamiento sólo con RU486, causó gran descenso de la proteína TRPV1. Estos resultados, descartan la participación de los receptores nucleares a P4 y los efectos de RU486 son consistente con reportes que muestran que estos compuestos pueden inducir alteraciones en la homeostasis del ER y por ende, alterar también a las proteínas que se están sintetizando y plegando, que finalmente llevan la respuesta de proteínas mal plegadas y a su degradación (Jang JH, 2016, Wu ZY, 2011). Cabe resaltar que RU486 es un compuesto cuya estructura química es similar a la de progesterona, por lo tanto, RU486 podría estar actuando como un posible antagonista de Sig-1R lo cual podría explicar la disminución de los niveles de TRPV1.

Para abordar la posible participación de los receptores a P4 de membrana y debido a la complejidad de tener varios de ellos expresados en las células HEK293, se pensó en una estrategia experimental que pudiera descartar/confirmar la

participación de todos ellos. Considerando que estos receptores muestran el sitio de unión a P4 del lado extracelular, se planteó el uso de una P4 impermeable a la membrana plasmática, la cual consiste en el esteroide acoplado covalentemente a la proteína BSA; al no poder atravesar la membrana, sus posibles efectos, serían atribuidos estrictamente a la unión a un sitio extracelular. Los tratamientos con P4-BSA en células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1, no produjo cambios en los niveles de proteína TRPV1 (figura 13). Esto nos indica que es estrictamente necesaria la internalización de la progesterona para poder ejercer los efectos observados sobre el canal TRPV1 y que son producto de la interacción directa del esteroide con el Sig-1R. Los resultados anteriores mostraban que la progesterona cumple un rol importante en regular al canal TRPV1 por medio del Sig-1R, y la pregunta que a continuación surgió fue ¿cuál es el rol fisiológico de la regulación de TRPV1 por medio de la progesterona y Sig-1R? Considerando que la progesterona es un esteroide cuyos niveles pueden variar de manera considerable en estados fisiológicos como el embarazo, en el que hay un incremento en la concentración de P4, está podría ser responsable de que los umbrales de dolor en las hembras aumenten considerablemente (Dawson-Basoa & Gintzler, 1998; Dawson-Basoa & Gintzler, 1996).

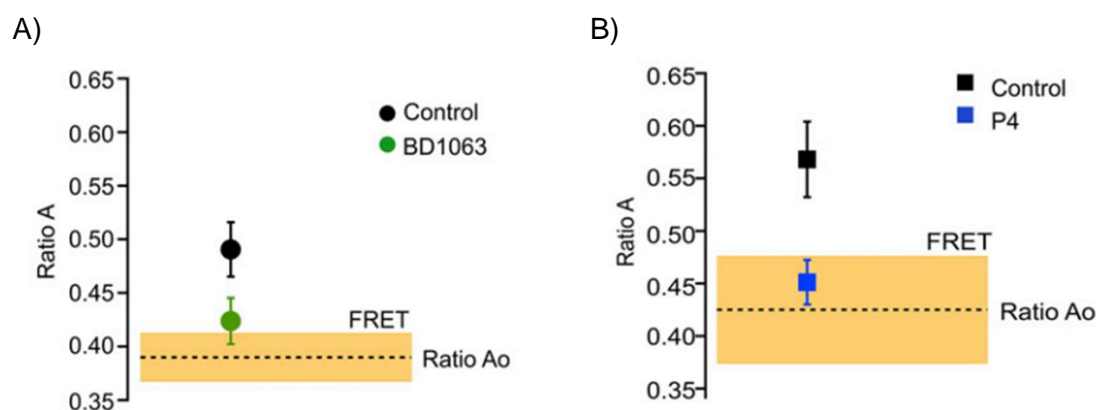
Por esta razón realizamos experimentos en los cuales determinamos si el umbral de dolor a capsaicina (activador de TRPV1) cambia en ratones hembras con 15 días de gestación en comparación de ratonas no preñadas (control). Nuestros resultados muestran claramente un aumento en el umbral al dolor asociado a la activación de TRPV1 en comparación de las hembras control. Este resultado concuerda con el resultado de los tratamientos con progesterona en donde hay un descenso en los niveles de proteína de TRPV1, ya que las hembras gestantes el aumento en P4 es un factor determinante para mantener a Sig-1R en un estado “secuestrado” (ya sea favoreciendo la formación de complejos proteicos entre Sig-1R y BiP ó promoviendo la oligomerización de Sig-1R). En concordancia con todo esto, se ha demostrado en homogenados de cerebro de ratones hembra embarazadas, que el Sig-1R se encuentra altamente “ocupado” por P4, evitando que estos sitios sean ocupados por otros ligandos del tipo sintético (Maurice et al., 1996).

Con todos estos resultados, surgió la siguiente pregunta ¿El complejo proteico entre Sig-1R y TRPV1 es menor en presencia de antagonistas del Sig-1R? Para ello fue importante demostrar que a nivel celular ambas proteínas se encuentran localizadas en los mismos compartimentos intracelulares. En la figura 15, se observa claramente que, en el sistema de expresión heterólogo, ambas proteínas altamente colocalizan en el retículo endoplasmático (empalme de las señales fluorescentes de Sig-1R y TRPV1 con calnexina) y además demostramos que no existe interacción de Sig-1R y el canal a nivel de membrana plasmática. La colocalización de ambas proteínas en el retículo endoplasmático, sugiere que la interacción de Sig-1R con TRPV1 se produce durante la síntesis y plegamiento del canal, como la mayoría de las proteínas que se origina en el retículo endoplasmático (Hayashi y Fujimoto, 2010; Su, *et al.*, 2010; Soriani, O. *et al.* 1999).

Para fortalecer el resultado anterior, fue relevante demostrar que la colocalización observada en el sistema de expresión heterólogo, también se produce en el sistema de expresión nativo de ambas proteínas. Como ya mencionamos en la introducción, Sig-1R, al igual que TRPV1, se expresa en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) (Matsumoto, 2007; Cobos *et al.*, 2008; Bangaru *et al.*, 2013; Crottès *et al.*, 2013). Específicamente la expresión de TRPV1 ha sido reportada en neuronas de tamaño pequeño o mediano (no mielinizadas o poco mielinizadas), clasificadas como fibras C o A $\delta$ , las cuales cuentan como principal característica su capacidad nociceptiva (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998; Willis y Coggeshall, 2004). El marcaje fluorescente específico para Sig-1R y TRPV1 en cultivos primarios de neuronas DRG, mostró claramente que ambas proteínas también co-localizan en este sistema celular (figura 16). Este dato muestra la estrecha relación entre estas dos proteínas y que a nivel endógeno es altamente factible una regulación del canal TRPV1 por efecto de ligandos que modifiquen la función del Sig-1R.

Nuestros experimentos de co-immunoprecipitación, confirmaron la interacción proteína-proteína entre TRPV1 y Sig-1R e interesantemente, esta interacción disminuyó en células tratadas con dos antagonistas de Sig-1R, la P4 y el compuesto

sintético, BD1063, figura 17. Estos resultados fueron confirmados paralelamente mediante ensayos tipo FRET, en los que se demostró que Sig-1R y TRPV1 interaccionan estrechamente, de tal modo que la fluorescencia producida por una de las proteínas es capaz de excitar la fluorescencia de la otra, y sobre todo, que este efecto de FRET se ve reducido por la presencia de los antagonistas de Sig-1R ya sea BD1063 ó P4 (Ortíz-Rentería et al, 2018). Estos datos son muy parecidos a un reporte reciente, en el cuál demuestran por medio de ensayos de inmunoprecipitación con construcciones del canal TRPV1 y Sig-1R como estas dos proteínas interaccionan “in vitro” y que esta interacción disminuye por la presencia de ligandos del Sig-1R como la progesterona y el antagonista sintético S1RA (Cortés-Montero, et al, 2019).



**Figura 23 FRET entre TRPV1-mCherry y Sig-1R-GFP.** La relación Ao es la excitación fraccional de mCherry en ausencia de donante (GFP), y su valor promedio se indica mediante la línea discontinua. Un valor de la relación A, cuando están presentes tanto el donante como el aceptor, mayor que la relación Ao es indicativo de FRET. La coexpresión de TRPV1 y Sig-1R produce una aparente eficiencia FRET de  $0.49 \pm 0.02$  ( $n = 17$ ). (A) La incubación de las células en presencia de  $25 \mu\text{M}$  BD1063 reduce la eficiencia aparente de FRET a  $0.42 \pm 0.02$  ( $n = 6$ ), que no es diferente de la relación Ao. (B) El tratamiento con  $25 \mu\text{M}$  de progesterona (P4) tiene un efecto similar al BD1063. La eficiencia aparente de FRET de control es  $0.57 \pm 0.03$  ( $n = 10$ ), y el tratamiento con progesterona la reduce a  $0.45 \pm 0.02$  ( $n = 10$ ) (Tomado de Ortíz et al, 2018).

Adicionalmente, con este trabajo demostramos que la región transmembranal del canal TRPV1 es determinante para la interacción con el Sig-1R, ya que la expresión de un canal truncado en los dominios amino y carboxilo terminal mantiene la formación de un complejo asociado a Sig-1R (figura 19). Este dato se asemeja a un reporte para los canales Kv1.3, en el cual se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación similares a los nuestros, con un canal Kv1.3 sin amino y carboxilo terminal el cual mostró interacción positiva con Sig-1R. (Kinoshita, M; et al 2012), la pregunta que queda al aire con este estudio y con el nuestro es determinar si la interacción de Sig-1R es en un dominio transmembranal en específico o con alguna de las asas entrantes o salientes de estos canales.

Contrastante a nuestro dato de interacción de Sig-1R con la construcción que mantiene los 6 dominios transmembranales del canal TRPV1, en un estudio reciente demuestran por medio de ensayos de inmunoprecipitación que la interacción de Sig-1R es en los dominios amino o carboxilo terminal (Cortés-Montero, et al, 2019). Sin embargo, en este estudio solo demuestran esta interacción en presencia de calcio, ya que, en la ausencia del catión divalente, no observan interacción. Por lo tanto, con esta nueva evidencia podríamos argumentar, que el modo de interactuar de Sig-1R con el canal TRPV1, es dependiente de calcio, y en su ausencia interacciona en los dominios transmembranales de TRPV1 (Ortiz-Rentería, 2018) y la presencia de calcio favorece la interacción de Sig-1R en el amino o carboxilo terminal del canal (Cortés-Montero, et al, 2019).

Por último, nos cuestionamos si Sig-1R interacciona con otro canal de la familia TRP, en este caso el canal seleccionado fue el canal TRPA1 el cual se activa por el aceite de mostaza y tiene un papel funcional en el dolor y la inflamación neurogénica. Otros estudios sugieren que TRPA1 participa en procesos sensoriales adicionales, como la sensación de frío (Simons CT, et; al 2003). En este caso se realizó un primer acercamiento y determinamos que existe co-localización del canal TRPA1 y Sig-1R en células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPA1 y en cultivos primarios neuronas DRG (figura 20 y 21). Esto nos indicó potencialmente que Sig-1R puede modular al canal TRPA1 de manera muy similar a como lo hace

con el canal TRPV1. Más aún, la interacción entre TRPA1 y Sig-1R también ha sido recientemente reportada, conjuntamente con la de Sig-1R y el canal TRPM8 (Cortés-Montero, et. al 2019), un canal también expresado en las neuronas sensoriales e importante mediador de las señales nocivas, como el frío extremo.

Las características estructurales únicas de Sig-1R probablemente respaldan sus funciones variadas. Se ha demostrado que el receptor está involucrado en varios procesos biológicos y patológicos, y se ha considerado como un objetivo terapéutico importante en muchas enfermedades del sistema nervioso central en humanos (Maurice y Lockhart, 1997; Maurice et al., 2002; Maurice y Su, 2009). Aunado a esto demostramos la interacción directa entre TRPV1 y Sig-1R reforzando el papel fisiológico de la participación de Sig-1R en la nocicepción, sobre todo en la etapa de gestación donde los altos niveles de progesterona generan que los niveles de TRPV1 disminuyan vía Sig-1R (Ortíz-Rentería, et al, 2018). En resumen, estos resultados muestran que Sig-1R interactúa directamente con TRPV1, para mantener estables los niveles proteicos del canal. También que la inhibición de función de chaperona de Sig-1R, por medio de antagonistas, reduce la interacción de TRPV1 con Sig-1R, y como consecuencia los niveles proteicos TRPV1 y el dolor asociado a este canal disminuyen (Ortíz-Rentería, et al, 2018).

Este trabajo constituyó la primera evidencia de la interacción de un canal iónico miembro de la familia TRP con Sig-1R y la regulación de los niveles proteicos de TRPV1 por medio de ligandos de Sig-1R (Ortíz-Rentería et, al., 2018).

Con nuestros datos y los de recientemente publicación por Cortés-Montero et al., se fortalece el conocimiento de cómo modular el dolor mediado por canales TRPs por medio de ligandos que afecten la funcionalidad del Sig-1R, poniendo en la mira a estos canales y a esta chaperona como blancos farmacológicos a considerar en el campo de la analgesia.

## **8. Conclusiones**

- En experimentos de “knockdown” para Sig-1R en células HEK293 disminuye los niveles proteicos de TRPV1.
- La progesterona reduce la cantidad de proteína TRPV1 de manera independiente a los receptores clásicos de este esteroide.
- Los ratones hembras gestantes presentan un mayor umbral de dolor a capsaicina en comparación con las hembras control.
- TRPV1 y Sig-1R interactúan principalmente en el retículo endoplásmico.
- Antagonistas de Sig-1R disminuyen la asociación entre el canal TRPV1 y esta chaperona.
- Sig-1R interactúa con el dominio transmembranal de TRPV1.
- TRPA1 y Sig-1R co-localizan en células HEK293 y en neuronas DRG.

## **9. Bibliografía**

Achison M, Boylan MT, Hupp TR, Spruce BA. HIF-1alpha contributes to tumour-selective killing by the sigma receptor antagonist rimcazole. *Oncogene*. 2007;26:1137–1146.

Akunne HC, Whetzel SZ, Wiley JN, Corbin AE, Ninteman FW, Tecle H, Pei Y, Pugsley TA, Heffner TG. (1997) The pharmacology of the novel and selective sigma ligand, PD 144418. *Neuropharmacology*36:51–62.

Aurélien Menigoz, Mathieu Boudes The Expression Pattern of TRPV1 in Brain *Journal of Neuroscience* 14 September 2011, 31 (37) 13025-13027; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2589-11.2011.

Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, Jackson MB. 2002. The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron*. 34:399–410.

B. Nilius / *Biochimica et Biophysica Acta* 1772 (2007) 805–812 Rosenbaum T, Simon SA. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. En: Liedtke WB, Heller S, editors. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor y Francis; 2007. Capítulo 5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5260/>

Bae S, Seong J, Paik Y. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: molecular cloning, chromosomal localization, functional expression and liver-specific gene regulation of rat sterol delta8-isomerase, a cholesterologenic enzyme with multiple functions. *Biochem J*. 2001; 353:689–699.

Balasuriya D, et al. (2014) A direct interaction between the sigma-1 receptor and the hERG voltage-gated K<sup>+</sup> channel revealed by atomic force microscopy and homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF). *J Biol Chem* 289:32353– 32363.

Bangaru, M. L., Weihrauch, D., Tang, Q. B., Zoga, V., Hogan, Q., & Wu, H. E. (2013). Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury. *Molecular pain*, 9, 47. doi:10.1186/1744-8069-9-47.

Bavassano C, Marvaldi L, Langeslag M, Sarg B, Lindner H, Klimaschewski L, Kress M, FerrerMontiel A & Hans-Günther K, 2013. Identification of voltage-gated K<sup>+</sup> channel beta 2 (Kvβ2) subunit as a novel interaction partner of the pain transducer Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel (TRPV1).

Bermack JE, Debonnel G. Effects of OPC-14523, a combined sigma and 5-HT1a ligand, on pre- and post-synaptic 5-HT1a receptors. *J Psychopharmacol*. 2007;21:85–92.

*Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Vol. 1833, P.3166–



3175.

Btsh J, Fischer MJ, Stott K, McNaughton PA, 2015. Mapping the Binding Site of TRPV1 on AKAP79: Implications for Inflammatory Hyperalgesia. *J Neurosci*. Vol. 35 P.8377.

Btsh, J., Fischer, M., Stott, K., & McNaughton, P. A. (2013). Mapping the binding site of TRPV1 on AKAP79: implications for inflammatory hyperalgesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(21), 9184–9193. doi:10.1523/JNEUROSCI.4991-12.2013.

Castany, Sílvia Gris, Georgia, Vela, José Miguel Verdú, Enrique Boadas- Vaello, Pere 2018 Critical role of sigma-1 receptors in central neuropathic pain- related behaviours after mild spinal cord injury in mice *Scientific Reports* 3873-8

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*. Vol.389 P. 816-824.

Chen Y, Hajipour AR, Sievert MK, Arbabian M, Ruoho AE. Characterization of the cocaine binding site on the sigma-1 receptor. *Biochemistry*. 2007;46:3532– 3542.

Ciardo MG, et al. (2016) Whirlin increases TRPV1 channel expression and cellular stability. *Biochim Biophys Acta* 1863:115–127.

Clapham, DE, 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. Vol. 426 P.517- 24.

Cobos, E. J., Entrena, J. M., Nieto, F. R., Cendán, C. M., & Del Pozo, E. (2008). Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Current neuropharmacology*, 6(4), 344–366. doi:10.2174/157015908787386113.

Cortés-Montero Elsa, Sánchez-Blázquez Pilar, Onetti Yara, Merlos Manuel, Garzón Javier *Ligands Exert Biased Activity to Regulate Sigma 1 Receptor Interactions With Cationic TRPA1, TRPV1, and TRPM8 Channels*. *Frontiers in Pharmacology* Volume 10 2019 pp.634

Crottès D, et al. (2011) Sig1R protein regulates hERG channel expression through a post-translational mechanism in leukemic cells. *J Biol Chem* 286:27947–27958.

Daniel Tracey, “Nociception”, *Current Biology* 27, R123–R138, February 20, 2017.

Dawson-Basoa M, Gintzler AR (1998) Gestational and ovarian sex steroid antinociception: Synergy between spinal kappa and delta opioid systems. *Brain Res* 794: 61–67.

Dawson-Basoa ME, Gintzler AR (1996) Estrogen and progesterone activate spinal kappa-opiate receptor analgesic mechanisms. *Pain* 64:608–615.

Dermot J. Kelly, Mahmood Ahmad and Brull Sorin J. 2001. Preemptive Analgesia I: Physiological Pathways and Pharmacological Modalities. *Can J. Anesth*, 48:10, 1000-1010. *differentiation*". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101 (41): 14949–54.

Dun Y, Thangaraju M, Prasad P, Ganapathy V, Smith SB. Prevention of excitotoxicity in primary retinal ganglion cells by (+)-pentazocine, a sigma receptor-1 specific ligand. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:4785–4794.

E. D., Samelson, B. K., Belugin, S., Akopian, A. N., Scott, J. D., & Jeske, N. A. (2010). PP2B/calcieneurin-mediated desensitization of TRPV1 does not require AKAP150. *The Biochemical Journal*, 432(3), 549–556.

Ellis RJ (July 2006). "*Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding*". *Trends in Biochemical Sciences*. **31** (7): 395–401.

Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendán CM, Gris G, Del Pozo E, Zamanillo D, Baeyens JM., 2009. Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: Studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *PAIN*. Vol.143 P.252-261.

Erler et al., 2004. 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* 279:34456–34463

Fontanilla D, Hajjipour AR, Pal A, Chu UB, Arbabian M, Ruoho AE. Probing the steroid binding domain-like I (SBDLI) of the sigma-1 receptor binding site using N-substituted photoaffinity labels. *Biochemistry*. 2008;47:7205–7217.

Gao, X. F., Yao, J. J., He, Y. L., Hu, C., & Mei, Y. A. (). Sigma-1 receptor agonists directly inhibit Nav1.2/1.4 channels. *PloS one*, 7(11), e49384. doi:10.1371/journal.pone.0049384.

Gold M. S., Gebhart G. F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat. Med.* 16, 1248–1257.

Gold MS, Gebhart GF. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med*. 2010;16:1248–1257.

Goyagi T, Goto S, Bhardwaj A, Dawson VL, Hurn PD, Kirsch JR. Neuroprotective effect of sigma(1)-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is linked to reduced neuronal nitric oxide production. *Stroke*. 2001;32:1613– 1620.

Gray NM, et al. H1 antihistamines interact with central sigma receptors. *Life Sci*. 1990;47:175–180.

Gris G, Portillo-Salido E, Aubel B, Darbaky Y, Deseure K, Vela JM, Merlos M,

Zamanillo D. The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats. *Sci Rep.* 2016;6:24591.

Hanner, M., Moebius, F. F., Flandorfer, A., Knaus, H. G., Striessnig, J., Kempner, E., & Glossmann, H. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 8072–8077. doi:10.1073/pnas.93.15.8072.

Hayashi T, Su TP (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell* 131:596–610.

Hayashi T, Su TP (Oct 2004). "*Sigma-1 receptors at galactosylceramide- enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte*

Hayashi T, Su TP. An update on the development of drugs for neuropsychiatric disorders: focusing on the sigma 1 receptor ligand. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12:5–58.

Hayashi T., Su T. P. (2003). Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft- like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306 718–725. 10.1124/jpet.103.051284.

Hayashi, T., & Fujimoto, M., 2010. Detergent-resistant microdomains determine the localization of  $\sigma$ -1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Molecular pharmacology*, 77(4), 517-528.

Hayashi, T., 2015. Conversion of psychological stress into cellular stress response: Roles of the sigma-1 receptor in the process. *Psychiatry and clinical neurosciences*, 69(4), 179-191.

Hille B.2001. Ion channels of excitable membranes. Sunderland Massachusetts, USA. *Ed Sinauer Associates, Inc.* 3rd ed. inhibit tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 64, 4875–4886 10.1158/0008-5472.CAN-03-3180.

J. Tamargo, M.M. Tamkun, C. Valenzuela, Assembly with the Kvbeta1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 1456– 1463.

J.P. Beekwilder, M.E. O'Leary, L.P. van den Broek, G.T. van Kempen, D.L. Ypey, T. Gonzalez, R. Navarro-Polanco, C. Arias, R. Caballero, I. Moreno, E. Delpon, S Pillozzi, MF Brizzi, M Balzi, O Crociani, A Cherubini, L Guasti, B Bartolozzi, A Becchetti, E Wanke, PA Bernabei, M Olivotto, L Pegoraro & A Arcangeli , HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia* 16, 1791–1798 (2002).

Jang JH, Min KJ, Kim S, Park JW, Kwon TK (2016) RU486 induces pro- apoptotic endoplasmic reticulum stress through the induction of CHOP expression by

enhancing C/EBP $\delta$  expression in human renal carcinoma Caki cells. *J Cell Biochem* 117:361–369.

JOHN N C., VILNER B., BOWEN W. Synthesis and characterization of [ $^{125}$ I]-N- (N-Benzylpiperidin-4-yl)-4-iodobenzamide, a new  $\sigma$  receptor radiopharmaceutical: High-affinity binding to MCF-7 breast tumour cells. *J. Med. Chem.* 1994;37:1737–1739.

Juarez, R (2016) "Regulación del canal TRPV1 por efecto del receptor Sigma 1" Facultad de ciencias UNAM, México.

Jung, J., Shin, J. S., Lee, S. Y., Hwang, S. W., Koo, J., Cho, H., & Oh, U. (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7048- 7054.

Kwon, Y. B., Jeong, Y. C., Kwon, J. K., Son, J. S., & Kim, K. W. (2009). The Antinociceptive Effect of Sigma-1 Receptor Antagonist, BD1047, in a Capsaicin Induced Headache Model in Rats. *The Korean journal of physiology*

Lainez, S., Valente, P., Ontoria-Oviedo, I., Estevez-Herrera, J., Camprubi-Robles, M., Ferrer-Montiel, A., and Planells-Cases, R. (2010). GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *FASEB J* 24, 1958-1970.

Lever, J. R., Miller, D. K., Ferguson-Cantrell, E. A., Green, C. L., Watkinson, L. D., Carmack, T. L., & Lever, S. Z. (2014). Relationship between cerebral sigma-1 receptor occupancy and attenuation of cocaine's motor stimulatory effects in mice by PD144418. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 351(1), 153–163. doi:10.1124/jpet.114.216671

Liedtke & Heller. (2007); TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades, Florida: CRC Press.

Liu Y, Chen GD, Lerner MR, Brackett DJ, Matsumoto RR. Cocaine up-regulates Fra-2 and sigma-1 receptor gene and protein expression in brain regions involved in addiction and reward. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:770–779.

M.D.Provenzano, E.K.Fujimoto, N.M.Goeke, B.J.Olson, D.C.Klenk (1985) *Measurement of protein using bicinchoninic acid*, Analytical Biochemistry, Volume 150, Issue 1, Pages 76-85

Marrazzo A, Caraci F, Salinaro ET, Su TP, Copani A, Ronsisvalle G. Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against beta-amyloid-induced toxicity. *Neuroreport.* 2005;16:1223–1226.

Martin-Fardon R, Maurice T, Aujla H, Bowen WD, Weiss F. Differential effects of sigma1 receptor blockade on self-administration and conditioned reinstatement

Matsumoto, R. R., 2007.  $\sigma$  Receptors: historical perspective and background. In *Sigma Receptors* (pp. 1-23). Springer US.

Maurice T, Su TP, Privat A (1998) Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience* 83:413–428.

Maurice T. Neurosteroids and sigma1 receptors, biochemical and behavioral relevance. *Pharmacopsychiatry*. 2004;37(Suppl 3):S171–S182.

Mavylutov, T., Chen, X., Guo, L., & Yang, J. (2018). APEX2- tagging of Sigma 1-receptor indicates subcellular protein topology with cytosolic N-terminus and ER luminal C-terminus. *Protein & cell*, 9(8), 733–737. doi:10.1007/s13238-017- 0468-5.

Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A, Holme RH, Rump A, Hardisty RE, Blanchard S, Coimbra RS, Perfettini I, Parkinson N, Mallon AM, Glenister P, Rogers MJ, Paige AJ, Moir L, Clay J, Rosenthal A, Liu XZ, Blanco G, Steel KP, Petit C, Brown SD (Aug de 2003). «Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31». *Nat Genet* 34 (4): 421-8.

McCann DJ, Su TP. Sigma-1 and sigma-2 sites in rat brain: comparison of regional, ontogenetic and subcellular patterns. *Synapse*. 1994;17:182-9.

McEntire, D. M., Kirkpatrick, D. R., Dueck, N. P., Kerfeld, M. J., Smith, T. A., Nelson, T. J., Agrawal, D. K. (2016). Pain transduction: a pharmacologic perspective. *Expert review of clinical pharmacology*, 9(8), 1069–1080. doi:10.1080/17512433.2016.1183481.

Mei J, Pasternak GW. Modulation of brainstem opiate analgesia in the rat by sigma 1 receptors: a microinjection study. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322:1278–1285.

Merlos M., Burgueño J., Portillo-Salido E., Plata-Salamán C.R., Vela J.M. (2017) Pharmacological Modulation of the Sigma 1 Receptor and the Treatment of Pain. In: Smith S., Su TP. (eds) *Sigma Receptors: Their Role in Disease and as Therapeutic Targets*. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 964. Springer, Cham.

Merulla J, Fasana E, Soldà T, Molinari M (2013) Specificity and regulation of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *Traffic* 14:767– 777.

Minke, 1977. Drosophila Mutant with a Transducer Defect. *Biophys. Struct. Mechanism*. P.59-64.

Mishra AK, et al. (2015) The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. *Biochem J* 466: 263–271.

Moebius, F. F., Bermoser, K., Reiter, R. J., Hanner, M., & Glossmann, H., 1996. Yeast sterol C8-C7 isomerase: identification and characterization of a high-affinity binding site for enzyme inhibitors. *Biochemistry*, 35(51), 16871-16878.

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.

Moran, M. M., Xu, H., & Clapham, D. E., 2004. TRP ion channels in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 14(3), 362-369. motivated by cocaine vs natural reward. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:1967–1973.

Nakazawa M, Matsuno K, Mita S. Activation of sigma1 receptor subtype leads to neuroprotection in the rat primary neuronal cultures. *Neurochem Int*. 1998;32:337–343.

Narita N, Hashimoto K, Tomitaka S, Minabe Y. Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of sigma receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 1996;307:117–119.

Nilius & Flockerzi, 2014. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) cation channels. Edit. Springer.

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

Ortega-Roldan JL, Ossa F, Schnell JR (2013) Characterization of the human sigma-1 receptor chaperone domain structure and binding immunoglobulin protein (BiP) interactions. *J Biol Chem* 288:21448–21457.

Ortiz-Renteria, M., Juarez-Contreras, R., Gonzalez-Ramirez, R., Islas, L. D., Sierra Ramirez, F., Llorente, I., et al. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E1657–E1666.

P.K.Smith, R.I.Krohn, G.T.Hermanson, A.K.Mallia, F.H.Gartner Pabba M, et al. NMDA receptors are upregulated and trafficked to the plasma membrane after sigma-1 receptor activation in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014;34:11325–11338.

Pal A, Chu UB, Ramachandran S, Grawoig D, Guo LW, Hajipour AR, Ruoho AE. Juxtaposition of the steroid binding domain-like I and II regions constitutes a ligand binding site in the sigma-1 receptor. *J Biol Chem*. 2008;283:19646–19656.

Pal A, Hajipour AR, Fontanilla D, Ramachandran S, Chu UB, Mavlyutov T, Ruoho AE. Identification of regions of the sigma-1 receptor ligand binding site using a novel

photoprobe. *Mol Pharmacol.* 2007;72:921–933.

Palmer CP, Mahen R, Schnell E, Djamgoz MB, Aydar E. Sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 2007;67:11166–11175. *pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 13(6), 425–429. doi:10.4196/kjpp.2009.13.6.425

Picazo-Juarez, G., Romero-Suarez, S., Nieto-Posadas, A., Llorente, I., Jara Oseguera, A., Briggs, M., & Rosenbaum, T., 2011. Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 24966-24976.

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

R.J. van den Berg, Kv1.1 channels of dorsal root ganglion neurons are inhibited by n-butyl-p-aminobenzoate, a promising anesthetic for the treatment of chronic pain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304 (2003) 531–538.

Renaudo A, L'Hoste S, GuizouRNA H, Borgese F, Soriani O. Cancer cell cycle modulated by a functional coupling between sigma-1 receptors and Cl<sup>-</sup> channels. *J Biol Chem.* 2007;282:2259–2267.

RNAiges M, Fernandez-Fernandez JM, Albrecht N, Schaefer M & Valverde MA 2006 Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin

Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE. PI(4,5)P<sub>2</sub> regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):626–34.

Romero L, Manuel M, José Miguel V, (2016), Antinociception by Sigma-1 Receptor Antagonists: Central and Peripheral Effects. *Pharmacological Mechanisms and the Modulation of Pain*, Chapter 7 Volume 75 pages 179-215.

Romero, L., Zamanillo, D., Nadal, X., Sánchez-Arroyos, R., Rivera-Arconada, I., Dordal, A., ... Vela, J. M. (2012). Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *British journal of pharmacology*, 166(8), 2289–2306. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01942.x.

Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., & Gordon, S. E. (2004). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *The Journal of general physiology*, 123(1), 53–62.

Roth MD, Whittaker KM, Choi R, Tashkin DP, Baldwin GC. Cocaine and sigma-1 receptors modulate HIV infection, chemokine receptors, and the HPA axis in the

huPBL-SCID model. *J Leukoc Biol.* 2005;78:1198–1203.

Rouvette, T., Avenali, L., Sondermann, 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.

Samelson, B. K., Gore, B. B., Whiting, J. L., Nygren, P. J., Purkey, A. M., Colledge, M., & Scott, J. D., 2015. A-kinase anchoring protein 79/150 recruits protein kinase C to phosphorylate roundabout receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 14107-14119.

Schmidt HR, et al. (2016) Crystal structure of the human  $\sigma_1$  receptor. *Nature* 532: 527–530.

Sekiguchi F., Tsubota M., Kawabata A. (2018). Involvement of voltage-gated calcium channels in inflammation and inflammatory pain. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 1127–1134. 10.1248/bpb.b18-00054.

Seth P, Ganapathy ME, Conway SJ, Bridges CD, Smith SB, Casellas P, Ganapathy V (2001) Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand-binding domain of the receptor. *Biochim Biophys Acta* 1540 (1):59–67.

Smith SB, Duplantier J, Dun Y, Mysona B, Roon P, Martin PM, Ganapathy V. In vivo protection against retinal neurodegeneration by sigma receptor 1 ligand (+)-pentazocine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:4154–4161.

Soriani, O. et al. (1999) A-Current down-modulated by sigma receptor in frog pituitary melanotrope cells through a G protein-dependent pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 321–328.

Spruce B. A., Campbell L. A., McTavish N., Cooper M. A., Appleyard M. V., O'Neill M., et al. (2004). Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and

Su, T. P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., & Ruoho, A. E., 2010. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in pharmacological sciences*, 31(12), 557-566.

Szallasi, A., & Blumberg, P.M. 2007. Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. En: Liedtke WB, Heller S, editors. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor y Francis; 2007. Chapter 6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5246/>

Szallasi, A., & Blumberg, P.M. 2007. Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. En: Liedtke WB, Heller S, editors. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor y Francis;



2007. Chapter 6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5246/>

Tchedre KT, Huang RQ, Dibas A, Krishnamoorthy RR, Dillon GH, Yorio T. (2008) Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*49:4993–5002.

Tchedre KT, Yorio T. Sigma-1 receptors protect RGC-5 cells from apoptosis by regulating intracellular calcium, Bax levels, and caspase-3 activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:2577–2588.

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

Ulfenius C, Linderöth B, Meyerson BA, Wallin J. Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci Lett* 2006;399:85–90.

Vilner BJ, John CS and Bowen WD (1995b) Sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 55:408–413.

Willis y Coggeshall. 2004. Sensory mechanisms of the spinal cord. Vol. 1 Primary Afferent Neurons and the Spinal Dorsal Horn. 3era ed. Edit. Kluwer Academic/ Plenum Publishers.

Wilson, Buffa y Lou, 2007. Física Edit. Pearson. Pp. 553.

Wu ZY, Yu DJ, Soong TW, Dawe GS, Bian JS (2011) Progesterone impairs human ether-a-go-go-related gene (HERG) trafficking by disruption of intracellular cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 286:22186–22194.

Zamanillo D., Romero L., Merlos M., Vela J.M., 2013. Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. *Eur. J. Pharmacol.* 716, 78-93.

Zhang X, Li L, McNaughton PA. Proinflammatory Mediators Modulate the Heat-Activated Ion Channel TRPV1 via the Scaffolding Protein AKAP79/150. *Neuron.* 2008;59:450–461.

Zhang, K., Zhao, Z., Lan, L., Wei, X., Wang, L., Liu, X., ... Zheng, J. (2017). Sigma-1 Receptor Plays a Negative Modulation on N-type Calcium Channel. *Frontiers in pharmacology*, 8, 302. doi:10.3389/fphar.2017.00302.

Zheng, J. (2013). Molecular Mechanism of TRP Channels. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 22



# TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain

Miguel Ortiz-Rentería<sup>a</sup>, Rebeca Juárez-Contreras<sup>a</sup>, Ricardo González-Ramírez<sup>b</sup>, León D. Islas<sup>c</sup>, Félix Sierra-Ramírez<sup>a</sup>, Itzel Llorente<sup>a</sup>, Sidney A. Simon<sup>d</sup>, Marcia Hiriart<sup>a</sup>, Tamara Rosenbaum<sup>a</sup>, and Sara L. Morales-Lázaro<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, Ciudad de México, México; <sup>b</sup>Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Secretaría de Salud, 14080 Tlalpan, Ciudad de México, México; <sup>c</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Coyoacán, Ciudad de México, México; and <sup>d</sup>Department of Neurobiology, Duke University, Durham, NC 27710

Edited by Ramon Latorre, Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile, and approved January 2, 2018 (received for review September 12, 2017)

**The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) ion channel is expressed in nociceptors where, when activated by chemical or thermal stimuli, it functions as an important transducer of painful and itch-related stimuli. Although the interaction of TRPV1 with proteins that regulate its function has been previously explored, their modulation by chaperones has not been elucidated, as is the case for other mammalian TRP channels. Here we show that TRPV1 physically interacts with the Sigma 1 Receptor (Sig-1R), a chaperone that binds progesterone, an antagonist of Sig-1R and an important neurosteroid associated to the modulation of pain. Antagonism of Sig-1R by progesterone results in the down-regulation of TRPV1 expression in the plasma membrane of sensory neurons and, consequently, a decrease in capsaicin-induced nociceptive responses. This is observed both in males treated with a synthetic antagonist of Sig-1R and in pregnant females where progesterone levels are elevated. This constitutes a previously undescribed mechanism by which TRPV1-dependent nociception and pain can be regulated.**

TRPV1 | chaperone | pain | sigma 1 receptor | progesterone

Nociception is a neuronal process initiated by the activation of specialized sensory receptors that enable the detection of noxious stimuli. Activation of specialized receptors in the plasma membrane of nociceptors leads to the generation of electrical and chemical signals that reach the central nervous system, providing information on potentially hazardous situations (1).

Among these molecular sensors is TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), a nonselective cation channel that plays important roles in the transduction of noxious stimuli such as high temperatures ( $\geq 42$  °C), extracellular acidic pH, mechanical damage, exogenous chemical stimuli such as capsaicin (2), and endogenous compounds like anandamide and lysophosphatidic acid, by-products derived from the lipoxigenase pathway and ATP (3) that are released during inflammation and tissue injury. When TRPV1 is activated by such stimuli, the resulting physiological responses are pain and/or itch (2, 4).

For these reasons, the TRPV1 channel has become an important pharmacological target for the treatment of these pathophysiological processes (5, 6). Thus, research has been geared toward identifying endogenous inhibitors of TRPV1's activation, for example, cholesterol and oleic acid, which directly bind to TRPV1 and reduce the open probability of the channel ( $P_o$ ), thus rendering it refractory to stimulation by agonists (7, 8).

Another mechanism by which the activity of TRPV1 can be regulated is through its interaction with proteins that may alter its function and/or trafficking to the plasma membrane. Among such proteins are the A-kinase anchor protein (AKAP79/150) (9), GABAA receptor-associated protein (10), beta 2 subunit of voltage-gated K<sup>+</sup> channel (Kv $\beta$ 2) (11), and the ankyrin-rich membrane-spanning protein/kinase D-interacting substrate adaptor protein (ARMS) (12). Another protein with which TRPV1 interacts is Whirlin, a cytoskeletal PDZ scaffold protein that increases ion channel expression and stability (13). However, to date, the

interactions of TRPV1 with proteins such as chaperones that could potentially regulate trafficking to the plasma membrane, as well as the physiological implications of this regulation, have not been described.

A human chaperone with a recently resolved crystal structure is the Sigma 1 receptor (Sig-1R) (14). This endoplasmic reticulum (ER)-resident chaperone is the only one known to be ligand-operated (15); its ligands can be either synthetic or endogenously produced and can function as agonists [e.g., *N,N* dimethyltryptamine and PRE-084 (16, 17)] or antagonists [e.g., BD1063 and progesterone (P4) (18)]. Although Sig-1R is an ER-resident chaperone, under certain conditions, such as cocaine exposure (19) or binding of other agonists (20), this protein may translocate to the plasma membrane, where it interacts with G-coupled protein receptors (GPCRs) (21) and some ion channels (19, 22–24).

Sig-1R is also an important mediator of pain, since in animal models the use of synthetic antagonists results in the attenuation of pain (25). However, the mechanism by which Sig-1R modulates pain attenuation is currently unresolved, and the molecular mechanisms by which this chaperone modulates pain through TRPV1 (or any other TRP channel) have not been elucidated.

P4, a natural antagonist of Sig-1R (26), is a neurosteroid with pleiotropic effects, which include neuroprotection through the inhibition of some voltage- and ligand-gated ion channels (27) and repair after several types of brain injury (28), and also promotes myelin repair by Schwann cells (29).

## Significance

**The TRPV1 ion channel has been widely associated with the generation of painful responses. The responses of cells expressing this ion channel and, presumably, the overall pain response of an organism may be regulated by controlling the amount of TRPV1 channels in the plasma membrane. TRPV1 levels can be regulated by its interaction with intracellular proteins, but there are no studies describing TRPV1 or any other mammalian TRP channel's association with chaperones or how these interactions may affect the perception of pain. Here, we show that TRPV1-dependent pain is decreased through Sig-1R antagonism by progesterone and determine the presence of a physical interaction between these two proteins that may reduce pain under physiological conditions such as pregnancy.**

Author contributions: S.L.M.-L. designed research; M.O.-R., R.J.-C., R.G.-R., L.D.I., F.S.-R., I.L., T.R., and S.L.M.-L. performed research; M.O.-R., R.J.-C., R.G.-R., L.D.I., T.R., and S.L.M.-L. analyzed data; and L.D.I., S.A.S., M.H., T.R., and S.L.M.-L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. Email: saraluzm@ifc.unam.mx.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1715972115/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1715972115/-DCSupplemental).

In some neuropathic pain animal models, P4 has also been shown to reduce pain (30). In experiments using Sig-1R–knockout mice or mice treated with Sig-1R antagonists (like BD1063), an inhibition of capsaicin-induced mechanical hypersensitivity was observed, but no link to actions of P4 on TRPV1 through Sig-1R have been proposed (31).

Here we studied the role of Sig-1R in the modulation of TRPV1 and the consequences of this modulation on pain processes associated with the functioning of this ion channel. Specifically, in mice we show that pain associated with TRPV1 activation by capsaicin is decreased by BD1063.

We also demonstrate that both endogenous and synthetic inhibitors of Sig-1R, P4 and BD1063, respectively, down-regulate TRPV1 expression in dorsal root ganglion (DRG) neurons and in a heterologous expression system through a mechanism that involves protein degradation by a proteasome-dependent pathway. Moreover, knockdown experiments using a specific siRNA for Sig-1R show that TRPV1 levels at the plasma membrane are decreased and that TRPV1 and Sig-1R form protein–protein interactions that are disrupted by Sig-1R antagonists such as P4 and BD1063. Finally, we show that capsaicin-induced pain is decreased in pregnant female mice, a condition in which P4 levels are elevated (32). In summary, disruption of the association of Sig-1R with TRPV1 by synthetic or natural antagonists leads to degradation of TRPV1 protein and to decreased levels of the ion channel protein as well as to a decrease in TRPV1-associated pain.

## Results

**Pain-Related Behavior in Response to Capsaicin Is Diminished by the Antagonism of Sig-1R.** Given that Sig-1R has been associated with capsaicin-induced mechanical hypersensitivity (31, 33), we first tested whether these effects, which had not been directly linked to changes in TRPV1 activity or expression, can be explained by a role of Sig-1R on TRPV1-mediated pain processes.

We began by assessing whether treatment of mice with BD1063 (32 mg/kg) for 24 h before pain-assessment assays would reduce capsaicin responses. For these experiments, mice were injected intrascapularly with BD1063 24 h before injection of capsaicin (2.8  $\mu$ g) into one hind paw, and the total paw-licking time (PLT) was evaluated over a period of 10 min. The results from these experiments (Fig. 1A) show that pretreatment with BD1063 produced a significant decrease ( $52 \pm 8\%$ ) in the capsaicin-associated pain response, demonstrating that antagonism of Sig-1R modifies the TRPV1-dependent painful response.

### Regulation of TRPV1 Protein Expression Levels by Sig-1R Antagonists.

To determine if changes in the pain responses to capsaicin after treatment with BD1063 were due to changes of TRPV1 levels in

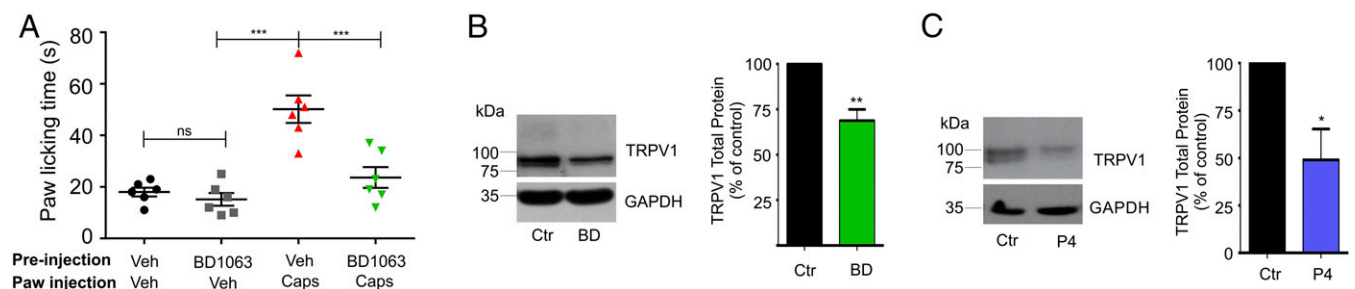
the sensory cells where it is expressed, we performed experiments where we initially confirmed the expression of Sig-1R in mice DRGs and trigeminal ganglia (TG) (Fig. S1A). Then we evaluated TRPV1 protein levels in DRGs obtained from control and BD1063-treated (32 mg/kg) mice and found that 24 h after the injection of vehicle and BD1063 there was a  $31 \pm 6\%$  decrease in total TRPV1 protein levels in animals treated with BD1063 compared with control animals (Fig. 1B).

As with BD1063, we found that exposure of DRG neurons to 25  $\mu$ M P4 for 24 h resulted in a  $43 \pm 14\%$  decrease in TRPV1 protein levels compared with the control experiments (Fig. 1C), thus showing, in native neurons, a relevant role for this natural steroid in the regulation of TRPV1 expression.

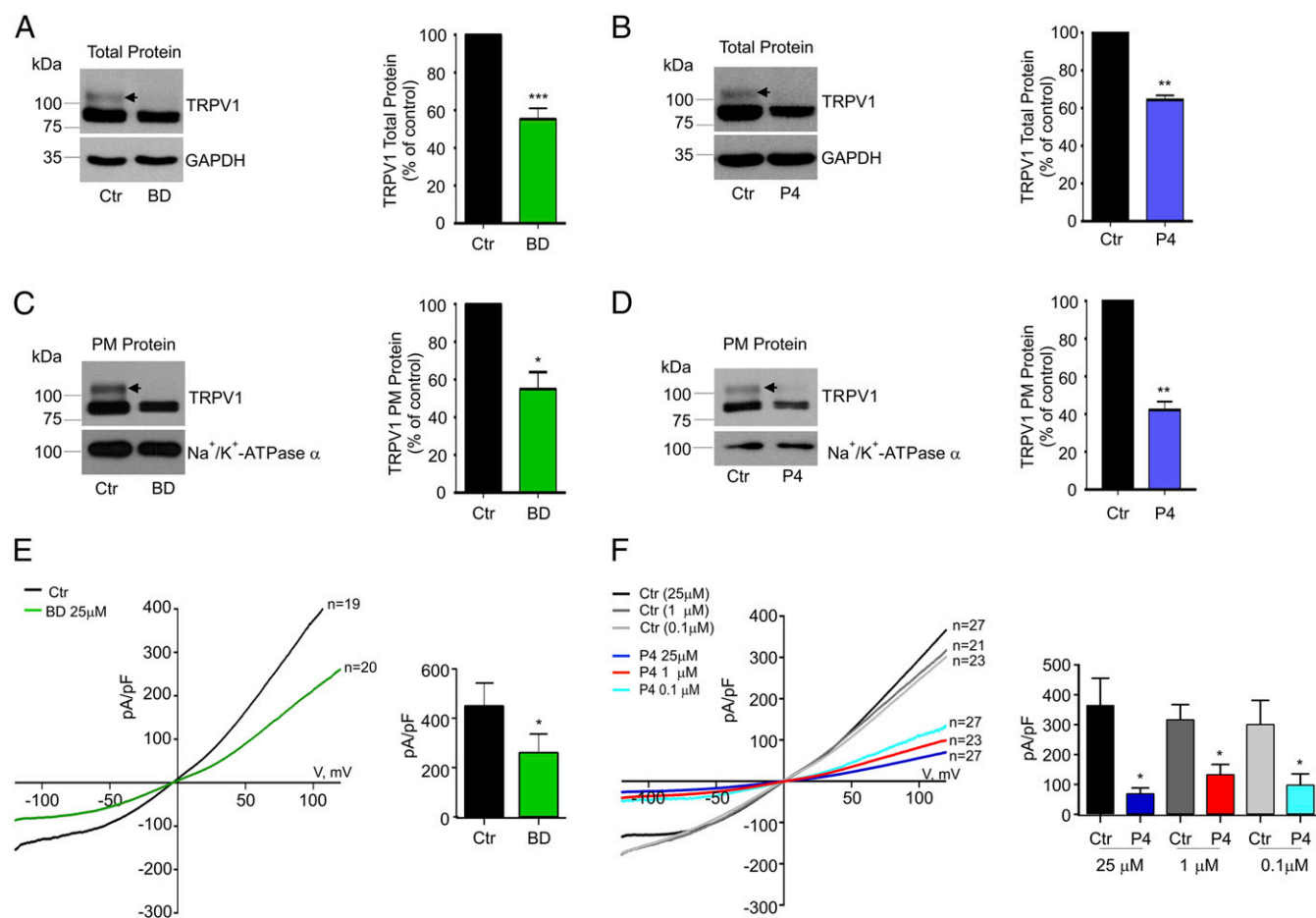
To better elucidate the mechanisms by which Sig-1R produces changes in TRPV1 expression, we transiently transfected rat TRPV1 in HEK293 cells, which normally express Sig-1R (Fig. S1A). HEK293 cells were cultured in the presence of BD1063 (25  $\mu$ M) or with P4 (25  $\mu$ M) for 24 h and were evaluated for TRPV1 total and plasma membrane protein levels. The data show that in control cells the TRPV1 protein is detected as a double band (Fig. 2A–D, arrows), a result in agreement with the previously reported core and hyperglycosylated (in residue N604) forms of rat TRPV1 (34, 35).

Fig. 2A and B shows that, compared with controls, cells treated with BD1063 or P4 exhibit diminished total TRPV1 protein levels ( $45 \pm 5\%$  for BD1063 and  $35 \pm 2\%$  for P4). With regard to TRPV1 protein in the plasma membrane, we found that, relative to control cells, BD1063 produced a  $45 \pm 9\%$  decrease (Fig. 2C) while P4 decreased these levels by  $69 \pm 5\%$  (Fig. 2D). Note that BD1063 and P4 produce more prominent decreases in the hyperglycosylated form (or mature protein) of TRPV1 than in the core form of TRPV1. This indicates that when Sig-1R is antagonized the core or immature form of the ion channel remains in the ER, and, consequently, it does not transit to the Golgi apparatus where it is hyperglycosylated.

To demonstrate that this effect is not due to the fact that the concentration of loaded protein was below detection limits, we performed experiments where the total protein concentration of TRPV1 was varied (20, 40, 60, and 80  $\mu$ g) for channel immunodetection and found that in cells treated with P4 or BD1063 the hyperglycosylated form of TRPV1 decreased, thus suggesting that the hyperglycosylated form of TRPV1 is more affected by these treatments (Fig. S2A and B). Additional experiments to quantify the hyperglycosylated and core forms of TRPV1 revealed that treatment with BD1063 produced 56% and 22% decreases in the hyperglycosylated and core forms, respectively (Fig. S2A). Similarly, P4 produced a 40% and a 10% decrease, respectively, in the hyperglycosylated and core forms (Fig. S2B). These experiments



**Fig. 1.** TRPV1-mediated pain is dependent upon Sig-1R activity. (A) Response to 2.8- $\mu$ g capsaicin injection into the hind paw of male mice that had been pretreated for 24 h by intrascapularly injecting either vehicle (water) or a Sig-1R antagonist (BD1063) (32 mg/kg in water). PLT in response to capsaicin were  $50 \pm 5$  s for vehicle-pretreated ( $n = 6$ ) and  $24 \pm 4$  s for BD1063-pretreated ( $n = 6$ ) mice;  $***P < 0.0001$ ; ANOVA. PLT for mice injected only with vehicle or BD1063 were  $19 \pm 3$  s and  $16 \pm 4$  s, respectively; nonsignificant (ns), ANOVA. (B) Isolation of total protein from mouse DRGs injected 24 h before with vehicle (water) or with BD1063 (BD) (32 mg/kg) for TRPV1 and GAPDH (loading control) immunodetection. Normalized data are  $69 \pm 6\%$  for BD1063 vs. control (Ctrl),  $n = 3$ ;  $**P < 0.001$ , Student's *t* test. (C) Primary cultures of DRG neurons from mice treated with 25  $\mu$ M P4 in 0.25% methanol for 24 h and from control cultures (0.25% methanol). Total protein was analyzed by Western blot (WB) for immunodetection of TRPV1 and GAPDH. The mean value for total TRPV1 protein in P4-treated cultures was  $57 \pm 14\%$ ;  $n = 4$ ;  $*P < 0.05$ , Student's *t* test.



**Fig. 2.** Antagonism of Sig-1R leads to changes in TRPV1 expression in HEK293 cells. (A and B, *Left*) Immunodetection of TRPV1 and GAPDH total proteins from HEK293 cells expressing TRPV1 treated for 24 h with 25  $\mu$ M BD1063 (BD) (A) or P4 (B) and control (Ctr) [water in A; methanol (0.25%) in B]. (A, *Right*) Mean values of TRPV1 for the BD group were  $55 \pm 6\%$  ( $n = 14$ ) with respect to control.  $***P < 0.001$ , Student's *t* test. (B, *Left*) Mean values of TRPV1 for P4 treatments were  $65 \pm 2\%$  ( $n = 21$ ) with respect to control ( $n = 28$ ).  $**P < 0.01$ , Student's *t* test. (C and D, *Left*) Plasma membrane (PM) proteins from control and 25  $\mu$ M BD1063-treated cells (C) and P4-treated cells (D) were isolated for immunodetection of TRPV1 and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  (load control). (C, *Right*) PM TRPV1 mean values for BD1063 condition yielded  $55 \pm 9\%$  with respect to control; ( $n = 3$ );  $*P < 0.05$ , Student's *t* test. (D, *Right*) For P4 treatments, PM TRPV1 levels were  $41 \pm 5\%$ ; ( $n = 3$ );  $**P < 0.001$ , Student's *t* test. Arrows point to the hyperglycosylated TRPV1 form, which decreases with BD1063 and P4 treatments. (E, *Left*) Average current-density plots from TRPV1-expressing HEK293 cells on the current density evoked by 4  $\mu$ M capsaicin under control and BD1063-treated conditions. (*Right*) Averaged current density at +120 mV was  $451 \pm 91$  pA/pF for control (water) ( $n = 19$ ) and  $261 \pm 74$  pA/pF for BD1063 treatment ( $n = 20$ ).  $*P = 0.05$ ; Student's *t* test. (F, *Left*) Average current-density plots from TRPV1-expressing HEK293 cells on current density evoked by 4  $\mu$ M capsaicin under control and P4-treated conditions. (*Right*) The averaged current density at +120 mV for control cells treated for 24 h with 0.25% methanol:  $375 \pm 87$  pA/pF (black bar;  $n = 27$ ); for control cells treated for 24 h with 0.01% methanol:  $317 \pm 49$  pA/pF (gray bar;  $n = 21$ ); for control cells treated for 24 h with 0.0001% methanol:  $322 \pm 85$  pA/pF (light gray bar;  $n = 23$ ); for cells treated for 24 h with 25  $\mu$ M P4:  $67 \pm 17$  pA/pF (dark blue bar;  $n = 27$ ); for cells treated for 24 h with 134  $\pm 33$  pA/pF (red bar;  $n = 23$ ); and for cells treated for 24 h with 0.1  $\mu$ M P4:  $99 \pm 36$  pA/pF (aqua bar;  $n = 27$ ).  $*P < 0.01$  Student's *t* test.

demonstrate that the hyperglycosylated form of TRPV1 is the one that is most affected by treatment with Sig-1R antagonists.

As a control, to demonstrate that not all membrane proteins are affected by the antagonism of Sig-1R, we performed experiments using Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  and determined that antagonism of Sig-1R by BD1063 does not produce changes in plasma membrane protein expression ( $113 \pm 15\%$  for the BD-1063-treated cells with respect to control cells), indicating that protein translation, stability, or bilayer integration processes in general are not affected (Fig. S2C).

A decrease in TRPV1 levels at the plasma membrane should result in a decrease in the number of responsive channels leading to lower current-density levels of capsaicin-evoked currents. Compared with control cells, in cells treated for 24 h with 25  $\mu$ M BD1063 the current density was diminished by  $42 \pm 16\%$  (Fig. 2E). Likewise, compared with control cells, P4 also diminished the TRPV1 current-density levels ( $82 \pm 4\%$  for 25  $\mu$ M,  $56 \pm 9\%$  for 1  $\mu$ M, and  $69 \pm 11\%$  for 100 nM) (Fig. 2F). Thus, two ligands

with antagonistic effects on the function of Sig-1R exhibit similar effects on TRPV1 expression.

To further substantiate the role of Sig-1R activity on TRPV1 expression, we cotransfected HEK293 cells with TRPV1 and a siRNA directed against Sig-1R to evaluate changes in TRPV1 membrane levels. Fig. S3A shows that 48 h after transfection Sig-1R protein levels were down-regulated ( $55.2 \pm 5.3\%$ ) by the presence of the siRNA compared with those cells transfected with the scrambled siRNA. In cells cotransfected with Sig-1R siRNA and TRPV1, compared with cells transfected with scrambled siRNA and TRPV1, we observed a  $46 \pm 12\%$  decrease in total TRPV1 protein (Fig. S3B). We also assessed the effects of these treatments by determining changes in TRPV1 current-density levels and, as shown in Fig. S3C, inhibition of Sig-1R expression by siRNA resulted in a  $48 \pm 12\%$  decrease in current density compared with scrambled siRNA-treated cells. These data indicate that Sig-1R is necessary for TRPV1 expression.



**Antagonism of Sig-1R Leads to Changes in TRPV1 Expression Through a Proteasome-Dependent Pathway.** It has been reported that antagonists of Sig-1R promote its interaction with another ER-resident protein, BiP (Binding Ig Protein) (15), resulting in the blockage of Sig-1R chaperone activity that, in turn, leads to misfolding of this chaperone's targets (e.g., IP3R and Insig) (15, 36). These misfolded or incompletely processed polypeptides are then ejected from the ER for degradation by the 26S proteasome (37).

For this reason, we explored if a proteasomal-degradation pathway underlies the effects for the down-regulation of TRPV1 protein levels by BD1063 and P4. Fig. S4 shows that incubation of TRPV1-expressing HEK293 cells with BD1063 or P4 together with 25  $\mu$ M MG132, an inhibitor of the proteasomal pathway, can almost completely rescue TRPV1 protein from degradation, compared with cells treated only with BD1063 ( $55 \pm 5\%$  and  $BD1063 + MG132 = 82 \pm 8\%$ ) (Fig. S4A) or P4 ( $P4 = 68 \pm 6\%$  and  $P4 + MG132 = 93 \pm 6\%$ ) (Fig. S4B). These data provide additional evidence that Sig-1R plays an important role in TRPV1 protein expression. To delve further into this process, we assessed if overexpression of Sig-1R would confer resistance to degradation by prolonged exposure to capsaicin, since this agonist results in TRPV1 degradation by the lysosomal pathway (38). The data in Fig. S5 show that overexpression of Sig-1R does not rescue TRPV1 expression upon a 20-min exposure to capsaicin, indicating that the chaperone does not confer resistance to degradation by the lysosomal pathway. These data are consistent with our observation that, when cells are treated with a Sig-1R antagonist, TRPV1 protein levels are diminished through a pathway that involves the proteasome pathway (Fig. S4).

Although BD1063 is presumably specific for Sig-1R (39), P4 has been shown to bind to numerous receptors. Thus, to eliminate the possibility that down-regulation of TRPV1 protein levels by P4 was through pathways associated with its nuclear receptors, we evaluated the presence of mRNA for the nuclear progesterone receptors A and B (PR A/B) (40) in DRG and HEK293 cells. As shown in Fig. S6A, neither of these cell-types expressed PR A/B.

We also carried out experiments to exclude the possibility that low levels of PR A/B mRNA went undetected in our conventional RT-PCR measurements. To test for this, we used a PR A/B antagonist, 25  $\mu$ M RU486 (RU), to determine if it would reverse the effects of P4 on TRPV1 protein levels. We hypothesized that, if the effects of P4 on TRPV1 expression levels were due to activation of the PR A/B, inhibition of these receptors should reverse the process. Unexpectedly, our findings showed that the incubation with 25  $\mu$ M RU alone or together with 25  $\mu$ M P4 for 24 h not only did not counteract the down-regulatory effects of P4 on TRPV1 protein expression but further decreased TRPV1 total protein levels ( $73.5 \pm 13.5\%$  and  $54 \pm 8\%$  for P4 + RU and RU, respectively) (Fig. S6B). Nonetheless, these experiments did show that the PR A/B signaling pathway was not involved in down-regulation of TRPV1 levels, but rather another mechanism was at play. Both P4 and RU decreased TRPV1 protein levels independently of nuclear receptors, and this is consistent with reports that show that these compounds are able to induce alterations in the homeostasis of the ER (41, 42).

Still another possible explanation for the effects of P4 on TRPV1 expression could be through the activation of plasma membrane receptors of P4, such as the membrane receptors  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , and  $\epsilon$  or by P4 receptor membrane components 1 and 2 (PGRMC1 and PGRMC2) (40). We found that mPR $\alpha$ , mPR $\gamma$ , PGRMC1, and PGRMC2 are expressed in DRG and HEK293 cells, whereas mPR $\epsilon$  is expressed only in HEK293 cells (Fig. S6A). These results imply that at least four of the five membrane receptors assayed could be potentially involved in P4's effects on TRPV1 protein expression. We tested this possibility by using a membrane-impermeable P4 conjugated with BSA to establish if any membrane-bound P4 receptor could be responsible for the effects of this steroid on TRPV1's expression levels. Note that this compound binds to the plasma membrane P4 receptors with

an affinity similar to that of the unconjugated steroid (43). Fig. S6C shows that a 24-h treatment with 25  $\mu$ M of P4-BSA in HEK293 cells did not produce changes in total TRPV1 protein levels, excluding a role for membrane P4 receptors on TRPV1 protein-level down-regulation.

In summary, the data presented above indicate that the mechanism for regulation of TRPV1 expression by P4 does not depend on the activity of its classical nuclear or membrane receptors. On the other hand, the data did indicate that an internalization of P4 is required for it to exert its effects, as confirmed by the experiments using the P4-BSA conjugate.

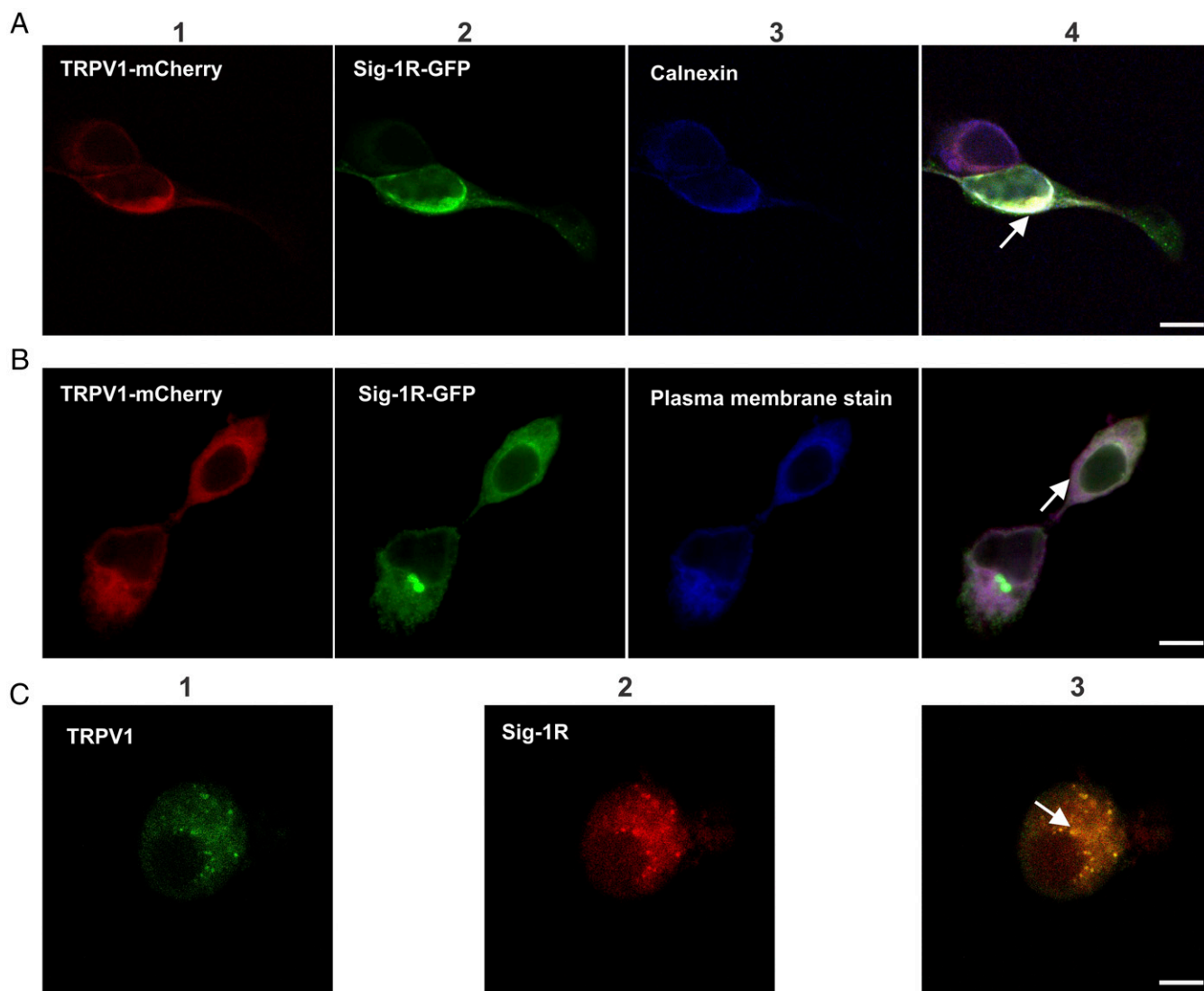
**Sig-1R and TRPV1 Association.** Another interesting question is whether regulation of TRPV1 levels is due to a protein-protein interaction with Sig-1R contributing to adequate TRPV1 expression in the plasma membrane. Consequently, we explored if there is a direct physical interaction of Sig-1R with TRPV1. We began by determining with confocal microscopy that TRPV1 and Sig-1R colocalize in HEK293 cells that overexpress Sig-1R-GFP [previously it has been shown that the GFP fusion on the C terminus yields a functional chaperone (15); Fig. S1B shows the expression of this construct as a 55-kDa protein fusion] and TRPV1-mCherry constructs (this fusion does not alter TRPV1 function; Fig. S7). The data show that these proteins do in fact colocalize in the heterologous expression system (Fig. S8). To determine what cellular compartments Sig-1R and TRPV1 interact in, we next evaluated whether they were present in the ER compartment (calnexin label). Fig. 3A shows that TRPV1-mCherry-labeled (panel 1) and Sig-1R-GFP-labeled (panel 2) proteins colocalize (panel 4) at the ER region (panel 3). We also explored whether both proteins are colocalized to the plasma membrane region. Fig. 3B shows that Sig-1R and TRPV1 do not predominantly colocalize to the plasma membrane (panel 4), although TRPV1 is highly expressed in this cellular structure, as shown by the purple signal which represents the merge between TRPV1 and the plasma membrane label (panel 4).

We also assessed whether TRPV1 and Sig-1R colocalize in DRG neurons, a native system where the proteins are not overexpressed. The data in Fig. 3C confirm that both proteins colocalize in the endogenous expression system.

By performing biochemical assays, we also found that Sig-1R and TRPV1 from HEK293 cells coimmunoprecipitated (Fig. 4A, *Left* and *Right*, lane 2). Interestingly, Sig-1R coimmunoprecipitated with the TRPV1 core form (Fig. 4A, *Left*, lane 2) but not with the hyperglycosylated form of the protein. Moreover, when cells are treated with BD1063 or P4, the association of Sig-1R with TRPV1 is diminished compared with control cells without treatment (lane 5 in Fig. 4B and C, lane 5).

The biochemical assays described above suggested an interaction between Sig-1R and TRPV1. To confirm a direct interaction between both proteins, we used FRET analysis (44). We measured in vivo (live cultured cells) FRET in HEK293 cells expressing Sig-1R-GFP and TRPV1-mCherry. The results seen in Fig. 4D and E demonstrate that there is a close interaction between Sig-1R-GFP and TRPV1-mCherry. FRET is observed as the difference between the direct excitation of the acceptor (TRPV1-mCherry) at the donor excitation wavelength (ratio  $A_{00}$ ) and the sensitized emission of the acceptor when the donor (Sig-1R-GFP) is present and excited (ratio A). These measurements indicate that, when coexpressed, Sig-1R and TRPV1 directly interact. This interaction was significantly reduced, as expected, when the cells were treated with BD1063 or P4 for 24 h, as FRET levels diminished significantly (Fig. 4D and E, respectively).

Taken together, these diverse lines of evidence show that Sig-1R can associate with TRPV1 in a direct protein-protein interaction and that this interaction regulates the membrane concentration of TRPV1. To determine whether Sig-1R was binding to the N or C terminus or transmembrane domains of TRPV1, we produced deletion constructs of TRPV1 (Fig. 4F) and determined that removal of the N and C termini still allowed



**Fig. 3.** Colocalization of TRPV1 and Sig-1R in HEK293 cells and DRG neurons by confocal microscopy. (*A*) Panels 1 and 2 show signals detected for the TRPV1-mCherry (1, red) and Sig-1R (2, green) proteins. Panel 3 shows labeling of the ER by rabbit anti-calnexin and anti-rabbit Cy5 antibodies (blue). Colocalization of TRPV1 and Sig-1R in the ER is shown in panel 4 (arrow indicates the merge in white). (*B*) Panels 1 and 2 are the same as in *A*. Panel 3 shows the plasma membrane labelled with CellMask Deep Red (blue). Panel 4 shows the merged image (purple) and strong localization of TRPV1 (red) to the plasma membrane. (*C*) Colocalization of endogenous TRPV1 and Sig-1R in primary cultures of mouse DRG neurons. TRPV1 immunodetection with goat anti-TRPV1 and secondary anti-goat Alexa Fluor 488 antibodies (green, panel 1) and Sig-1R immunodetection with rabbit anti-Sig-1R and secondary anti-rabbit Alexa Fluor 594 antibodies (red, panel 2). Merge (yellow, panel 3) shows colocalization of both proteins. (Scale bars: 10  $\mu$ m.) All arrows indicate colocalized signals.

its interaction with Sig-1R, showing that the chaperone interacts with the transmembrane region of the ion channel (Fig. 4*G*).

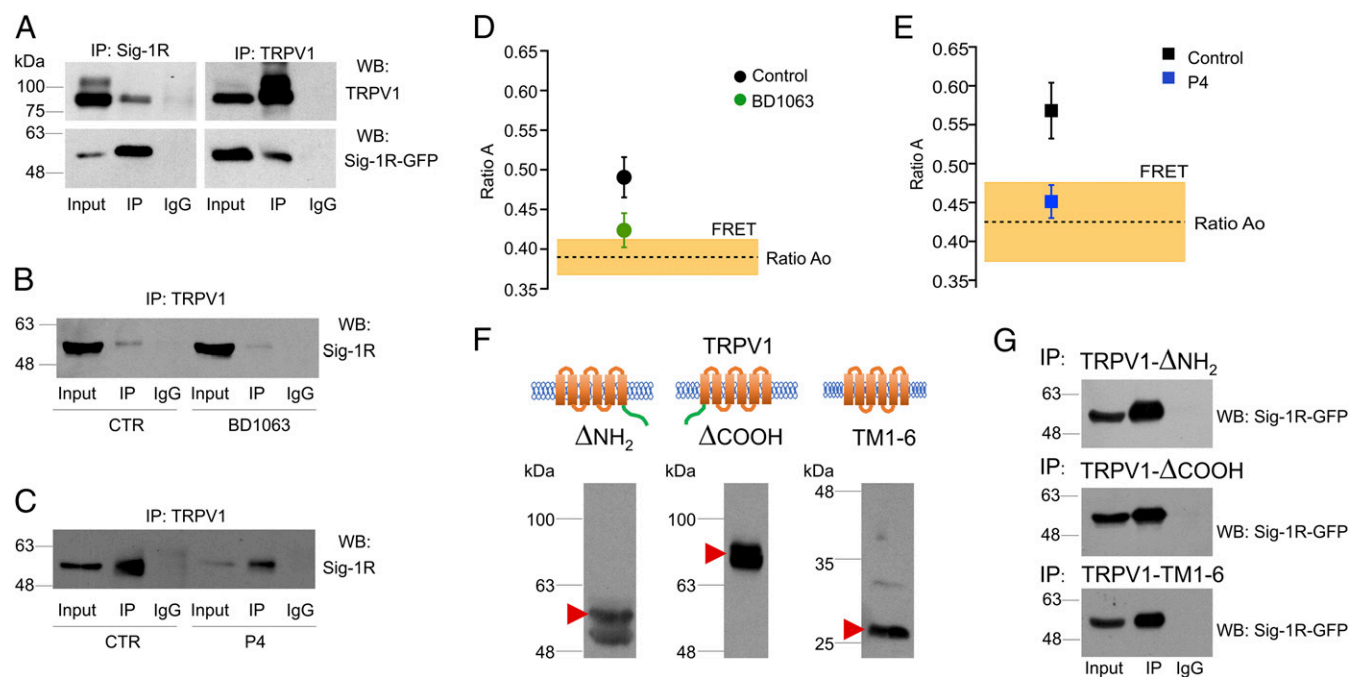
**TRPV1-Dependent Pain Is Decreased in Pregnant Mice.** With respect to pain, it has been shown by several studies that males (human and other animals) exhibit higher pain thresholds in response to mechanical and thermal stimuli than their female counterparts (45). Although the difference in responses to noxious stimuli between genders is still controversial (46, 47), it has been established that rats and humans exhibit elevated thresholds to noxious stimuli during the gestation and parturition processes (48, 49). It has also been demonstrated that during pregnancy, when P4 levels are higher than in males (50), pain thresholds in females are increased and that during this physiological state agonists of Sig-1R are unable to interact with it, since P4 competes for the binding site on this receptor (51).

To show the role of Sig-1R during pregnancy, we used the paw-licking assay to elicit pain-related behavior by the injection

of capsaicin in nonpregnant and pregnant female mice. The results show an increased pain-associated response when capsaicin was injected ( $43 \pm 2$  s and  $24 \pm 1$  s, respectively) compared with saline injection ( $6.4 \pm 2$  s and  $3.4 \pm 1$  s, respectively) (Fig. 5*A*). From these experiments it was also evident that the pregnant mice exhibited a less-pronounced pain-like behavior in response to capsaicin compared with their nonpregnant counterparts, and these data point to a role of elevated circulating P4 levels in this response.

### Discussion

In a series of studies of the effects on mechanical allodynia of Sig-1R agonists under control conditions and with pretreatment with capsaicin, Entrena et al. (31, 33) found that Sig-1R agonists did not alter sensitivity to mechanical stimulation under baseline conditions, and mechanical allodynia was present only when the system was pretreated with capsaicin. These effects were reversed by Sig-1R antagonists and absent in Sig-1R-knockout



**Fig. 4.** TRPV1 and Sig-1R form protein-protein complexes. (A, Left) Coimmunoprecipitation of TRPV1 with Sig-1R antibody and immunodetection of TRPV1 (Upper) and Sig-1R (Lower). (Right) Coimmunoprecipitation of Sig-1R with TRPV1 antibody and immunodetection for TRPV1 (Upper) and Sig-1R (Lower). IgG served as negative control. The figure is representative of three independent experiments. Input is 1/10th of the total protein used in each immunoprecipitation. (B) Immunoprecipitation was carried out with TRPV1 antibody for the total protein from control cells (Ctr, Left) and BD1063-treated cells (Right). Differences between control and BD1063-treated cells were determined in the signal for immunoprecipitated Sig-1R (lane 5). The figure is representative of three independent experiments. (C) Immunoprecipitation was carried out as above with total protein from control cells (Left) and P4-treated cells (Right). Differences between control and P4-treated cells were determined in the signal for immunoprecipitated Sig-1R (lane 5). The figure is representative of three independent experiments. (D and E) FRET between TRPV1-mCherry and Sig-1R-GFP. The ratio  $A_o$  is the fractional excitation of mCherry in the absence of donor (GFP), and its average value is indicated by the dashed line. A value of ratio A, when both donor and acceptor are present, greater than ratio  $A_o$  is indicative of FRET. The coexpression of TRPV1 and Sig-1R produces an apparent FRET efficiency of  $0.49 \pm 0.02$  ( $n = 17$ ). (D) Incubation of the cells in the presence of  $25 \mu\text{M}$  BD1063 reduces the apparent FRET efficiency to  $0.42 \pm 0.02$  ( $n = 6$ ), which is not different from the ratio  $A_o$ . (E) Treatment with  $25 \mu\text{M}$  progesterone (P4) has an effect similar to BD1063. Control apparent FRET efficiency is  $0.57 \pm 0.03$  ( $n = 10$ ), and progesterone treatment reduces it to  $0.45 \pm 0.02$  ( $n = 10$ ). (F) Western blot analysis for deletion constructs of TRPV1 protein shows the bands corresponding to the expected sizes: TRPV1- $\Delta\text{NH}_2$  (58 kDa, Left), TRPV1- $\Delta\text{COOH}$  (77 kDa, Center), and TRPV1-TM1-6 (28 kDa, Right). (G) Coimmunoprecipitation of different TRPV1 deletion constructs with Sig-1R. Coimmunoprecipitation of the TRPV1- $\Delta\text{NH}_2$  (Top) and TRPV1- $\Delta\text{COOH}$  (Middle) deletion constructs and of TM1-6 transmembrane domains only (Bottom) with Sig-1R. Each deletion construct of TRPV1 was coimmunoprecipitated with Sig-1R-GFP (IP) by using a specific antibody against a specific epitope of the segment.

mice. Those observations prompted us to explore if there was a connection between Sig-1R and TRPV1, since no mechanism had been established.

Here we have investigated the interaction of two physiologically important ligand-activated proteins involved in producing pain: the ion channel TRPV1 (2) and the chaperone Sig-1R (25). Both these proteins have been extensively studied, given their important roles in pain. TRPV1 can be regulated by changing the  $P_o$  and/or by controlling the available number of channels (N) in the plasma membrane of cells. Both these processes can result in a decrease of nociceptor excitability and in the reduction of pain. The  $P_o$  of TRPV1 can be decreased by some natural regulators (7, 8). On the other hand, N can be reduced by removing channels from the plasma membrane by proteins that affect trafficking.

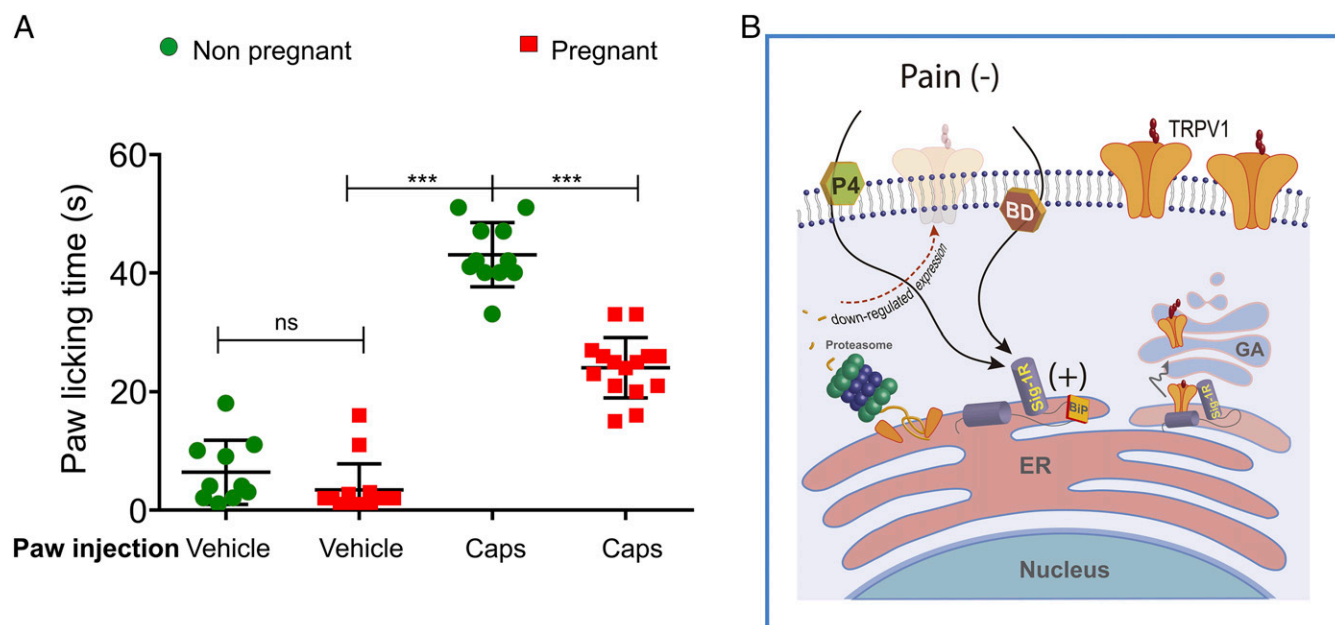
Among these latter proteins are the Sig-1R receptor, a progesterone-inhibited chaperone which has been shown to interact with and affect trafficking of some ion channels (19, 22, 23, 52) and GPCRs (21). However, there is a paucity of information on how and if chaperones interact with TRP channels in general and TRPV1 in particular. In this respect, it has only been shown that the *Drosophila* TRP channel and XPORT chaperones can form complexes that are important for the exit of this channel from the ER (53).

In this study, we have elucidated the molecular pathway by which the chaperone, Sig-1R, reduces pain produced by capsaicin-activated TRPV1 channels. This was accomplished by showing that the pain produced by injecting capsaicin into a mouse's paw is

reduced by an antagonist of Sig-1R, BD1063 (Fig. 1A). We also observed that BD1063 and a natural antagonist of Sig-1R, P4, reduced the levels of TRPV1 protein of nociceptors (DRGs) and transfected HEK293 cells (Figs. 1B and C and 2A–D). This resulted in diminished capsaicin-evoked TRPV1 currents (Fig. 2E and F) due to a decrease in the number of functional channels (N) in the plasma membrane. While agonists of Sig-1R promote the mono- and/or dimeric conformations that allow interactions of the chaperone with other proteins, antagonists such as BD1063 and P4 promote a multimerized form of the protein that does not allow its functions (54). Such conformations of Sig-1R are a consequence of the binding of ligands to a hydrophobic region in the center of the C terminus of the chaperone (14). For example, it has been shown that BD1063 competes with the agonist (+)-pentazocine for the same binding site in the C terminus (39, 55). Thus, it is likely that BD1063 and P4 promote a conformation of Sig-1R that does not allow the interaction with TRPV1, leading to a decrease in the expression of the ion channel. Although we did not evaluate the effects of Sig-1R on TRPV1 trafficking, our results (Fig. S5) show that degradation of TRPV1 by prolonged agonist activation is not affected by Sig-1R overexpression. It had been previously shown by Sanz-Salvador et al. (38) that capsaicin-induced internalization of TRPV1 results in lysosomal degradation, a process different from the one proposed in the present study involving the proteasomal pathway.

As mentioned before, Whirlin is a protein involved in the stability and increased expression of TRPV1 (13). In this respect,





**Fig. 5.** Antagonism of Sig-1R affects TRPV1 expression and its role in pain. (A) Nonpregnant and pregnant (15 d of gestation) mice were intradermally injected into a hind paw with vehicle- or capsaicin (2.8  $\mu$ g)-containing solutions. PLTs for vehicle injections of nonpregnant ( $n = 18$ ) and pregnant females ( $n = 12$ ) were  $5.2 \pm 1.2$  s and  $2.5 \pm 0.9$  s, respectively. For capsaicin injection PLTs were  $43 \pm 2$  s in nonpregnant females and  $24 \pm 1$  s in pregnant females.  $***P < 0.0001$ ; ns, not statistically significant; ANOVA. (B) Antagonism of Sig-1R promotes the association of Sig-1R with BiP leading to Sig-1R inactivation, protein misfolding in the ER, and, finally, to ER-associated protein degradation through the proteasome which, in turn, results in decreased TRPV1 expression levels and capsaicin-induced pain. In the absence of antagonists such as progesterone (P4) and BD1063 (BD), Sig-1R can positively regulate TRPV1 protein expression in the plasma membrane, as shown on the right side of the figure where interactions between Sig-1R and TRPV1 are not disrupted and the channel transits correctly to the Golgi apparatus (GA) where it is hyperglycosylated and then transported to the plasma membrane.

the interaction between TRPV1 and Whirlin confers resistance to lysosomal degradation by prolonged exposure to capsaicin. This is also a distinct mechanism from the one proposed in the present study where Sig-1R confers resistance to proteasomal degradation.

The responses of the two tested antagonists were mimicked by the essential elimination of Sig-1R with a specific siRNA (Fig. S3). Moreover, direct proof of the interaction of TRPV1 with Sig-1R was obtained by immunoprecipitation and FRET experiments (Fig. 4 A–E). Finally, we showed that BD1063 and P4 treatments lead to degradation of TRPV1 by a proteasome-dependent pathway (Fig. S4). Taken together, our data identify an interaction of a mammalian TRP channel with a chaperone and highlight that the TRPV1-Sig-1R pathway is a fruitful target for therapeutic developments regarding the reduction of pain (Fig. 5B).

We have also shown that antagonism of Sig-1R and Sig-1R knockdown down-regulated TRPV1 expression (Fig. 2 A–D and Fig. S3B) and reduced capsaicin-activated currents (Fig. 2 E and F and Fig. S3C). Although P4 has been known to interact with other types of receptors, including the nuclear and membrane progesterone receptors (56), we show that inhibiting these receptors does not prevent the down-regulation of TRPV1 (Fig. S6). Moreover, by using a membrane-impermeable P4, we demonstrated that P4 must enter the cell to exert its effects (Fig. S6C).

Previous studies have shown that Sig-1R antagonists sequester Sig-1R in its BiP-associated form or promote its multimerized conformation, where it is rendered inactive (15, 54). This, in turn, leads to misfolded protein accumulation in the ER and the activation of the proteasome degradation pathway (Fig. 5B), a process that provides quality control (i.e., proper folding) of nascent proteins and avoids cellular stress (57). Our experiments using MG132, a selective antagonist of the 26S proteasome pathway, show that it renders BD1063 and P4 ineffective and essentially rescues TRPV1 protein expression (Fig. S4). These data show that Sig-1R in the ER is necessary for the correct folding of TRPV1 and for avoiding proteasomal degradation,

thus allowing the exit of TRPV1 from the ER to the plasma membrane, constituting the mechanism by which both Sig-1R antagonists regulate TRPV1 function (Fig. 5B).

We also observed that when Sig-1R is antagonized by BD1063 or P4, the hyperglycosylated (or mature) form of the TRPV1 protein decreases (Fig. 2 A–D and Fig. S2 A and B). This result can be explained by noting that antagonism of Sig-1R results in misfolding of the TRPV1 protein, and thus there is no trafficking of the protein to the Golgi apparatus (Fig. 5B), where it is hyperglycosylated and then transported to the plasma membrane (58). Although we found that the core form of TRPV1 is not completely abolished by treatment with Sig-1R antagonists, this could be explained by having this form of the protein retained in the ER to be eventually degraded by the proteasome. In contrast, a correctly folded protein (one that has not been subjected to proteasomal degradation) is trafficked from the ER to the Golgi apparatus where it is hyperglycosylated and then transported to the plasma membrane.

We also identified an interaction between Sig-1R and TRPV1. This was accomplished by colocalization of fluorescently tagged Sig-1R and TRPV1 in the ER and confirmed the presence of these protein–protein complexes through coimmunoprecipitation and FRET experiments. Moreover, this interaction was disrupted by BD1063 and P4 (Fig. 4 B–E). To further characterize this interaction, we defined that Sig-1R binds to the transmembrane domain of TRPV1 (Fig. 4G), similar to what has been found for Kv1.3 channels (22). This constitutes evidence of such an association between a chaperone and a mammalian TRP channel.

The stoichiometry of interaction of ASIC (acid-sensing ion channels) and Sig-1R has been obtained where one Sig-1R associates with one ASIC1 subunit, meaning that the ASIC complex (a trimeric protein) will bind no more than three Sig-1R receptors (59). Although analysis of the FRET experiments shown here suggests a 1:1 interaction between Sig-1R and TRPV1, future studies directed to answering this specific question are needed.

The mechanism by which the interaction of TRPV1 with Sig-1R is disrupted is through the sequestering of Sig-1R chaperone activity by BD1063 (or P4), as they promote its association with BiP (Fig. 5B) (15). One study with P4 showed it down-regulated the expression of hERG channels by altering ER homeostasis (42), whereas another study showed that Sig-1R regulates the expression of these channels through a posttranslational mechanism (52). However, neither of these studies shows a relationship between Sig-1R and P4 in regulating hERG channel expression. In the light of our results, we suggest that the interaction of P4 with the chaperone could be responsible for disrupting the interaction of Sig-1R with hERG channels, as it has been shown that Sig-1R directly interacts with these proteins (23).

What are some of the physiological relevancies of the antagonism of Sig-1R? It has been shown that during periods of pregnancy or acute stress, when P4 is elevated, its concentration can reach 300 nM (32), a concentration well above 100 nM that decreases TRPV1 in the plasma membrane (Fig. 2F). In this regard, in our behavioral experiments we found that pregnant mice exhibited a decreased response to capsaicin-induced pain compared with nonpregnant females (Fig. 5A), thereby pointing to a role for antagonism of Sig-1R by P4 on TRPV1-dependent pain. In summary, our results elucidate a mechanism in which chaperones, specifically Sig-1R, can interact with TRPV1 in a manner that reduces pain.

## Methods

**Cell Cultures.** HEK293 cells (ATCC CRL-1573) were cultured in complete growth medium containing DMEM with high-glucose (DMEM Gibco) and complemented with 10% FBS (HyClone) and 100 U/mL of penicillin-streptomycin (Gibco). Cell cultures were maintained in a humidified incubator at 37 °C with an atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were subcultured every 3 d using 0.25% (wt/vol) trypsin-EDTA solution (Gibco). Treatments with P4 or BD1063 were given for 24 h (60).

**Transient Cell Transfection and Treatments.** Subconfluent HEK293 cultures in 35-mm wells were transiently transfected with 100 ng of ratTRPV1 (rTRPV1) plasmid (pcDNA3.1-rTRPV1) using the jetPEI Polyplus transfection reagent. For patch-clamp experiments, the cells were grown on coverslips and transfected either with rTRPV1 (500 ng of plasmid for excised patch-clamp or 50 ng for whole-cell experiments) in conjunction with 500 ng of pIRES-GFP (BD Biosciences). Sixteen hours posttransfection, the medium was substituted with fresh medium containing 25 μM of P4 or 25 μM BD1063 (60, 61) or vehicle (0.25% methanol for P4 treatments or water for BD1063 treatments) diluted in complete growth medium and maintained under normal culture conditions for 24 h. Progesterone (Steraloids, Inc.) and RU486 (62) (Sigma-Aldrich) were diluted in 0.25% methanol, and BD1063 was diluted in water, all as 10-mM stock solutions. Progesterone-3-BSA conjugate (P4-3-BSA; Abiox Company) (25 μM) (43) was directly diluted in culture medium. MG132 (Sigma-Aldrich) was prepared as a 10-mM stock in DMSO (Sigma-Aldrich), and at 18 h posttreatment with BD1063 or P4 cells were cotreated with MG132 (25 μM) (63) and fresh P4 or BD1063 (25 μM) diluted in culture medium for another 8 h.

For experiments where we tested the effects of prolonged capsaicin exposure on TRPV1 degradation, HEK293 cells were cotransfected with pcDNA3.1 (empty vector) and pcDNA3.1-TRPV1 or pcDNA3.1-Sig-1R-GFP and pcDNA3.1-TRPV1. After 48 h of transfection, cells were incubated for 20 min at 37 °C with 5 μM of capsaicin or vehicle (0.025% EtOH) diluted in DMEM. Finally, cells were lysed to obtain total protein for their analysis by Western blot for the TRPV1 protein.

**Electrophysiology.** Whole-cell patch-clamp recordings (64) were performed on HEK293 cells transiently transfected with rTRPV1 and cultured under control conditions or treated for 24 h with 25 μM BD1063 or with 0.1, 1 and 25 μM P4. Patch electrodes were pulled to obtain a tip resistance of 2–4 MΩ. The effects of the P4 and BD1063 on the current density of TRPV1 were analyzed using voltage-ramps executed starting at a holding potential of 0 mV from –120 mV to 120 mV at a rate of 0.5 V/s. The current density was obtained by dividing the currents by the cell capacitance. Data were acquired and analyzed with PULSE software (HEKA Elektronik) and plotted with programs written using Igor Pro (WaveMetrics, Inc.). Solutions used for recordings contained (in mM): 130 NaCl, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes (extracellular, pH 7.2) and 130 NaCl, 10 Hepes, and 10 EGTA (intracellular, pH 7.2).

Inside-out membrane patches were obtained from HEK293 cells expressing rTRPV1 and rTRPV1-mCherry by pulling the micropipette away from the cell. Current recordings were performed under isotonic conditions with the following solutions (Sigma-Aldrich) (in mM): 130 NaCl, 3 Hepes (pH 7.2), and 1 EDTA. We measured dose–response curves for activation of TRPV1 by capsaicin at 120 mV as the steady-state current. This current density was normalized to the response to 4 μM capsaicin. We obtained the  $K_d$  from fits to the Hill equation:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{[\text{capsaicin}]^n}{[\text{capsaicin}]^n + K_d^n}$$

where  $n$  is the Hill coefficient and [capsaicin] is the agonist concentration. Leak subtraction was performed by subtracting the initial current trace in the absence of capsaicin from the traces obtained in the presence of the agonist.

**Total Protein Isolation.** Transiently transfected HEK293 cells were harvested 24 h posttreatment and rinsed with PBS. Cells were suspended in lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100] supplemented with 10 mM NaF and Complete Protease Inhibitor (Roche). Lysates were centrifuged for 5 min at 1,500 ×  $g$ , and supernatants were recovered for total protein quantification by bicinchoninic acid assay (Sigma-Aldrich).

**Cell-Surface Protein Biotinylation.** HEK293 cells cultured in 100-mm wells were transiently transfected with 1 μg of pcDNA3.1-rTRPV1 and cultured under control or treated conditions (25 μM P4 or 25 μM BD1063). Twenty-four hours posttreatment cells were labeled with the EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin reagent following the manufacturer's instructions (Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit; Thermo Scientific). Cells were lysed, and labeled proteins were isolated with Immobilized NeutrAvidin Gel. The bound cell-surface proteins were released using SDS/PAGE sample buffer containing 50 mM DTT (Sigma-Aldrich).

**Western Blot Analysis.** Total protein extracts were separated by SDS/PAGE and blotted to PVDF membranes (Immobilon-P; Merck Millipore) by using the Hoefer Semi-Dry transfer system. Membranes were blocked with 6% nonfat dry milk in PBS and Tween-20 0.1% (PBS-T) and incubated overnight with goat polyclonal anti-TRPV1 (P-19, sc12498; Santa Cruz Biotechnology) or rabbit anti-TRPV1 (ACC-030 and ACC-029; Alomone Laboratories), diluted 1/1,000 in PBS-T with 3% nonfat dry milk. A monoclonal antibody against GAPDH (14C10; Cell Signaling Technology) diluted 1:5,000 in PBS-T was used as a protein load control. For immunodetection of Sig-1, the polyclonal goat (S18; Santa Cruz Biotechnology) or rabbit (NBP1-82479; Novus Biologicals) anti-Sig-1R antibodies were used. Finally, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α was immunodetected with the monoclonal mouse anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α antibody (H-300; Santa Cruz Biotechnology) and was used as a load control of plasma membrane proteins. Proteins were visualized by immobilized antigens conjugated to horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies and were detected using chemiluminescent substrate (ECL; Amersham Pharmacia). Densitometric analysis was performed by quantifying both the hyperglycosylated and partially glycosylated bands of the TRPV1 protein. Thus, the graphed results represent an average of the intensity of both bands.

**Sig-1R-Knockdown Experiments.** HEK293 cells were cultured on 35-mm-well dishes at 50% confluence. Cells were cotransfected with 50 ng of pcDNA3.1/rTRPV1 plasmid and 75 pmol of siRNA to target Sig-1R (predesigned SASI\_Hs01\_00189688; Sigma-Aldrich) or with a scrambled siRNA as a negative control (siRNA Universal Negative control #1; Sigma-Aldrich). Forty-eight hours posttransfection cells were harvested for protein isolation as described in the *Western Blot Analysis* section for immunodetection of Sig-1R and TRPV1 total protein.

**Sig-1R-GFP and TRPV1 Deletions Constructs.** These constructs were obtained by PCR amplification or enzymatic restriction as described in [Supporting Information](#).

**Fluorescence and Confocal Microscopy Analysis.** HEK293 cells were cultured on coverslips and transiently cotransfected with pcDNA3.1+ rTRPV1-mCherry and pcDNA3.1/Sig-1R-GFP-TOPO plasmids (0.5 μg each). For microscopic analysis, after 48 h of transfection cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min, washed with PBS, and mounted on microscope slides with VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc.). Cell visualization was carried out using a confocal laser-scanning microscope (LSM710 Zeiss) employing a W Plan-Apochromat 63× (NA 1.0) water-immersion objective.

Images were prepared using ImageJ software. For plasma membrane staining, cells were incubated for 5 min with the CellMask Deep Red label at 37 °C, according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). For ER staining, immunocytochemical experiments were performed by labeling the cells, which were previously permeabilized as described in the following paragraph, with the polyclonal rabbit anti-calnexin antibody (H70; Santa Cruz Biotechnologies). Finally, cells were incubated with anti-rabbit IgG (H + L) secondary antibody and Cy5 antibody (Thermo Fisher Scientific) and were mounted on microscope slides with VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc.) for confocal immunofluorescence analysis.

For immunocytochemistry experiments with DRG neuron primary cultures, the cells were fixed with 4% PFA in PBS, permeabilized (0.2% Triton X-100 in PBS), and blocked (2.5% FBS and 1% gelatin, all in PBS). For the immunodetection of TRPV1, DRG neurons were sequentially incubated with goat anti-TRPV1 antibody (P19; Santa Cruz Biotechnology) and chicken anti-goat IgG secondary antibody Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific). Finally, cells were incubated with rabbit anti-Sig-1R antibody (NBP1-82479; Novus Biologicals) and chicken anti-rabbit IgG secondary antibody Alexa Fluor 594. Primary antibodies were diluted in PBS with 3% BSA (1:100) and were incubated overnight at 4 °C, and secondary antibodies were diluted 1:500 (3% BSA, PBS) and incubated 1 h at 4 °C. Finally, the cells were mounted on microscope slides with VECTASHIELD for confocal immunofluorescence analysis.

**Coimmunoprecipitation.** Following standardized methods (65), coimmunoprecipitation assays were carried out as described in [Supporting Information](#).

**RT-PCR.** Following the manufacturer's instructions, total RNA was isolated with TRIzol Reagent (Invitrogen) from DRGs and a HEK293 cell line. The RT-PCR was carried out according to the manufacturer's instructions using 2.5 µg of total RNA, 100 ng of random primers, and 200 U of SuperScript III (Invitrogen). The PCR was carried out with 5 µL of cDNA, 30 pmol of each primer, and 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR conditions were as follows: an initial denaturalization step at 95 °C for 5 min followed by 30 cycles of reaction, then a denaturalization step for 95 °C for 30 s, annealing for 30 s, and extension for 45 s at 72 °C. [Table S1](#) shows the annealing temperature and the sequence of each pair of primers.

**FRET Measurements.** The apparent FRET efficiency  $E_{app}$  was measured by the spectra-FRET method (66) in a home-modified TE-2000U (Nikon) inverted epifluorescence microscope. The excitation light source was an argon ion laser (Spectra-Physics) with a laser coupled to a multimode optical fiber using a 3-mm ball lens. Diverging light coming out of the fiber was coupled to the illumination port by a 50-mm focal length collimating lens and then focused into the objective by a 300-mm lens.

A Nikon 60x oil-immersion objective (numerical aperture 1.4) was used to image the cell. The microscope was coupled to a spectrograph (Acton Instruments) and an EMCCD camera (Luca; Andor) controlled by MicroManager software (67).

To obtain the emission spectra the following methods were used: To image a small area of a cell, the spectrograph entrance slit was partially closed. The light coming from the cell and passing through the slit was projected across the grating in the spectrograph to obtain a spectral image collected by the camera. An emission spectrum of the membrane area was obtained from this image using a line scan along the wavelength axis. The emission spectrum of cells expressing the Sig-1R-GFP construct was first recorded at 488-nm excitation. Direct excitation (ratio  $A_0$ ) of the TRPV1-mCherry construct by 488 nm was determined as the ratio of the emission intensities observed by exciting at 488 and 514 nm.

When cells cotransfected with GFP and mCherry constructs were excited at 488 nm, the emission spectrum showed two peaks; the first one at 520 nm is the emission of the GFP protein, and the second at 615 nm is the emission of mCherry. This second peak contains three components, the first caused by bleed-through of GFP fluorescence, the second caused by direct excitation of mCherry at 488 nm, and the third caused by FRET with GFP (68). To quantify the FRET efficiency from this spectrum, the GFP-only spectrum was obtained separately, scaled to the first peak of the emission spectrum of the experimental cells, and finally subtracted, leaving only the mCherry spectrum. This subtracted spectrum contains two of the aforementioned components: the direct excitation at 488 nm and the FRET between GFP and mCherry.  $E_{app}$  is

obtained as the difference of ratio  $A - \text{ratio } A_0$ , where ratio A is the ratio between the subtracted mCherry spectra and a third spectrum obtained by exciting at 514 nm.

**Animals.** Male and female 8- to 10-wk-old C57BL/6J mice were obtained from the animal facility of the Instituto de Fisiología Celular. Mice were handled in accordance with the standards of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Instituto de Fisiología Celular of the National Autonomous University of México (UNAM; IACUC protocol TRF17-14). Mice were maintained in an environment with a controlled 12-h light/dark cycle and access to food and water ad libitum. Female mice were mated, and the presence of a vaginal plug was considered as the first day of gestation. Finally, nonpregnant and pregnant females at 15 d of gestation were used to perform pain-related behavior assays.

**Pain Assays.** Mice were placed in separate plastic containers 1 h before the experiment to achieve adaptation to the experimental conditions (69). A stock solution of 20 µg/µL capsaicin in ethanol was prepared, and then a working solution of 0.28 µg/µL capsaicin in saline was prepared (70). The vehicle solution contained 1.4% ethanol in a saline solution, and 10 µL of this solution or 10 µL of capsaicin (0.28 µg/µL)-containing solution was intradermally injected into the hind paw of a mouse using a 30-gauge needle. The paw-licking behavior was quantified for 10 min and reported as cumulative PLT.

Animals were intrascapularly preinjected with either vehicle (water) or BD1063 (32 mg/kg) (71) 24 h before the pain response to capsaicin injection into their paws was evaluated. All behavioral experiments were conducted in an attenuated-noise room.

**DRG Isolation and Primary Cultures.** Adult C57BL/6J mice preinjected 24 h before with vehicle (water) or with BD1063 (32 mg/kg) were killed for DRG isolation, according to previous reports (72). DRGs were washed once with PBS and homogenized in lysis buffer (see above) for total protein isolation for immunodetection of Sig-1R, TRPV1, and GAPDH, as described in the *Western Blot* section.

For cultures of dissociated primary sensory neurons, DRGs were isolated according to a standardized protocol (72) and collected in a tube kept on ice with DMEM without  $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ . DRGs were washed with 1.5 mL DMEM. Ganglia were suspended in a collagenase type II/trypsin solution in DMEM (4 and 1.25 mg/mL, respectively) and incubated for 10 min in a 37 °C water bath. Then the ganglia were centrifuged for 1 min at low speed to form a pellet, whereupon the collagenase/trypsin solution was removed (73). Finally, the cell suspension was homogenized in 2 mL of prewarmed culture medium (DMEM with 10% FCS and penicillin/streptomycin) and cultured in 35-mm dishes. The cells were incubated at 37 °C with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  (73). Two hours after plating, fresh medium with 100 ng/mL nerve growth factor (NGF) and 0.25% methanol (control cultures) or NGF (100 ng/mL) and 25 µM of progesterone for 24 h was added. After 24 h of treatment, cells were fixed for immunofluorescence experiments or harvested for total protein isolation, and immunodetection of TRPV1 and GAPDH was performed.

**Statistical Analysis.** Statistical comparisons were made using the ANOVA or Student's *t* test and GraphPad Prism 7.0.  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant. Group data are reported as the mean  $\pm$  SEM.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank Yazmín Ramiro Cortés, Fernando García Hernández, Héctor Alfonso Malagón Rivero, Claudia Verónica Rivera Cerecedo, Ana Escalante, and Francisco Pérez at Instituto de Fisiología Celular (IFC) of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for expert technical support and Dr. Luis Lemus at IFC-UNAM for the art in Fig. 5B. This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) Grant IA202717; a grant from Beca para Mujeres en la Ciencia L'Oréal-UNESCO-CONACYT-AMC (to S.L.M.-L.); DGAPA-PAPIIT IN200717, CONACYT Grant CB-2014-01-238399; a grant from the Marcos Moshinsky Foundation (to T.R.); Fronteras de la Ciencia-CONACYT Grant 77 (to T.R. and L.D.I.); and DGAPA-PAPIIT Grant IN209515 (to L.D.I.).

- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267–284.
- Caterina MJ, et al. (1997) The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824.
- 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* 591:3109–3121.
- Shim WS, et al. (2007) TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *J Neurosci* 27:2331–2337.
- Szallasi A, Cruz F, Geppetti P (2006) TRPV1: A therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol Med* 12:545–554.
- Taberner FJ, Fernández-Ballester G, Fernández-Carvajal A, Ferrer-Montiel A (2015) TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim Biophys Acta* 1848:1818–1827.



7. Picazo-Juárez G, et al. (2011) Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *J Biol Chem* 286: 24966–24976.
8. Morales-Lázaro SL, et al. (2016) Inhibition of TRPV1 channels by a naturally occurring omega-9 fatty acid reduces pain and itch. *Nat Commun* 7:13092.
9. Zhang X, Li L, McNaughton PA (2008) Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron* 59: 450–461.
10. Láinez S, et al. (2010) GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *FASEB J* 24:1958–1970.
11. Bavassano C, et al. (2013) Identification of voltage-gated K(+) channel beta 2 (Kvβ2) subunit as a novel interaction partner of the pain transducer Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel (TRPV1). *Biochim Biophys Acta* 1833:3166–3175.
12. Peter J, et al. (2017) Ankyrin-rich membrane spanning protein as a novel modulator of transient receptor potential vanilloid 1-function in nociceptive neurons. *Eur J Pain* 21: 1072–1086.
13. Ciardo MG, et al. (2016) Whirlin increases TRPV1 channel expression and cellular stability. *Biochim Biophys Acta* 1863:115–127.
14. Schmidt HR, et al. (2016) Crystal structure of the human  $\sigma$ 1 receptor. *Nature* 532: 527–530.
15. Hayashi T, Su TP (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell* 131:596–610.
16. Fontanilla D, et al. (2009) The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science* 323:934–937.
17. Su TP, et al. (1991) Sigma compounds derived from phencyclidine: Identification of PRE-084, a new, selective sigma ligand. *J Pharmacol Exp Ther* 259:543–550.
18. Maurice T, Su TP, Privat A (1998) Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience* 83:413–428.
19. Kourrich S, et al. (2013) Dynamic interaction between sigma-1 receptor and Kv1.2 shapes neuronal and behavioral responses to cocaine. *Cell* 152:236–247.
20. Su TP, Hayashi T, Maurice T, Buch S, Ruoho AE (2010) The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol Sci* 31:557–566.
21. Su TP, Su TC, Nakamura Y, Tsai SY (2016) The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol Sci* 37:262–278.
22. Kinoshita M, Matsuoka Y, Suzuki T, Mirrielees J, Yang J (2012) Sigma-1 receptor alters the kinetics of Kv1.3 voltage gated potassium channels but not the sensitivity to receptor ligands. *Brain Res* 1452:1–9.
23. Balasuriya D, et al. (2014) A direct interaction between the sigma-1 receptor and the hERG voltage-gated K+ channel revealed by atomic force microscopy and homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF®). *J Biol Chem* 289:32353–32363.
24. Balasuriya D, et al. (2012) The sigma-1 receptor binds to the Nav1.5 voltage-gated Na+ channel with 4-fold symmetry. *J Biol Chem* 287:37021–37029.
25. Romero L, Merlos M, Vela JM (2016) Antinociception by sigma-1 receptor antagonists: Central and peripheral effects. *Adv Pharmacol* 75:179–215.
26. Maurice T, Urani A, Phan VL, Romieu P (2001) The interaction between neuroactive steroids and the sigma1 receptor function: Behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res Brain Res Rev* 37:116–132.
27. Kelley BG, Mermelstein PG (2011) Progesterone blocks multiple routes of ion flux. *Mol Cell Neurosci* 48:137–141.
28. Wei J, Xiao GM (2013) The neuroprotective effects of progesterone on traumatic brain injury: Current status and future prospects. *Acta Pharmacol Sin* 34:1485–1490.
29. Schumacher M, et al. (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: Implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci* 6:10.
30. Coronel MF, Labombarda F, Villar MJ, De Nicola AF, González SL (2011) Progesterone prevents allodynia after experimental spinal cord injury. *J Pain* 12:71–83.
31. Entrena JM, et al. (2009) Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: Studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *Pain* 143:252–261.
32. Holinka CF, Tseng YC, Finch CE (1979) Reproductive aging in C57BL/6J mice: Plasma progesterone, viable embryos and resorption frequency throughout pregnancy. *Biol Reprod* 20:1201–1211.
33. Entrena JM, et al. (2016) Sigma-1 receptor agonism promotes mechanical allodynia after priming the nociceptive system with capsaicin. *Sci Rep* 6:37835.
34. Veldhuis NA, et al. (2012) N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor. *J Biol Chem* 287:21765–21772.
35. Rosenbaum T, Awaya M, Gordon SE (2002) Subunit modification and association in VR1 ion channels. *BMC Neurosci* 3:4.
36. Ortega-Roldan JL, Ossa F, Schnell JR (2013) Characterization of the human sigma-1 receptor chaperone domain structure and binding immunoglobulin protein (BiP) interactions. *J Biol Chem* 288:21448–21457.
37. Merulla J, Fasana E, Soldà T, Molinari M (2013) Specificity and regulation of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *Traffic* 14:767–777.
38. Sanz-Salvador L, Andrés-Borderia A, Ferrer-Montiel A, Planells-Cases R (2012) Agonist- and Ca2+-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *J Biol Chem* 287:19462–19471.
39. Matsumoto RR, et al. (1995) Characterization of two novel sigma receptor ligands: Antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism. *Eur J Pharmacol* 280: 301–310.
40. Hammes SR, Levin ER (2007) Extranuclear steroid receptors: Nature and actions. *Endocr Rev* 28:726–741.
41. Jang JH, Min KJ, Kim S, Park JW, Kwon TK (2016) RU486 induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress through the induction of CHOP expression by enhancing C/EBP $\delta$  expression in human renal carcinoma Caki cells. *J Cell Biochem* 117:361–369.
42. Wu ZY, Yu DJ, Soong TW, Dawe GS, Bian JS (2011) Progesterone impairs human ethera-go-go-related gene (HERG) trafficking by disruption of intracellular cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 286:22186–22194.
43. Zheng J, Ali A, Ramirez VD (1996) Steroids conjugated to bovine serum albumin as tools to demonstrate specific steroid neuronal membrane binding sites. *J Psychiatry Neurosci* 21:187–197.
44. Zheng J (2006) Spectroscopy-based quantitative fluorescence resonance energy transfer analysis. *Methods Mol Biol* 337:65–77.
45. Liu NJ, Gintzler AR (2000) Prolonged ovarian sex steroid treatment of male rats produces antinociception: Identification of sex-based divergent analgesic mechanisms. *Pain* 85:273–281.
46. Bartley EJ, Fillingim RB (2013) Sex differences in pain: A brief review of clinical and experimental findings. *Br J Anaesth* 111:52–58.
47. Wise EA, Price DD, Myers CD, Heft MW, Robinson ME (2002) Gender role expectations of pain: Relationship to experimental pain perception. *Pain* 96:335–342.
48. Sander HW, Gintzler AR (1987) Spinal cord mediation of the opioid analgesia of pregnancy. *Brain Res* 408:389–393.
49. Dawson-Basoa ME, Gintzler AR (1996) Estrogen and progesterone activate spinal kappa-opiate receptor analgesic mechanisms. *Pain* 64:608–615.
50. Dawson-Basoa M, Gintzler AR (1998) Gestational and ovarian sex steroid antinociception: Synergy between spinal kappa and delta opioid systems. *Brain Res* 794: 61–67.
51. Maurice T, Roman FJ, Privat A (1996) Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[3H]SKF-10,047 binding to sigma 1 receptors in the mouse forebrain. *J Neurosci Res* 46:734–743.
52. Cotté D, et al. (2011) Sig1R protein regulates hERG channel expression through a post-translational mechanism in leukemic cells. *J Biol Chem* 286:27947–27958.
53. Rosenbaum EE, et al. (2011) XPORT-dependent transport of TRP and rhodopsin. *Neuron* 72:602–615.
54. Mishra AK, et al. (2015) The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. *Biochem J* 466: 263–271.
55. Brune S, et al. (2014) The sigma enigma: In vitro/in silico site-directed mutagenesis studies unveil  $\sigma$ 1 receptor ligand binding. *Biochemistry* 53:2993–3003.
56. Garg D, Ng SSM, Baig KM, Driggers P, Segars J (2017) Progesterone-mediated non-classical signaling. *Trends Endocrinol Metab* 28:656–668.
57. Brodsky JL (2012) Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell* 151: 1163–1167.
58. Cohen DM (2006) Regulation of TRP channels by N-linked glycosylation. *Semin Cell Dev Biol* 17:630–637.
59. Carnally SM, Johannessen M, Henderson RM, Jackson MB, Edwardson JM (2010) Demonstration of a direct interaction between sigma-1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophys J* 98:1182–1191.
60. Prados MB, Caramelo JJ, Miranda SE (2013) Progesterone regulates the expression and activity of two mouse isoforms of the glycoprotein folding sensor UDP-Glc: Glycoprotein glucosyltransferase (UGGT). *Biochim Biophys Acta* 1833:3368–3374.
61. Amer MS, et al. (2013) Inhibition of endothelial cell Ca<sup>2+</sup> entry and transient receptor potential channels by sigma-1 receptor ligands. *Br J Pharmacol* 168:1445–1455.
62. Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE (1997) RU486 (mifepristone): Mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med* 48:129–156.
63. Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK (1997) Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem* 272:9086–9092.
64. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85–100.
65. Lee C (2007) Coimmunoprecipitation assay. *Methods Mol Biol* 362:401–406.
66. Zheng J, Trudeau MC, Zagotta WN (2002) Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron* 36:891–896.
67. Edelstein A, Amodaj N, Hoover K, Vale R, Stuurman N (2010) Computer control of microscopes using microManager. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 14:Unit14.20.
68. De-la-Rosa V, Rangel-Yescas GE, Ladrón-de-Guevara E, Rosenbaum T, Islas LD (2013) Coarse architecture of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel determined by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 288:29506–29517.
69. Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K (1992) The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 31: 1279–1285.
70. Nieto-Posadas A, et al. (2011) Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat Chem Biol* 8:78–85, and erratum (2012) 8:737.
71. Nieto FR, et al. (2014) Genetic inactivation and pharmacological blockade of sigma-1 receptors prevent paclitaxel-induced sensory-nerve mitochondrial abnormalities and neuropathic pain in mice. *Mol Pain* 10:11.
72. Sleight JN, Weir GA, Schiavo G (2016) A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC Res Notes* 9:82.
73. Malin SA, Davis BM, Molliver DC (2007) Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc* 2:152–160.