



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PLAN DE ESTUDIOS COMBINADOS EN MEDICINA**

ENTIDADES ACADÉMICAS: INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN, FACULTAD DE MEDICINA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.

CAMPO DE CONOCIMIENTO: MEDICINA (GASTROENTEROLOGÍA)

EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE LA SUBFAMILIA TRPV (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 y TRPV6) EN PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA.

**TESIS**

QUE OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN MEDICINA

PRESENTA:

JOEL JESÚS TOLEDO MAURÍÑO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho. Fundador y director de la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

COMITÉ TUTOR:

COTUTOR DE TESIS: Dr. Julio Granados Arriola. Investigador de Transplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

COTUTORA DE TESIS: Dra. Gabriela Fonseca Camarillo. Investigador asociado a la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Cd. de México., Septiembre, 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PLAN DE ESTUDIOS COMBINADOS EN MEDICINA

ENTIDADES ACADÉMICAS: INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN, FACULTAD DE MEDICINA, INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.

CAMPO DE CONOCIMIENTO: MEDICINA (GASTROENTEROLOGÍA)

EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE LA SUBFAMILIA TRPV (TRPV1, TRPV2, TRPV3,  
TRPV4, TRPV5 y TRPV6) EN PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA CRÓNICA  
IDIOPÁTICA.

**TESIS**

QUE OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN MEDICINA

PRESENTA:

JOEL JESÚS TOLEDO MAURIÑO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho. Fundador y director de la  
Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Departamento de Gastroenterología del Instituto  
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

COMITÉ TUTOR:

COTUTOR DE TESIS: Dr. Julio Granados Arriola. Investigador de Transplantes del Instituto  
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

COTUTORA DE TESIS: Dra. Gabriela Fonseca Camarillo. Investigador asociado a la Clínica de  
Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador  
Zubirán.

Cd. de México., Septiembre, 2020.

## COPIA DEL OFICIO DE EMPASTE



FACULTAD DE MEDICINA  
PLAN DE ESTUDIOS  
COMBINADOS EN MEDICINA  
FM/SG/PECEM/308/2020

Asunto: Aprobación de Jurado para  
examen de grado

Med. Cir. Joel Jesús Toledo Mauriño  
No. de cuenta: 309269180

Me permito informar a usted, que el Comité Académico del Plan de Estudios Combinados en Medicina "PECEM", en su sesión ordinaria, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTOR EN MEDICINA** con la tesis titulada "**Expresión génica y proteica de la subfamilia de receptores de potencial transitorio activados por vaniloides TRPV1-6 en pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática**", bajo la dirección del **Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho**.

Jurado:

**Presidente:** Dr. Armando Tovar Palacio  
**Secretario:** Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho  
**Vocal:** Dr. Nahum Méndez Sánchez  
**Vocal:** Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
**Vocal:** Dr. Martha Robles Flores

Asimismo, informo a usted y a los honorables miembros del jurado, que tendrán un plazo de hasta 40 días hábiles, contados a partir del momento en que oficialmente reciban el manuscrito de la tesis, para revisar el documento y emitir por escrito su voto aprobatorio fundamentado.

Sin otro particular, me despido.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F., 23 de noviembre de 2020

Dra. Ana Flisser  
Coordinadora PECEM

Miembros del Jurado



**AGRADECIMIENTOS:**

**PLAN DE ESTUDIOS COMBINADOS EN MEDICINA, UNAM, IIB**

**Beca CONACYT**

**Dr. Jesús Kazuo Yamamoto Furusho**

**Dr. Julio Granados Arriola**

**Dra. Gabriela Fonseca Camarillo**

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

**Virgina Mauriño Guzmán**

**Joel Toledo Molano**

**Martha Mauriño Guzmán**

**Ana Flisser Steinbruch**

**Martha Patricia Ostrosky Shejet de Wegman**

**David Kershenobich Stalnikowitz**

**Luis Federico Uscanga Domínguez**

**José de Jesús Villalobos Pérez**

**Gerardo Gamba Ayala**

**Edgar Zenteno Galindo**

**Armando Tovar Palacios**

**Edda Sciutto Conde**

**Ulises García García**

**Thomas Henry Seligmann Schurch**

**Samuel Ponce de León**

**Gabriela Meneses Ruiz**

**Carlos Alfonso Gutiérrez-Cirlos Madrid**

**Rodolfo Rincón Pedrero**

**Melchor Sánchez Mendiola**

DEDICATORIA:

Dedico esta tesis a mis padres, quiénes han hecho un esfuerzo incansable y me han brindado todo su apoyo para que me haya sido posible realizar este trabajo.

A mis maestros quienes a lo largo de toda mi trayectoria académica me proporcionaron los conocimientos y aprendizajes que me fueron necesarios para lograr todas las metas que me he propuesto

A la coordinadora del Plan de Estudios Combinados en Medicina, Dra. Ana Flisser Steinbruch le extiendo un enorme agradecimiento y dedico a ella esta tesis por toda la atención y apoyo que me brindó durante mi estancia en dicho programa.

A los sinodales quienes estudiaron mi tesis y la han aprobado

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis



## ÍNDICE

1. Lista de Figuras y Tablas 10
2. Resumen 12
3. Abstract 14
4. Introducción 16
  - a. Definición de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática y Enfermedad de Crohn
  - b. Epidemiología
  - c. Etiopatogenia
  - d. Histopatología
  - e. Pronóstico
  - f. Manifestaciones Clínicas
  - g. Manifestaciones Extraintestinales
  - h. Historia Natural de la Enfermedad
  - i. Diagnóstico
  - j. Diagnóstico Diferencial
  - k. Evaluación del Grado de Actividad Endoscópica de la CUCI
    - l. Evaluación Histológica
    - m. Evaluación de la Extensión
    - n. Tratamiento
    - o. Complicaciones
5. Antecedentes 27
  - a. Familia de Canales Receptores de Potencial Transitorio (TRP)
  - b. Subfamilia de Canales Receptores de Potencial Transitorio Activados por Vaniloides (TRPV)
6. Objetivos 38
  - a. Objetivo General
  - b. Objetivos Particulares
7. Metodología 39
  - a. Diseño del Estudio
  - b. Descripción de la maniobra

- c. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)
  - d. Inmunohistoquímica Indirecta
  - e. Variables
  - f. Frecuencia de las mediciones
  - g. Estrategia de análisis estadístico
  - h. Frecuencia de las mediciones
  - i. Estrategia de Análisis Estadístico
8. Resultados 49
- a. Características Clínicas y Sociodemográficas
  - b. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
  - c. Análisis Correlacional de variables clínicas con Niveles de Expresión génica
  - d. Inmunohistoquímica Indirecta
9. Discusión 62
10. Conclusiones 65
11. Bibliografía 66
12. Apéndice I (Abreviaturas) 76
13. Apéndice II (Artículos Presentados) 79

## **1. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS**

### Figuras

Figura 1: Niveles de expresión génica de TRPV1

Figura 2: Niveles de expresión génica de TRPV2-6

Figura 2: Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV1 en piezas de colectomía

Figura 3: Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV2 en piezas de colectomía

Figura 4: Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV3 en piezas de colectomía

Figura 5: Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV4 en piezas de colectomía

Figura 6: Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV5 en piezas de colectomía

Figura 7: Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV6 en piezas de colectomía

## Tablas

Tabla 1. Manifestaciones extraintestinales asociadas con la EII

Tabla 2: Clasificación de MEIS de acuerdo con actividad de la EII

Tabla 3: Diagnóstico diferencial de la Colitis Ulcerativa Crónica Idiopática

Tabla 4: Escala de Truelove-Witts

Tabla 5: Índice de Sutherland o UCDAI

Tabla 6: Criterios para la evaluación de Mayo Modificada

Tabla 7: Criterios para la evaluación histológica mediante la escala de Riley

Tabla 8: Clasificación de Montreal de la CUCI

Tabla 9: Esquemas de tratamiento de la CUCI

Tabla 10: Descripción general de la subfamilia TRPV (TRPV1-6)

Tabla 11: Lista de Oligonucleótidos empleados para la realización de PCR en Tiempo Real

Tabla 12: Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes incluidos para realización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (TRPV1)

Tabla 13: Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes incluidos para realización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (TRPV2-6)

Tabla 14: Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes incluidos para la realización de Inmunohistoquímica Indirecta

## **2. RESÚMEN:**

### Antecedentes

La CUCI (Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática) y la enfermedad de Crohn (EC) representan los dos principales tipos de enfermedad inflamatoria intestinal. Los miembros de la subfamilia de receptores de potencial transitorio activados por vaniloides (TRPV) está conformada por 6 miembros (TRPV1-6) con grados variantes de homología en la secuencia de aminoácidos. Sin importar estas similitudes, los TRPV son altamente inusuales entre las familias conocidas de canales de iones en el hecho de que muestran una gran diversidad de selectividad a cationes y mecanismos de activación específicos los cuales se han visto relacionados con el desarrollo de procesos inflamatorios a nivel intestinal.

**Objetivo:** Caracterizar la expresión génica de la subfamilia de canales receptores de potencial transitorio activados por vaniloides (TRPV), en los pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

**Materiales y Métodos:** Estudio transversal y comparativo que incluirá un total de 45 pacientes con CUCI (29 activos y 16 en remisión) y 26 controles. Se obtuvo biopsia de recto durante estudio endoscópico de seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio, conservación en RNAlater. Se obtuvieron cortes de piezas quirúrgicas de 5 pacientes colectomizados por CUCI con actividad grave y 5 controles que consistirán en pacientes colectomizados por cáncer de colon (zona normal). Se llevó a cabo Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real de TRPV 1-6 utilizando como genes constitutivos GAPDH y b-actina. Se llevó a cabo Inmunohistoquímica Indirecta. Realización de Análisis Estadístico empleando SPSS v.22 e Image Pro Plus v.11.0.

### Resultados

Los niveles de expresión génica de TRPV1 en el caso del grupo con CUCI en remisión fueron significativamente más altos que en el grupo de pacientes con CUCI activo y controles sanos. El grupo de pacientes con CUCI activo mostró un nivel de expresión génica de TRPV2 más alto que el grupo de controles sanos y CUCI remisión. El grupo control sano mostró un nivel de expresión génica de TRPV3 significativamente mayor que tanto el grupo de CUCI activo

como el remisión. El grupo de pacientes con CUCI en remisión mostro un nivel de expresión génica de TRPV4 significativamente mayor que los pacientes con CUCI activo y los controles sanos. El nivel de expresión génica de TRPV5 de los pacientes control fue mayor que tanto los pacientes con CUCI activo como remisión. El grupo de pacientes con CUCI en remisión mostró un nivel de expresión de TRPV6 mayor que los grupos de CUCI activo y el grupo control no inflamatorio. El grupo de pacientes con CUCI activo mostró un nivel de expresión proteica significativamente mayor de TRPV1 a lo largo de todas las capas intestinales teniendo como probables estirpes celulares células de origen linfoide y células endoteliales. El nivel de expresión proteica de TRPV2 fue significativamente más alto en el caso de los pacientes control en comparación con los pacientes con CUCI grave en submucosa y mucosa, aunque en muscular y serosa fue mayor que en el caso de los pacientes con CUCI activo en comparación con los pacientes control. El nivel de expresión proteica de TRPV3 fue significativa en el caso de pacientes control en comparación con los pacientes con CUCI activo a lo largo de todas las capas del intestino con detección tanto en células del epitelio intestinal, células de origen linfoide, células musculares y células del endotelio. El nivel de expresión proteica de TRPV4 fue significativamente mayor en el caso de los pacientes Control en comparación con los pacientes con CUCI grave a lo largo de todas las capas a expensas de células origen linfoide y células endoteliales. El nivel de expresión de TRPV5 fue significativamente mayor que los pacientes control sólo en caso de la submucosa y la serosa en comparación con los cortes de los pacientes con CUCI activo a expensas de células del epitelio intestinal, células de origen linfoide y células endoteliales. Los pacientes con CUCI activo mostraron un nivel de expresión proteica de TRPV6 significativamente mayor en comparación con el de las laminillas control a lo largo de todas las capas intestinales a expensas de células de origen linfoide y del epitelio intestinal.

Conclusiones: La subfamilia TRPV claramente está involucrada en el desarrollo del proceso inflamatorio en pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

### **3. ABSTRACT:**

#### Antecedents

The members of the subfamily of transitory receptor potential channels activated by vanilloids (TRPV) is conformed by 6 members (TRPV1-6) with varying degrees of sequence homology and cation permeability. Without taking into account such similarities, TRP are highly unusual between the known families of ion channels in the fact that they show a great diversity of selectivity to cations and activation mechanisms that have been related to the development of bowel inflammation.

Objective: To characterize the gene expression of the subfamily of transient receptor potential channels activated by vanilloids (TRPV) in patients with Ulcerative Colitis.

#### Materials and Methods

Transversal and comparative type study that included a total of 45 UC patients (29 active UC and 16 remission UC) and 26 controls. Biopsy was obtained from rectum during the endoscopic study of follow-up in the patients included in the study, conservation in RNA later. Surgical specimens were obtained from 5 patients colectomized due to severe disease and 5 controls that consisted of patients colectomized due to colon cancer (normal zone). Real Time Polymerase Chain Reaction was done for TRPV1-6 using GAPDH and  $\beta$ -actin as constitutive genes. Indirect immunohistochemistry was done for the same TRPV1-6 genes using the obtained surgical specimens. Statistical analysis was done employing SPSS v.22.0 and Image Pro Plus v.11.0.

#### Results

Levels of gene expression of TRPV1 in the case of the group with remission UC were significantly higher than the group of patients with active UC and healthy controls. The group of patients with active UC showed a higher level of gene expression than the group of healthy controls and remission UC. The group of healthy controls showed a level of gene expression of TRPV3 significantly higher than the one of the active UC group as the one of remission UC. The group of patients with remission UC showed an expression level of TRPV4 significantly higher than the one of the patients with active UC and healthy controls. The

level of gene expression of TRPV5 of the control patients was higher than the one of the patients with active UC and remission UC. The group of remission UC patients showed an expression level of TRPV6 higher than the one of the groups with active UC and the non-inflammatory control group. The group of patients with active UC showed a protein expression level significantly higher of TRPV1 through all the intestinal layers taking as probable cell types cells from lymphoid origin and endothelial cells. The level of protein expression of TRPV2 was significantly higher in the case of the control patients in comparison with the patients with severe UC in submucosa and mucosa though in muscular and serosa it was higher than in the case of patients with active UC in comparison with the control patients. The level of protein expression of TRPV3 was significantly higher in the case of control patients in comparison with the patients with active UC through all the intestinal layers with detection in cells of intestinal epithelium, cells from lymphoid origin, muscular cells and endothelial cells. The level of protein expression of TRPV4 was significantly higher in the case of the control patients in comparison with the patients with severe UC through all layers having as source cells from lymphoid origin and endothelial cells. The level of expression of TRPV5 was significantly higher in control patients only in the case of submucosa and serosa in comparison with the slides of active UC patients having as cellular sources cells from intestinal epithelium, lymphoid origin cells and endothelial cells. Patients with active UC showed a level of protein expression of TRPV6 significantly higher in comparison with the control slides through all intestinal layers having as cell sources cells from lymphoid origin and from the intestinal epithelium.

## Conclusions

The TRPV subfamily was involved in the development of the development of the inflammatory process in patients with Ulcerative Colitis.



#### **4. INTRODUCCIÓN:**

##### **a. Definición de Enfermedad inflamatoria Intestinal, Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática y Enfermedad de Crohn**

La CUCI (Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática) y la enfermedad de Crohn representan los dos principales tipos de EII (Enfermedad Inflamatoria Intestinal) (1).

En 1978, Price introdujo el término colitis indeterminada para describir casos de colitis grave o fulminante después de que la colectomía se había llevado a cabo y la examinación completa del espécimen quirúrgico había fallado en hacer la distinción entre Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática y la enfermedad de Crohn (2).

##### **b. Epidemiología**

Las tasas de incidencia y prevalencia más altas de CUCI y enfermedad de Crohn han ido comenzando a estabilizarse. Las tasas siguen creciendo en áreas de baja incidencia como el sur de Europa, Asia y la mayoría de los países en desarrollo. En Norteamérica, las tasas de prevalencia de enfermedad de Crohn para Hispanos (4.1 por cada 100,000) y personas asiáticas (5.6 por cada 100,000) son mucho menores que aquellas para individuos blancos (43.6 por cada 100,000). La importancia de la raza y el origen étnico en el riesgo (3).

En México, no existen datos concluyentes, aunque la incidencia de CUCI se cree estar entre 0.2% a 4.89%, mientras que para la EC se calcula ser de 0.0008% a 1.11%. También se ha observado que, dentro de un mismo país, la presencia de la enfermedad es más común en el norte de esos países que en el sur (4).

Se han observado cambios en la incidencia de estas enfermedades, las cuales han mostrado un incremento en términos generales, siendo más notorio el incremento en pacientes con EC, con datos contradictorios en las personas con CUCI. En México, parece existir un incremento similar al informado en otras partes del mundo de acuerdo con el estudio EPIMEX(5).

### **c. Etiopatogenia**

#### Genética

La CUCI es tres a cinco veces más prevalente en judíos y existen diferencias epidemiológicas importantes entre judíos que viven en Israel y aquéllos que viven en otros lugares. La prevalencia se iguala con el tiempo con la migración a otras áreas. Este cambio en la prevalencia después de la migración se ha mostrado en otros grupos (ej, chinos que viven en Hong Kong comparados con el área principal de China) y, junto con la incidencia y prevalencia creciente en países desarrollados, sugiere efectos ambientales y en el estilo de vida adicionales sobre la incidencia y prevalencia. La agregación familiar de la enfermedad inflamatoria intestinal se reportó por primera vez en 1930. Una historia familiar positiva es aún el factor de riesgo independiente más importante para el desarrollo de la enfermedad. El riesgo más alto para los parientes es el de desarrollar la misma enfermedad que el familiar afectado. Las personas con CUCI tienen un familiar de primera línea con la enfermedad en 5.7-15.5% de los casos y con enfermedad inflamatoria intestinal en 6.6% a 15.8%. Las figuras equivalentes para familiares de primera línea de un afectado por CUCI son de 1.6% para no Judíos y 5.2% para Judíos. La concordancia para tipo de enfermedad, patrón de enfermedad y presencia de manifestaciones extraintestinales son de 75-80%, 64% y 70% respectivamente. La mayor evidencia de factores genéticos contribuyentes a la susceptibilidad de enfermedad inflamatoria intestinal viene de la concordancia de estudios en gemelos. El primer análisis sistemático de concordancia desde entonces ha sido dejado como de apoyo para otros estudios, mostrando una concordancia en gemelos monocigóticos de 37.3% para la enfermedad de Crohn y 10% para CUCI. Esto con una concordancia de 7% en gemelos dicigóticos con enfermedad de Crohn y 3% para CUCI. La contribución genética para el desarrollo de enfermedad inflamatoria intestinal parece, entonces, ser más importante en el caso de la enfermedad de Crohn que en CUCI, con múltiples productos génicos contribuyendo al riesgo (6).

## Factores ambientales

### Variabilidad Geográfica y temporal

Las tasas de incidencia más altas y la prevalencia para colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn están reportadas para Norteamérica y el norte de Europa. Las tasas más bajas de incidencia están reportadas en Sudamérica, sureste de Asia, África (con excepción de Sudáfrica), y Australia. A pesar de que estos datos sugieren que existe un gradiente de norte a sur, podrían además indicar variación en el acceso a y calidad de cuidados de la salud, así como diferentes grados de industrialización, sanitización e higiene. Varias áreas con tasas bajas de incidencia incluyen países en vías de desarrollo. Las tasas diferentes de incidencia podrían además resultar de diferentes trasfondos genéticos de los residentes de estas partes del mundo. Factores más importantes, de cualquier forma, parecen ser otros que los ambientales. Esta hipótesis es apoyada por las tasas de incidencia recientes entre inmigrantes de regiones de baja incidencia que se trasladan a países desarrollados y una correlación de tasas de incidencia con la industrialización en Hong Kong y la región principal de China (7).

### Dieta

Previamente se ha establecido que la EII es una enfermedad mediada principalmente por dietas occidentalizadas, las cuales tienden a reducir la diversidad microbiana y contienen altos niveles de grasa, n-6 PUFA, tanto carne roja como procesadas y un bajo contenido de frutas y vegetales (8,9).

### Factores inmunes

Existe una serie de eventos inflamatorios dados cuando las células presentadoras de antígenos, células dendríticas y macrófagos, endocitan antígenos bacterianos al sitio inicial de infección, la luz. En la lámina propia, éstas células se diferencian en fenotipos inflamatorios o efectores, los macrófagos M1 y células que secretan mediadores inflamatorios incluyendo factores que apoyan la infiltración de macrófagos adicionales e n reposo y precursores de células dendríticas así como células T en reposo aunado a la secreción de las citocinas IL-12, IFN-g, TNF a e IL23 induciendo su diferenciación hacia células T-helper proinflamatorias, específicamente Th1 o fenotipos Th17, los cuales también

secretan mediadores inflamatorios. Las células presentadoras de antígenos también pueden migrar fuera del sitio de infección hacia tejido linfoide donde pueden contactar y estimular una mayor concentración de células T que, a su vez, se relocalizaran en el sitio de infección en la lámina propia. En dicho sitio, las células Th1 y Th17 actúan de manera sinérgica con M1 y células dendríticas para reclutar más monocitos y promover su diferenciación a M1 pro-inflamatorio y fenotipos de células dendríticas cercanos a un bucle de retroalimentación (10).

#### **d. Histopatología**

**Examen Macroscópico:** El examen a groso de la resección de un espécimen de CUCI muestra clásicamente inflamación difusa y continua sin lesiones no salteadas, lo cual involucra al recto y se disemina de forma proximal con una gravedad de la inflamación en disminución gradual. La transición entre la mucosa involucrada y la normal es tenue. La mucosa muestra una apariencia friable y granular y muestra úlceras superficiales. En caso de enfermedad grave, estas úlceras pueden subyacer la mucosa adyacente, resultando finalmente en la denudación de la superficie mucosa o penetración profunda a través de la muscularis mucosa. La ulceración extensa con respeto de las islas mucosas restantes puede dar lugar a pólipos inflamatorios, lo cual es común en el colon descendente pero raro en el recto.

**Examen Microscópico:** La evaluación de la celularidad de la lámina propia anormal en CUCI se refiere a la distribución incrementada y o alterada de los tipos celulares presentes normalmente en la mucosa colorrectal. Aparte de áreas de ulceración franca, el infiltrado inflamatorio está presente en la enfermedad no tratada limitado a la mucosa, difusa o continua sin ninguna variación en intensidad o lesiones salteadas y su severidad se incrementa característicamente hacia el recto. Las células plasmáticas se observan predominantemente entre la base de las criptas y la muscularis mucosa. Las alteraciones en la arquitectura de la mucosa debida inflamación crónica se reflejan en anormalidades de la arquitectura críptica (distorsión, bifurcaciones y atrofia), la densidad disminuida de las criptas (separación de criptas adyacentes por equivalente de la lámina propia a o mayor del diámetro de una cripta) y cambios en la tomografía de superficie (irregularidad de superficie). Además, se pueden encontrar anormalidades del epitelio como daño a la superficie epitelial, depleción de mucina y cambios metaplásicos (11).

### **e. Pronóstico**

Se ha desarrollado una serie de herramientas para ayudar a predecir el curso del EII. Una cohorte de pacientes con CUCI de los asuntos de veteranos identificó 699 pacientes que fueron seguidos por una media de 8 años después del diagnóstico. 2/3 de los pacientes fueron necesitados para construirlo y 1/3 de los pacientes fue utilizado para validarlo. El resultado El resultado primario fue el uso de corticoesteroides para tratar la CUCI. Las variables utilizadas en el modelo para predecir el uso de esteroides incluyeron edad, etnicidad americana no africana, presencia de hipoalbuminemia, anemia por deficiencia de hierro al momento del diagnóstico, extensión endoscópica de la enfermedad y gravedad de la enfermedad en la colonoscopia índice. Otro modelo observado para predecir el riesgo de colitis grave en los primeros 3 desde el diagnóstico. Este estudio de un solo centro creó un sistema de puntaje que va de 0 a 3. Los pacientes recibieron 1 punto por cada uno de los siguientes hallazgos: Enfermedad extensa, Proteína C reactiva mayor a 10 mg/L, o hemoglobina al tiempo del diagnóstico menos de 14 g/dl si el paciente es hombre. Si el paciente presentó los 3 hallazgos al tiempo del diagnóstico, el modelo predijo un riesgo de 70% de desarrollar colitis aguda dentro de 3 años (12).

### **f. Manifestaciones Clínicas**

La diarrea sanguinolenta con o sin moco es la manifestación más característica de la CUCI. La aparición es típicamente gradual, seguida frecuentemente por periodos espontáneos de remisión y recaídas subsecuentes. La enfermedad activa se manifiesta como inflamación mucosa comenzando en el recto (proctitis) y algunos casos diseminándose al resto del colon. Aunque la proctitis se asocia frecuentemente con urgencia fecal y pasaje de sangre fresca puede ocurrir constipación paradójica. La proctosigmoiditis, colitis izquierda o la pancolitis pueden llevar a diarrea, evacuaciones frecuentes de sangre, moco, urgencia, tenesmo, dolor abdominal, fiebre, malestar general y pérdida de peso dependiendo de la extensión y gravedad de la enfermedad. Una pequeña área de inflamación rodeando el orificio apendicular puede ser identificada en pacientes con colitis izquierda y en aquellos con proctitis o proctosigmoiditis, aunque éste es un hallazgo inespecífico (13).

### g. Manifestaciones Extraintestinales

Las manifestaciones extraintestinales (MEIs) asociadas con la EII son condiciones vistas comúnmente en pacientes que sufren de CUCI. Estas manifestaciones pueden involucrar diversos sistemas orgánicos y pueden desarrollarse antes de la aparición de síntomas gastrointestinales. La fisiopatología subyacente relacionada con el desarrollo de MEIs asociado con EII permanece incierto. Se han propuesto diversas hipótesis incluyendo susceptibilidad genética, autorreconocimiento anormal y autoanticuerpos contra antígenos celulares órgano-específicos compartidos por el tracto gastrointestinal y otros sistemas orgánicos (14).

Tabla 1. Manifestaciones extraintestinales asociadas con la EII

Manifestaciones extraintestinales asociadas con la EII	
Musculoesqueléticas	Artritis pauciarticular Artropatías axiales
Dermatológicas	Eritema nodosum Pioderma gangrenosum Ulceras aftosas Síndrome de Sweet
Oculares	Uveítis Epiescleritis
Hepatobiliares	Colangitis Esclerosante Primaria (CEP) Colelitiasis Trombosis Venosa Profunda (TVP)
Pulmonares	Enfermedad de grandes y pequeñas vías aéreas Bronquitis crónica Bronquiectasias
Renales	Nefrolitiasis Uropatía obstructiva Fistulización

(Brown SR et al, 2015)

Las MEIs se pueden clasificar en 3 grupos, basado en la asociación que éstas tengan con la actividad de la enfermedad intestinal (15).

Tabla 2: Clasificación de MEIS de acuerdo con actividad de la EII

Asociación entre la EII y las MEIs
Grupo I: MEIs paralelas a la actividad de la EII
Ulceras aftosas orales Eritema nodosum Artritis pauciarticular Epiescleritis
Grupo II: MEIs con curso independiente de la actividad de la EII
Espondilitis anquilosante Uveitis
Grupo III: MEIs y actividad incoherente de la EII
CEP Pioderma gangrenosum

(Triksudanathan G et al, 2012)

#### **h. Historia Natural de la Enfermedad**

El curso clínico típico de la CUCI está caracterizado por recaídas recurrentes y remisión, pero los pacientes estables frecuentemente permanecen estables (Un paciente con enfermedad clínicamente activa tiene un 80-90% de probabilidad de permanecer así al año siguiente), y aquellos con recaídas recaen más frecuentemente (Un paciente con enfermedad clínicamente activa tiene un 70-90% de posibilidad de recaída al año siguiente)

La mayoría de los pacientes con CUCI tienen síntomas leves a moderados al momento del diagnóstico. Tener un intervalo de menos de 2 años desde el diagnóstico hasta la primera recaída y la presencia de fiebre o pérdida de peso al momento del diagnóstico son factores que pueden incrementar el riesgo de recaídas subsecuentes. La extensión de la inflamación mucosa se correlaciona con la gravedad del curso de la enfermedad, aquellos con pancolitis sobretodo tienen una enfermedad más grave (16).

#### **i. Diagnóstico**

La colitis ulcerativa es un diagnóstico clínico, confirmado por hallazgos objetivos de estudios endoscópicos e histológicos. La enfermedad intestinal no inflamatoria hace que se necesite descartar la colitis (17).

## j. Diagnóstico Diferencial

Existe una variedad de enfermedades inflamatorias y no inflamatorias del colon que pueden mimetizar CUCI y necesitan ser consideradas en el establecimiento del diagnóstico correcto. Este diagnóstico diferencial puede agruparse ampliamente en 3 categorías: Enfermedad de Crohn, infecciones y causas no infecciosas (18)

Tabla 3: Diagnóstico diferencial de la Colitis Ulcerativa Crónica Idiopática

Diagnóstico diferencial de la Colitis Ulcerativa
Causas Infecciosas
<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Chlamydia spp.</i>
<i>Clostridium difficile</i>
Cytomegalovirus
<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7, otras EHEC
Herpes simplex virus
<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Salmonella spp.</i>
Schistosomiasis
<i>Shigella spp.</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>
Causas no infecciosas
Colitis aguda autolimitada
Enfermedad de Behçet
Enfermedad de Crohn
Colitis por desvío
Diverticulitis
Fármacos y toxinas
Quimioterapia
Oro
Penicilamina
Colitis Eosinofílica



Enfermedad injerto contra huésped
Colitis Isquémica
Colitis Microscópica
Colitis colagenosa
Colitis Linfocítica
Colitis Neutropénica (Tiflitis)
Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos
Colitis por radiación
Síndrome de la úlcera rectal solitaria

EHEC, *E. coli* enterohemorrágica

(Feldman et al, 2016)

### k. Evaluación del Grado de Actividad Clínica y Endoscópica de la CUCI

A lo largo de la historia se han descrito una serie de métodos para evaluar el colon distal en pacientes con sospecha de CUCI, siendo el primero con la utilización de un sigmoidoscopio y descrito por Bargen en 1935. Desde entonces se han desarrollado una serie de índices endoscópicos y clínicos compuestos para evaluar la actividad de la enfermedad en ensayos clínicos de terapia médica para CUCI (19).

La escala para evaluación de actividad clínica de la CUCI más comúnmente usada es la denominada de Truelove-Witts (20).

Tabla 4: Escala de Truelove-Witts

Leve	Moderada	Severa
<4 evacuaciones/día, sin o con pequeñas cantidades de sangre	Intermedio entre leve y severa	>6 evacuaciones/día, con sangre
Sin fiebre		Fiebre > 37.5°C
Sin taquicardia		Frecuencia cardiaca >90 lpm
Anemia leve		Anemia con un nivel de hemoglobina <75% del normal
VSG >30 mm/hr		VSG >30 mm/hr

(Truelove SC, 1955)

Evaluación clínica mediante el índice de Sutherland o UCDAI (21)

Tabla 5: Índice de Sutherland o UCDAI

Puntaje	Criterios
Frecuencia de las evacuaciones	
0	Normal
1	1-2 evacuaciones/día > normal
2	3-4 evacuaciones/día > normal
3	4 evacuaciones/día > normal
Sangrado rectal	
0	Ninguno
1	Estrías de sangre
2	Sangre obvia
3	Predominantemente sangre
Apariencia de la mucosa	
0	Normal
1	Friabilidad leve
2	Friabilidad moderada
3	Exudación, sangrado espontáneo
Valoración Médica Global	
0	Normal
1	Leve
2	Moderada
3	Grave

(Sutherland et al, 1987)

Ha sido desarrollado un índice para la evaluación del grado de actividad endoscópica mediante escala de Mayo Modificada que toma en cuenta tanto la gravedad como la distribución de la inflamación de la mucosa (22).

Tabla 6: Criterios para la evaluación de Mayo Modificada

Puntaje	Criterios
0	Mucosa normal
1	Pérdida de patrón vascular.
2	Mucosa granular, no friable.
3	Friabilidad a la fricción
4	Sangrado espontáneo, ulceración

(Lobatón et al, 2015)

### I. Evaluación Histológica

Han sido desarrollados una serie de índices histológicos usados en ensayos clínicos para CUCI siendo el primero el índice de Truelove y Richards (Truelove 1956). Seguido por la escala de Matts la cual fue descrita en 1961 y aplicada a 126 biopsias seriadas mostrando que existía una clara relación entre la actividad endoscópica e histológica (Matts 1961). La escala de Riley inicial fue descrita en 1988 como un instrumento evaluativo para determinar curación mucosa en un ensayo clínico aleatorizado y tomaba en cuenta los criterios mostrados en la siguiente tabla. En 2005 se publicó una versión modificada del mismo que removía características de cronicidad que se pensaba que eran resistentes a la responsividad (23).

Tabla 7: Criterios para la evaluación histológica mediante la escala de Riley

Puntaje	Criterios
0	Normal
1	Sin inflamación significativa: Posiblemente cambios en la arquitectura de la enfermedad crónica y pequeños focos de linfocitos, pero sin inflamación aguda, abscesos crípticos, o destrucción epitelial.
2	Inflamación leve a moderada: Edema, vascularidad, células inflamatorias agudas y crónicas incrementadas, pero epitelio intacto.
3	Inflamación grave: Infiltrados graves de células inflamatorias agudas y crónicas, abscesos crípticos,

	ulceración del epitelio de superficie, exudado purulento
--	--

### m. Evaluación de la Extensión

La clasificación de Montreal de la extensión de la CUCI es una herramienta clínica que permite definir a la misma en 3 subgrupos. Se piensa que dicha subclasificación tiene relevancia biológica clara en términos de respuesta de los pacientes a la terapia médica y también ha sido validada por la historia natural de la enfermedad con respecto a las tasas de uso de medicamentos, hospitalización o colectomía (24).

Tabla 8: Clasificación de Montreal de la CUCI

Clasificación de Montreal de la CUCI		
Extensión		Anatomía
E1	Proctitis Ulcerativa	Involucro limitado al recto (La extensión proximal de la inflamación es distal a la unión rectosigmoidea)
E2	CUCI Izquierda (CUCI Distal)	Involucro limitado a una proporción del colorrecto distal a la flexura esplénica
E3	CUCI Extensa (Pancolitis)	Involucro extendido proximal a la flexura esplénica

## n. Tratamiento

Las metas del tratamiento son inducir remisión y en enfermedad activa prevenir recaídas. El método preferido de tratamiento para enfermedad activa está determinado por la extensión endoscópica y la gravedad clínica de la enfermedad. El mismo agente usado para inducir remisión generalmente es el mismo utilizado para mantenimiento, pero a una dosis menor (25, 26).

Tabla 9: Esquemas de tratamiento de la CUCI

Medicamento (Forma farmacéutica)	Dosis para enfermedad activa	Dosis de mantenimiento	Efectos Adversos
Sulfazalazina (Azulfidina; Oral)	4 a 6 g por día dividido en 4 dosis	2 a 4 g por día	Dolor de cabeza, Nefritis Intersticial, Náusea, Vómito
Ácido 5-Aminosalicílico (Oral)	2 a 4.8 g por día en 3 dosis divididas	1.2 a 2.4 g por día	Nefritis Intersticial
Ácido 5-Aminosalicílico (Supositorio)	1,000 mg una vez al día	500 mg una o dos veces al día	Irritación anal, descomfort
Ácido 5-Aminosalicílico (Enema)	1 a 4 g por día	2 a 4 g diario a cada tercer día	Dificultad en retención, irritación rectal
Hidrocortisona (Enema)	100 mg	No recomendado	Dificultad en retención, irritación rectal
Hidrocortisona (10% Foam)	90 mg una o dos veces por día	No recomendado	Irritación rectal
Prednisona (Oral)	40 a 60 mg por día hasta mejoría clínica, luego ajustar por 5 a 10 mg por semana	No recomendado	Supresión adrenal, enfermedad ósea, cataratas, características Cushingoides,
Metilprednisolona (Solu-Medrol; IV)	40 a 60 mg por día	No recomendado	glaucoma, curación alterada de heridas, infecciones, anormalidades metabólicas, úlceras

			pépticas, alteraciones psiquiátricas
Infliximab (Remicade; IV)	5 a 10 mg por Kg en semanas 0,2 y 6	5 a 10 mg por Kg cada 4 a 8 semanas	Riesgo incrementado de infección y linfoma, reacción de infusión
Azatioprina (Imuran; Oral)	No recomendado	1.5 a 2.5 mg por Kg por día	Reacción alérgica, supresión de médula ósea, infección, pancreatitis
Ciclosporina (Sandimmune; IV)	2 a 4 mg por Kg por día	No recomendado	Infección, nefrotoxicidad, convulsiones
Lactobacillus GG (Oral)	No recomendado	18 x 10 <sup>9</sup> bacterias viables al día	Mínima
Escherichia coli Nissle 1917 (Mutaflor; Oral)	No recomendado	2.5 a 25 x 10 <sup>9</sup> bacterias viables por día	Mínima

(Stephen M, et al. 2013)

## o. Complicaciones

### Megacolon Tóxico

El megacolon tóxico como complicación de la colitis ulcerativa representa un extremo en el extremo de la colitis grave y complica la presentación en 5% de los pacientes admitidos con colitis aguda grave. Dicha entidad se define como la dilatación total o segmentaria no-obstruiva (>5.5 cm) del colon asociado con toxicidad sistémica (25).

### Fibrosis

La fibrosis en la CUCI está caracterizada por un engrosamiento marcado de la *muscularis mucosae* y la deposición excesiva de matriz extracelular en la submucosa, lleva a estenosis. La CUCI actualmente es vista como una enfermedad potencialmente progresiva donde la fibrosis puede llevar a endurecimiento de la pared, resultando en anomalías de la motilidad, disfunción anorrectal, urgencia rectal e incontinencia (26).

## Displasia y Cáncer colorrectal

El riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (CRC) en pacientes con CUCI es alto en pacientes con enfermedad de larga evolución. El CRC asociado a CUCI se considera que se desarrolla de un epitelio inflamatorio a displasia y a cáncer. Por lo tanto, la vigilancia colonoscópica en pacientes con CUCI a largo plazo se ha recomendado. El conocimiento de los factores de riesgo para CRC es importante para categorizar subgrupos de pacientes con CUCI que necesitaron vigilancia frecuente o tratamiento intensivo. Los factores de riesgo para CRC en pacientes con CUCI incluyen extensión anatómica, edad joven al diagnóstico, duración de la enfermedad, CEP e historia familiar de CRC. Además, el tabaquismo, pseudopólipos, inflamación persistente del colon e ileítis por reflujo también son factores de riesgo para CRC (27).

## Pouchitis

La pouchitis es la complicación más común en pacientes a los que se les realiza anastomosis de reservorio ileo-anal la cual ocurre más frecuentemente en pacientes con CUCI. La pouchitis, es decir la inflamación del reservorio, puede ser debida a causas idiopáticas o secundarias. La pouchitis crónica dependiente de antibióticos y la pouchitis crónica resistente a antibióticos son las formas más difíciles de tratar de pouchitis crónica idiopática (28).

## **5. ANTECEDENTES:**

### **a. Familia de Canales Receptores de Potencial Transitorio (TRP)**

Los miembros de la superfamilia de canales receptores de potencial transitorio (TRP) comparten las características comunes de 6 segmentos transmembrana, grados variantes de homología de secuencia y permeabilidad a cationes. Sin importar estas similitudes, los TRP son altamente inusuales entre las familias conocidas de canales de iones en el hecho de que muestran una gran diversidad de selectividad a cationes y mecanismos de activación específicos. Lo más notable es que un solo canal puede ser activado a través de mecanismos aparentemente no relacionados. En algunos casos, los TRP pueden considerarse como integradores de señales múltiple, como la respuesta a una entrada es modificada por la otra. Sin embargo, algo común en la superfamilia es que los canales TRP juegan papeles críticos

en las respuestas a todas las clases mayores de estímulos, incluyendo luz, sonido, químicos, temperatura y tacto. Los canales TRP además imbuen células individuales con la habilidad de sentir cambios en el ambiente local, tales como alteraciones en la osmolaridad. Los canales TRP constituyen una superfamilia de canales de iones y están relacionados distalmente con las superfamilias de canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ . Se expresan y tienen funcionalidad en diversos organismos, incluyendo levaduras, gusanos, moscas de fruta, ratones y humanos. Excluyendo los TRP de levaduras, hay 7 subfamilias: TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPN, TRPP y TRPML, con ausencia de TRPN en ratones y humanos. Cada subfamilia tiene uno o más miembros. Los ratones tienen 28 miembros diferentes y los humanos 27. Todas las subunidades de los canales TRP tienen seis segmentos transmembrana y un bucle formador de poros entre los últimos dos segmentos transmembrana. El N amino y C Carboxilo terminal están localizados intracelularmente y varían ampliamente en longitud y secuencia de aminoácidos. Estas regiones citoplasmáticas contienen varios dominios bien organizados y motivos que frecuentemente están involucrados en el ensamblaje del canal, la activación y regulación a través de interacciones proteína-proteína y proteína-ligando. Todos los canales TRP son selectivos para cationes, siendo algunos altamente selectivos para  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ . De acuerdo con la diversidad de secuencias de aminoácidos, los canales TRP exhiben variados mecanismos de activación y modulación, tales como la estimulación de los receptores acoplados a proteína G, ligandos extracelulares e intracelulares (incluyendo  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ), fosfoinositol 4,5 bífosfato (PIP<sub>2</sub>), temperatura y distensión mecánica. Para entender completamente la diversidad, función y regulación de los canales TRP es necesario obtener información estructural sobre diferentes tipos de canales TRP (29).

Dentro de las neuronas aferentes primarias, la traducción de señales detectadas por canales TRP en respuestas efectoras se logra a través de dos mecanismos distintos: A través de la liberación local de neuropéptidos de las fibras periféricas de las neuronas aferentes que expresan TRP, lo cual provoca cambios en la función de los tejidos locales y por la transmisión al sistema nervioso central resultando en respuestas de reflejos autonómicos y sensación (30, 31).



Varios canales TRP expresados en diversos tipos celulares se sabe que utilizan residuos Cys para sensar alteraciones en el estado de óxido reducción (32).

Tabla 10: Descripción general de la subfamilia TRPV (TRPV1-6)

Receptor	Ligando	Fuente celular	Función biológica	Función del receptor en la colitis.	Referencia en números (gene ID)
TRPV1	Capsaicina	Origen linfoide, células de la cripta	Detección de agentes irritantes	Proinflamatoria	193034
TRPV2	Capsaicina	Células de origen linfoide	Detección de agentes irritantes	Proinflamatoria	22368
TRPV3	Timol, carvacrol, eugenol	Origen linfoide, células de la cripta		Antiinflamatoria	162514
TRPV4	4-Forbolesterdidecanoato	Origen linfoide, células de la cripta	Detección de agentes irritantes	Antiinflamatoria	59341
TRPV5	Desconocido	Origen linfoide, células de la cripta	Detección de niveles de Calcio sanguíneos	Antiinflamatoria	56302
TRPV6	Desconocido	Origen linfoide, células de la cripta	Reabsorción de Calcio en conjunto de detección de TRPV5	Inductora de Remisión	64177

Venkatchalam y cols. (2007)

### **b. Subfamilia de Canales Receptores de Potencial Transitorio Activados por Vaniloides (TRPV)**

## TRPV1

El canal receptor de potencial transitorio (TRPV1) también llamado receptor de Vaniloide 1 (VR1) es expresado por neuronas sensitivas. Una vez activado, estas neuronas evocan la sensación de dolor quemante y liberan neuropéptidos que inducen inflamación neurogénica. La inmunoreactividad a TRPV1 está altamente incrementada en fibras nerviosas colónicas de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal activa. Alrededor del 75% de raíces de ganglios dorsales aferentes espinales etiquetados en yeyuno fueron neuronas de tamaño mediano a grande. La inmunotinción con diferentes marcadores reveló que la mayoría (82%) de ellos fueron además inmunoreactivos para TRPV1, mientras sólo unas pocas expresaron IB4. En las neuronas inmunorreactivas a sintasa de óxido nítrico (NOS), 64% además mostraron inmunorreactividad a TRPV1, CGRP y sustancia P. Utilizando la misma aproximación, estos investigadores después estudiaron la inervación vagal aferente en yeyuno de ratón y encontraron que 99% de las neuronas vagales aferentes yeyunales fueron de tamaño pequeño a mediano. 85% de estas neuronas fueron positivas a IB4, 32% mostraron inmunorreactividad para TRPV1, pero ninguna de ellas expresó CGRP o NOS. Esta característica es diferente a la de las neuronas aferentes espinales y puede indicar diferentes papeles en la transducción sensorial yeyunal. La transcripción de TRPV1, sustancia P y somatostatina estuvieron todas significativamente incrementadas en la mucosa colónica del síndrome de intestino irritable, pero sólo TRPV1 se correlacionó con la intensidad del dolor. Un papel potencial de TRPV1 en la generación de dolor fue señalada más adelante por la observación de que cuando los pacientes con CUCI con dolor abdominal fueron analizados de forma separada, la transcripción de TRPV1 mostró una correlación significativa con el puntaje compuesto para el dolor (33).

TRPV1 está sensibilizado en pacientes con Síndrome de Intestino Irritable (SII) de acuerdo con evidencia de especímenes de biopsia y supernadantes. Este efecto está mediado por la activación de HRH1 por histamina y su metabolito acetaldehído de imidazol y puede llevar a una percepción incrementada de dolor visceral en al menos un subgrupo de pacientes. Además, se demostró que el antagonismo periférico de HRH1 puede servir como un nuevo tratamiento del SII, resultando en mejoría de los síntomas, así como de la calidad de vida (34).

La expresión de TRPV1 está incrementada en el colon de pacientes con EII, y ésta sobreexpresión se piensa que contribuye con el dolor presente y la hipersensibilidad visceral en estos pacientes. Por lo tanto, se están haciendo enormes esfuerzos para identificar nuevos antagonistas de TRPV1 con un perfil de potencial terapéutico. Sin embargo, evidencia reciente sugiere un posible efecto protector para TRPV1 en estados inflamatorios y particularmente en el tracto gastrointestinal. Se han hecho muchas aproximaciones para elucidar si TRPV1 produce efectos benéficos contra la colitis. La ablación genética de TRPV1 o la desensibilización de neuronas aferentes sensibles a la capsaicina en ratones resulta en desarrollo mucho más pronunciado de colitis. Además, la activación del receptor TRPV1 por la capsaicina reduce el daño colónico inducido por el ácido 2,4-dinitrobenzensulfónico. En contraste, otros reportes han mostrado que la activación de TRPV1 puede exacerbar la inflamación del colon en diferentes modelos animales. Se cree que la neuroinflamación inducida por TRPV1 juega un papel en la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. Debido a que se sabe que la enfermedad inflamatoria intestinal eleva el riesgo de cáncer de colon, examinamos papeles postulados para la neuroinflamación inducida por TRPV1 en la promoción del desarrollo de cáncer de colon (35).

Utilizando un modelo bien establecido de cáncer asociado a colitis (CAC), se encontró que los ratones genéticamente deficientes en TRPV1 mostraron una incidencia más alta al igual que un mayor número de tumores en el colon distal. De forma similar, la deficiencia genética de TRPV1 en el modelo APCMin/+ de cáncer de colon espontáneo acentuó el número de adenomas colónicos formados. Los análisis mecanísticos en el modelo CAC revelaron un nivel aumentado de infiltración de células inflamatorias en el tumor a lo largo junto con un nivel elevado de expresión de IL-6 e IL-11 y activación de vías de señalización de STAT3 y NF- $\kappa$ B (36).

Al utilizar un modelo funcional de tránsito gastrointestinal acelerado, exhibiendo algunos aspectos de Síndrome de Intestino Irritable post-inflamatorio, se mostró que la anandamida endógena y los canales de TRPV1 estaban alterados, después de un periodo inflamatorio inicial, por lo tanto, sugiriendo su involucramiento en la fisiopatología subyacente de las alteraciones funcionales post-inflamatorias (37).

Se ha descrito que la norepinefrina elevada en plasma sanguíneo activa receptores  $\beta_2$  adrenérgicos para facilitar la expresión de CBS y TRPV1 en los ganglios de la raíz dorsal colónicos, produciendo por lo tanto hipersensibilidad visceral. El bloqueo de los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos atenuó la hipersensibilidad visceral a la distensión colorrectal después del NCI. Por lo anterior además se piensa que la vía adrenérgica podría ser un blanco potencial para nuevos agentes para el tratamiento del dolor visceral en pacientes con SII (38).

Existe evidencia que apoya y refuerza el papel del control neuronal en la inflamación al demostrar que antagonistas de un receptor neuronal, TRPV1, implicados en la percepción sensorial fueron capaces de modular los síntomas y daño tisular asociado con un modelo de colitis experimental. Datos preliminares reportaron que los animales knockout para el gen TRPV1 en un régimen de DSS mostraron puntajes de actividad de la enfermedad significativamente menores que los controles tipo salvaje tan temprano como al segundo día de tratamiento con DSS y que esta mejoría se mantuvo durante el curso del tratamiento hasta el día 7. Estos hallazgos apoyan los resultados reportados aquí, los cuales indican el potencial de los antagonistas TRPV1 orales, sistémicamente activos en el tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y posiblemente en la enfermedad intestinal funcional. (39)

El principal papel de TRPV1 en fisiología ha sugerido una contribución del canal en diversas enfermedades humanas. En particular, evidencia acumulativa sostiene que el inicio de la sensibilización del nociceptor por agentes inflamatorios se lleva a cabo primariamente por TRPV1. Este receptor es la diana final de las vías de señalización intracelular desencadenadas por mediadores inflamatorios que llevan a la potencialización de su actividad de canal, la cual, a su vez, promueve la hiperexcitabilidad de los nociceptores. El mejoramiento de la función de TRPV1 por agentes proalgésicos puede ser llevada a cabo tanto por activación directa del canal o su modificación postraduccional mediada por cascadas metabólicas intracelulares. La activación directa de las respuestas de TRPV1 ha sido reportada para mediadores lipídicos tales como metabolitos del ácido araquidónico incluyendo la anandamida, N-araquidonil-dopamina (NADA), N-oleildopamina y ácido 12 – (hydroxy)icosatetraenoico. Estos compuestos actúan como agonistas débiles, pero incrementan notablemente la entrada de  $Ca^{2+}$  mediada por TRPV1 en ambos sistemas de expresión heterólogos y en las neuronas sensoriales primarias. Además, la acidosis que se

desarrolla en tejidos inflamados es un activador directo de la actividad de los canales TRPV1. La potencia y eficacia de cada mediador individual es ~~bastante~~ baja, pero en condiciones inflamatorias, muchos de estos moduladores se liberan simultáneamente y actúan de forma sinérgica. Cabe destacar, que la mayoría de estos ligandos de TRPV1 actúan al disminuir el umbral de calor de la activación de canales de 42°C a la temperatura corporal (35°C). Por lo tanto, las respuestas de apertura directa de las respuestas de TRPV1 por agentes inflamatorios actuando como agonistas de canales incrementan notablemente la excitabilidad de los nociceptores resultando en una condición de hiperalgesia. En adición, la elevación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> mediada por trpv1, a su vez, desencadena la liberación de agentes pro-inflamatorios a las terminales periféricas, por lo tanto posteriormente incrementando la excitabilidad de los nociceptores. Este circuito de retroalimentación contribuye notablemente a mejorar la hipersensibilidad del tejido inflamado (40, 41, 42).

Existen datos que demuestran que el antagonista de TRPV1, capsazepina, cuando es administrado sistémicamente, puede reducir la severidad de la colitis inducida por DSS macroscópica y microscópica. La administración oral del antagonista JNJ10175734 de TRPV1 experimental llevó a una mejoría similar en la enfermedad macroscópica como la capsazepina. La administración oral de este compuesto también resultó en una mejoría relacionada con la dosis en la escala de enfermedad macroscópica, así como en el daño epitelial en las dosis de rango 0.5-5.0 mgkg<sup>-1</sup>, pero no fue efectiva a los 10 mgkg<sup>-1</sup>. Estos datos muestran por primera vez que los antagonistas de TRPV1 administrados sistémica y oralmente pueden disminuir los síntomas de colitis experimental y se discutirán a la luz de la evidencia reciente de que TRPV1 está involucrado en la colitis experimental. La administración subcutánea de capsazepina y la dosis oral del antagonista del receptor de vaniloide 1 JNJ10185734 corrigió el puntaje macroscópico total que es una medida de gravedad de la enfermedad. Parámetros específicos de que que estos agentes revirtieron significativamente (39).

TRPV1 ha sido el canal en el cual se encontró la primera evidencia de sensación redox en canales TRP en neuronas sensoriales por un estudio de Szallasi y Blumberg, en el cual la unión cooperativa de resiniferatoxina, un agonista ultra potente de TRPV1, al cuerno dorsal y ganglio de la raíz dorsal cambió la presencia de reductores y oxidantes [ácido dithiothreitol

y 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoico), respectivamente] (43, 44). Estudios subsecuentes encontraron que tanto la oxidación como la reducción mejoran la sensibilidad de los canales TRPV1 de ratas al calor en un sistema de expresión heterólogo de HEK293 (45; 46). TRPV1 también fue sensible a nitrosilación (47).

Se han descrito además formas de activación similares a metabotrópicas como GPCR vía Gq (48).

Se ha descrito que el canal TRPV1 se expresa y es funcional en la membrana plasmática de las células CD4<sup>+</sup> T y que contribuye al influjo de Ca<sup>2+</sup> inducido por el receptor de células T (TCR) y por lo tanto, a la activación subsecuente de estas células. Además, se ha sugerido que TRPV1 actúa como un canal de Ca<sup>2+</sup> no operado por almacenamiento en células T-CD4<sup>+</sup>. Se encontró que TRPV1 estaba asociado con el correceptor CD4 y la tirosina cinasa de la familia Src Lck en inactividad y estimuladas por el TCR de células T-CD4. Otros mecanismos río debajo de la estimulación de TCR pueden contribuir además a la activación de TRPV1, tales como la hidrólisis de PIP2 por PLC-gamma1, la cual libera TRPV1 de la inhibición tónica ejercida por PIP2 (49).

Tanto los residuos Cys extracelulares como intracelulares tienden a estar sujetos a modificaciones oxidativas para que ocurra la activación de canales (50; 47; 51). Localizado en el dominio formador de poros entre las regiones transmembrana quinta y sexta, la mutación de Cys616 y Cys626 en TRPV1 murino causó una supresión significativa de la activación de TRPV1 por bisulfito reactivo, NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (47). Aunque, este resultado fue cuestionado por otros debido a la supresión de la actividad de la capsaicina por estas mutaciones, implicando disrupción inespecífica estructural de la proteína (52). En TRPV1 de pollo, los investigadores mutaron todos los residuos Cys proteicos y posteriormente reinsertaron los residuos Cys individuales responsables de la activación inducida por oxidación. Identificaron múltiples mutaciones de reversión N y C-terminales capaces de recuperar la sensibilidad de TRPV1 a la oxidación (51). Además, la activación de TRPV1 en pollos fue propuesto una consecuencia de la dimerización a través de la formación de un puente de bisulfito (53).

Es importante notar que todos los modelos anteriores de oxidación inducida por activación de TRPV1 están altamente basados en mutagénesis dirigida al sitio Cys, el cual es propenso a disrupción inespecífica de la estructura proteica. Esto es tan crítico como la sensibilidad de los canales TRPV1 a los agentes reductores ha sido atribuida a la presencia de un puente bisulfito (54).

Al emplear una serie de métodos bioquímicos y electrofisiológicos, hemos identificado recientemente la formación de dímeros de subunidades que contienen un puente de bisulfito inter-subunidad entre Cys258 y Cys742, el cual participa en la formación de un complejo tetramérico funcional. Las estructuras EM de alta resolución de TRPV1 murino mostraron que Cys257 (Corresponde a Cys258 en TRPV1 humano) está localizado en el cuarto brazo de ARD, la cual es conocida como una región reguladora importante para la función del canal. Un mutante humano de TRPV1 C258S exhibió tanto expresión proteica reducida como una sensibilidad disminuida a la capsaicina y agentes oxidantes. Interesantemente, la cuantificación del estado de oxidación de Cys258 bajo un ambiente redox diferencial reveló que el TRPV1 además tiene un Cys258 con tiol libre, el cual es altamente sensible a la oxidación. En cuestiones del estatus redox y función, esto sugiere que el canal humano TRPV1 tiene una composición heterogénea de subunidades y que un solo residuo de cisteína puede divergir en diferentes proteínas funcionales dependiendo de las modificaciones redox. Notablemente, la formación de este puente de bisulfito intersubunidad no fue observada en TRPV1 murino, sugiriendo diferencias de especie en la sensibilidad redox (55; 56; 57).

La sensibilidad de TRPV a NO y ONOO- se ha visto implicada en la mediación de la hipertrofia muscular (58).

## TRPV2

El canal receptor de potencial transitorio activado por vaniloides 2, TRPV2, es un canal de cationes permeable a calcio. TRPV2 comparte 50% de su secuencia con TRPV1 (59).

Al igual que TRPV1, TRPV2 contiene dos constricciones, una en la puerta superior formadora del poro y otra en la inferior. El tamaño total de TRPV2 libre de agonista tiene puertas superior e inferior más anchas comparado con el estado cerrado y activado por agonista (60).

Este canal se activa por calor ( $>52^{\circ}\text{C}$ ), varios ligandos y estrés mecánico. En la mayoría de las células, una gran porción de TRPV2 está localizada en el retículo endoplásmico bajo condiciones de no estimulación. Hasta la estimulación de las células con ligandos activadores de fosfatidilinositol 3 cinasa, TRPV2 se transloca a la membrana plasmática y funciona como un canal de cationes. El estrés mecánico puede además inducir translocación de TRPV2 a la membrana plasmática. La expresión de TRPV2 es alta en algunos tipos celulares incluyendo neuronas, células neuroendocrinas, células involucradas en la inmunidad innata y ciertos tipos de células cancerosas. TRPV2 podría modular varias funciones en estas células (61).

### TRPV3

TRPV3 es fuertemente activado y ha mostrado una enorme sensibilidad a carvacrol, timol y eugenol. La lengua y las células epiteliales de la piel responden al carvacrol y eugenol con un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Además, mostramos que la actividad de TRPV3 está fuertemente potenciada por la estimulación de receptores acoplados a proteína G por fosfolipasa C. Además, el carvacrol activa y desensibiliza rápidamente TRPA1, lo cual podría explicar la acritud del orégano. Se ha postulado incluso que TRPV3 podría ser un blanco molecular de sensibilizadores cutáneos derivados de plantas (62).

Un estudio demostró que la administración sistémica del agonista de TRPV3 carvacrol induce hipotermia en ratones conscientes, por lo menos en parte al disminuir la generación de calor corporal total. Sin embargo, los sustancialmente menos pronunciados efectos en ratas, así como efectos adversos significativos sobre la presión arterial y la supervivencia a mayores dosis intravenosas van contra las acciones seguras y específicas del carvacrol sobre el sistema de termorregulación. Por lo tanto, la activación de TRPV3 por carvacrol parece no tener potencial como una novedosa estrategia farmacológica actual individual para la inducción de hipotermia directa en pacientes humanos conscientes. Aunque, debido al efecto demostrado del carvacrol sobre la temperatura central y la presión arterial, investigación futura sobre el papel de los canales TRPV3 en el control de estas variables puede ser útil para un mejor entendimiento de la termorregulación en mamíferos y otras respuestas autonómicas homeostáticas (63)



Wu SW confirmó que existe un nivel bajo de expresión de TRPV3 en neuronas vagales aferentes y observó activación directa con agonistas TRPV3 como eugenol, etil-vanilina (EVA) y farnesil pirofosfato (FPP). Las neuronas estimuladas por agonistas activadores además contenían TRPV1 y fue bloqueado con rojo de rutenio. La sensibilidad a FPP se traslapó con el EVA y eugenol pero representó el porcentaje más pequeño de neuronas vagales aferentes y fue el único agonista que no estimuló neuronas de ratones TRPV3  $-/-$ , sugiriendo que FPP tiene la sensibilidad más alta. Posteriormente, se determinó que el FPP era predictor de respuestas mejoradas a la capsaicina, EVA y eugenol en ratas. Se concluyó que TRPV3 se expresa en una subpoblación discreta de neuronas vagales aferentes y que podría contribuir a la señalización vagal aferente ya sea directamente o en combinación con TRPV1 (64).

Existe evidencia contradictoria que apoya un papel significativo para el canal TRPV3 en la nocicepción térmica. TRPV3, que comparte 40% de homología con TRPV1, tiene un umbral térmico de 33°C y exhibe respuestas en incremento mientras la temperatura se eleva en el rango nocivo (65).

En ratones, TRPV3 se expresa primariamente en queratinocitos, así como en otros epitelios como la lengua, el paladar, nariz y colon distal. Aunque, TRPV3 no se expresa en neuronas sensoriales de ratones, a pesar del análisis de mRNA y proteínas en ratones y humanos ha reportado la existencia de expresión de TRPV3 en neuronas sensoriales de estas especies (66, 67).

Estudios que han utilizado ratones TRPV3  $-/-$  han reportado resultados contradictorios. Algunos estudios reportaron déficits nocifensivos en respuesta al calor nocivo, sugiriendo una función de sobreposición entre TRPV1 y TRPV3, mientras otros no han reportado déficits en la sensación de calor nocivo (68, 69, 70, 71).

Diferencias en el trasfondo de tinción o la metodología podrían ser debido a los hallazgos contradictorios. El grupo que reportó diferencias entre la sensación de calor encontró que la activación de TRPV3 llevó a la producción de óxido nítrico (NO) en queratinocitos y el bloqueo de la síntesis de NO inhibió la nocicepción térmica aguda a través de un mecanismo

dependiente de TRPV3. La evidencia además proveyó que se sugiriera que el NO actúa río arriba de TRPV1 para evocar un comportamiento térmico nocifensivo (70).

Mientras que los estudios de knockout no apoyan un papel para TRPV3 en la hiperalgesia inflamatoria térmica, otros estudios describieron un enlace. Cuando TRPV3 se sobre expresaba en queratinocitos, estas células liberaron el mediador inflamatorio, prostaglandina E(2) (PGE(2)) en una forma dependiente de TRPV3. La inhibición de la producción de PGE(2), con co-inhibición de TRPV1 para enmascarar sus contribuciones a la hiperalgesia térmica, la hiperalgesia inflamatoria térmica disminuida en ratones con sobreexpresión de TRPV3 en queratinocitos (72).

La activación de TRPV3 en queratinocitos además se asoció con la producción y liberación del mediador inflamatorio ATP, sugiriendo otra ruta dependiente de TRPV3 para sensibilizar vías nociceptivas (73).

El antagonista endógeno 17(R)-resolvina D1 fue hallada como capaz de revertir la hiperalgesia inflamatoria térmica y este efecto fue embotado hasta la eliminación de la expresión epidérmica de TRPV3 apoyando posteriormente un papel para el TRPV3 en la nocicepción inflamatoria (74).

Aunque, TRPV3 está muy relacionado con TRPV1 y comparte aproximadamente 40% de homología en secuencia de aminoácidos con TRPV1 (75), el estudio de TRPV3 ha sido obstaculizado, en gran medida debido a la ausencia de herramientas eficientes de investigación, incluyendo agonistas TRPV3 altamente selectivos y antagonistas, así como anticuerpos específicos. Aunque se han hecho zancadas significativas en el entendimiento de la activación de TRPV3, apertura y función fisiológica, varias áreas y preguntas permanecen por ser exploradas y respondidas (76).

Se ha encontrado que en el caso de la ganancia de función de este receptor se produce un fenotipo de calvicie, las mutaciones puntuales que ocurren naturalmente en TRPV3 se han relacionado con dermatitis espontánea en ratones DS-Nh (77).

El aumento de CHS en ratones DS-Nh podría ser debido a una capacidad de migración mejorada de las Células Dendríticas al jugar un papel en la liberación constitutiva de LPTE

(Linfopoyetina tímica estromal) desde los queratinocitos. Además, se encontró que la LPTE participaba en respuestas inmunes innatas e inflamación similar a la de una enfermedad autoinmune, al igual que control temprano de las respuestas innatas antes de la activación de respuestas inmunes adaptativas previas a la activación de respuestas inmunes por células T y B convencionales que perpetúan la inflamación cutánea crónica. Por lo tanto, la LPTE podría aliviar adecuadamente las exacerbaciones agudas de la enfermedad autoinmune. De forma similar a los ratones DS-Nh, TRPV3 podría participar en parte de la agravación de la dermatitis a través de la regulación de células dendríticas en enfermedades autoinmunes humanas (78).

En un estudio realizado por Sozucan Y y cols, se encontró que la expresión de TRPV3 se encuentra disminuida en muestras de mucosa intestinal de pacientes con cáncer colorrectal en comparación con pacientes sanos (79)

#### TRPV4

TRPV4 es 40% idéntico a TRPV1 y TRPV2 (80; 81). Cuando se expresa en células de mamíferos comprende un canal de cationes moderadamente selectivo ( $PCa/PNa = 6$ ), el cual, al igual que TRPV1, dispone de una relación de retificación saliente I-V. En medios isotónicos, TRPV4 es activo, pero la corriente posteriormente es incrementada por la reducción de la osmolalidad extracelular (hinchazón celular), con 50% de activación por 270 mOsm/L (Fisiológico = 290 mOsm/L). El medio hipertónico (contracción celular) disminuyó la activación de corriente. La delección de los dominos de repetición de anquirina embotó la respuesta a soluciones de baja osmolaridad (80). La depleción de los almacenes no activó el canal. La anandamida y su metabolito, el ácido arquidónico, activan TRPV4 indirectamente a través de la formación de ácidos epoxieicosatrienoicos dependiente de epoxigenasa de citocromo P450 (82). Experimentos con ratones TRPV4  $-/-$  pueden haber arrojado resultados algo controversiales en la regulación osmolar sérica por el sistema nervioso central (83; 84). TRPV4 podría funcionar como osmo-transductor en fibras nerviosas nociceptivas aferentes primarias (85), en segmentos impermeables al agua de la nefrona (86), y en las células de músculo liso de la vía aérea humana (87). Los queratinocitos primarios aislados de piel de ratón exhiben fuertes corrientes de TRPV4 evocadas por calor

a incrementos leves en la temperatura (88). Los ratones TRPV4  $-/-$  tienen sensibilidad reducida a la presión y nocicepción ácida (89) e hiperalgesia reducida al calor (90).

#### TRPV5 y TRPV6

TRPV5 y TRPV6 comprenden una subfamilia separada de TRPVs con sólo 30% de identidad con TRPV1. Los canales expresados rectifican fuertemente hacia adentro y son los más selectivos a  $Ca^{2+}$  ( $PCa/PNa > 100$ ) (91; 92; 93) de todos los canales TRP. Estas propiedades son consistentes con los mecanismos propuestos para los canales selectivos a  $Ca^{2+}$  en los cuales los residuos de ácido glutámico o aspártico cargados negativamente proveen un lugar de unión para divalentes dentro del poro. El  $Ca^{2+}$  intra y extracelular (93; 94) y la calmodulina (95) regulan la actividad de TRPV6. La localización de TRPV5 y TRPV6 en el intestino delgado proximal y el túbulo colector del riñón, junto con los datos de KO de ratones, sugieren que esta familia es importante en la entrada de calcio a través de las células epiteliales (96). Los ratones TRPV5  $-/-$  tienen una reabsorción renal disminuida en el caso de la reabsorción renal de  $Ca^{2+}$  sin importar los niveles mejorados de vitamina D, resultado en hipercalciuria (97). Al igual que muchos otros canales TRP, TRPV6 se ha asociado a progresión de cáncer y TRPV6 se ha usado como marcador pronóstico para cáncer de próstata (98).

#### TRPV6

TRPV6 (Sinónimos ECAC2, CaT1, Cat-like) muestra varias características específicas que lo hacen único entre los miembros de la familia de genes TRP en mamíferos (y el más relacionado, TRPV5) son los únicos canales altamente selectivos de  $Ca^{2+}$  de toda la superfamilia TRP (99; 100; 101). La traducción de TRPV6 se inicia en un codón no AUG, en ACG, localizado cuesta arriba del AUG anotado, el cual no es utilizado para iniciación (102). El codón ACG nunca es decodificado por metionina. No sólo es un evento muy raro en la biología eucariótica, la proteína TRPV6 completa existente *in vivo* comprende un amino terminal extendido por 40 residuos de aminoácidos comparado con la proteína TRPV6 anotada y truncada, la cual ha sido utilizada en la mayoría de los estudios sobre la actividad del canal TRPV6 (En la numeración siguiente ocurre de acuerdo a su proteína de longitud completa, con los números de la proteína anotada truncada en corchetes. Sólo en los humanos

existe un polimorfismo acoplado de TRPV6 que provoca intercambios en tres aminoácidos y resulta en un haplotipo ancestral de TRPV6 y en así llamado haplotipo derivado de TRPV6 (100). El alelo ancestral codifica los residuos aminoácidos C197(157), M418(378) y M721(681) y los alelos derivados R197(157), V418(378) y T721(681). El haplotipo ancestral se puede hallar en todas las especies, el haplotipo TRPV6 derivado sólo ha sido identificado en humanos y su frecuencia se incrementa con la distancia del continente africano. Apartemente el gen TRPV6 ha sido un fuerte blanco para selección en humanos, y su variante derivada es uno de pocos ejemplos que muestran diferencias consistentes con los genes ortólogos de otros primates (103, 104, 105, 106). La expresión del gen TRPV6 está significativamente sobreexpresada en varios cánceres humanos incluyendo los más comunes, cáncer de próstata y mama (107, 108, 109, 110). Los ratones macho que carecen de canales TRPV6 funcionales son hipo/infértiles haciendo que TRPV6 sea uno de los pocos canales esenciales para la fertilidad (111, 112).

Un número de interacciones proteicas ocurre con TRPV6, el cual puede alterar la función de estos canales de calcio. Las interacciones incluyen, la formación de tetrámeros o heterómeros con TRPV5 (113) mediadas por una repetición específica de anquirina en la región N-terminal de la proteína (114). La calmodulina se une a TRPV6 y la fosforilación dependiente de calcio por la proteína cinasa C puede además regular la actividad del canal (113, 115, 116). Los complejos de TRPV6 con S100A10 y anexina 2; estas proteínas son expresadas además en duodeno y son afectadas por la vitamina D y proveen mecanismos adicionales o alternativos para la regulación de la función de canal de calcio (117).

## **OBJETIVOS:**

### **a. Objetivo General:**

- Caracterizar la expresión génica de la subfamilia de canales receptores de potencial transitorio activados por vaniloides (TRPV), en los pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

### **b. Objetivos Particulares:**

- Determinar la asociación de la expresión génica con el grado de actividad histológico y endoscópico de la enfermedad con algunas variables clínicas (Edad, género, extensión de la CUCI, manifestaciones extra-intestinales, curso clínico y respuesta al tratamiento)
- Correlacionar el nivel de enfermedad con la expresión génica y proteica de la subfamilia TRPV
- Correlacionar el nivel de actividad endoscópica con el nivel de expresión génica y proteica de la subfamilia TRPV
- Correlacionar las variables clínicas estudiadas con el nivel de expresión génica y proteica de la subfamilia TRPV
- Correlacionar las variables clínicas junto con el nivel de actividad histológico con el nivel de expresión génica y proteica de la subfamilia TRPV
- Correlacionar las variables clínicas junto con el nivel de actividad endoscópico con el nivel de expresión génica y proteica de la subfamilia TRPV

## **METODOLOGÍA:**

### **a. Diseño del Estudio**

Estudio transversal y comparativo que incluyó un total de 45 pacientes con CUCI (29 activos y 16 en remisión) y 26 controles sin datos clínicos y endoscópicos de inflamación intestinal o de alguna enfermedad sistémica (cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad diverticular, colitis medicamentosa, colitis postradiación, colitis infecciosa, colitis isquémica). Los controles consistieron en individuos que acudieron por pérdida de peso y anemia en estudio. Todos los sujetos con CUCI pertenecieron a la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y firmaron su consentimiento a participar en el estudio. La evaluación de la actividad de CUCI en la mucosa se basó en hallazgos endoscópicos e histológicos, según la puntuación MAYO e índice de Riley respectivamente. El diagnóstico de CUCI se confirmó por criterios histopatológicos.

### **b. Descripción de la maniobra**

Toma de biopsia

Fueron invitados a la participación en el estudio aquellas personas con diagnóstico de CUCI que acudieron al INCMNSZ para realizarse un estudio colonoscópico, si deseaban hacerlo, fueron partícipes siempre y cuando estuvieran de acuerdo con lo establecido en la carta de consentimiento informado y lo manifestaran con su firma, cualquier duda que se presentara sobre el estudio les fue respondida al momento, dejando en claro siempre que su no participación en el estudio no afectaba la atención médica en el instituto.

Posteriormente, se obtuvo también 1 biopsia de mucosa rectal por paciente durante el estudio colonoscópico para realizar la cuantificación de la expresión génica de la familia de TRP, esto siempre y cuando el médico colonoscopista autorizara que la toma de las biopsias no afectara de manera alguna la integridad del paciente, si la mucosa se encontraba muy inflamada y el médico recomendaba no tomar las muestras, estas no fueron tomadas y se le informó al paciente el motivo. Las biopsias de intestino se colocaron en tubos crioviales con 1 mL de preservador de ácidos nucleicos (RNA later®), se almacenaron a -70°C hasta el momento de la extracción del ARN.

Se obtuvo biopsia de recto durante estudio endoscópico de seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio y su posterior conservación en RNAlater

Adquisición de cortes de piezas de colectomía

Se obtuvieron cortes de piezas quirúrgicas de 10 pacientes colectomizados por CUCI con actividad grave y 10 controles que consistieron en pacientes colectomizados por cáncer de colon (zona normal).

### **c. Reacción en Tiempo Real de la Polimerasa (RT-PCR)**

1. Se realizó extracción a partir de las biopsias de recto del RNA total empleando un kit de extracción de RNA (High Pure RNA Tissue Kit de Roche) según la metodología sugerida por el fabricante. Las biopsias se mezclaron usando el homogeneizador durante 1 minuto con amortiguador de lisis, se lavaron con etanol al 100%, empleando las columnas de purificación, se centrifugó la mezcla a 13.000 x g durante 15 segundos, lavándose con amortiguador de lavado a 13.000 x g durante 15 segundos, finalmente se agregaron 100 µl de buffer de elución para diluir el ARN total.

2. Se llevó a cabo electroforesis de una alícuota de cada uno de los productos de RNA en un gel de agarosa al 1% y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio y se documentó con un transiluminador con luz ultravioleta.

3. Se realizó síntesis a partir de DNA de cadena complementaria a partir de RNA total mediante Transcripción Reversa. Se llevó a cabo la reacción con 20 µl de la siguiente forma: Preincubación: 25°C x 10 minutos, Incubación: 55°C x 30 minutos, seguida de la desnaturalización: 85°C x 5 minutos en un termociclador (Perkin-Elmer).

4. Finalmente se realizó reacción en cadena de la polimerasa empleando como sustrato el cDNA que resultó de la retrotranscripción. Para la amplificación de las regiones de interés, la reacción se llevó a cabo en 10 µl. La amplificación se realizó bajo las siguientes



condiciones: un programa de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (95°C-10 segundos, alineación 60°C 10 segundos, extensión 40°C-30 segundos) y un ciclo de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. Para determinar la expresión relativa de los genes blanco (TRPV1-6) y GAPDH (Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa, como gen de referencia) se utilizó el Termociclador Light Cycler 2.0 Roche ® empleando ensayos validados para la cuantificación (reproducibilidad y linealidad), con iniciadores sentido y antisentido de Invitrogen® y sondas TaqMan para cada gen (Universal Probe Library Set, Human de Roche ®).

Tabla 11: Lista de Oligonucleótidos empleados para la realización de PCR en Tiempo Real  
Primers utilizados para la realización de RT-PCR

Gen	Secuencia (Gene Bank)	Oligonucleótidos (Sentido)	Oligonucleótidos (Antisentido)	Sondas
TRPV1*	NM_080704.3 NM_018727.5 NM_080705.3 NM_080706.3	5' ctacagcagcagcagagacc 3'	3' cctgcaggagtcggttca 5'	#22
TRPV2	NM_016113.4	5' ggtgttgctgactgga 3'	3'cagcccctgctactgagaa 5'	#3
TRPV3	NM_145068.2	5'aatctcgggctggttgg 3'	3' ccaacacgaaggcttacttc 5'	#81
TRPV4*	NM_021625.4 NM_147204.2 NM_001177428.1 NM_001177431.1 NM_001177433.1	5' ccaggtaggcctgatcc 3'	3' gctcctccagctgctctac 5'	#66
TRPV5	NM_019841.4	5' tgggtctgtccagaatt 3'	3' ctgcctcctggagcttgt 5'	#82
TRPV6	NM_018646.2	5' gaaggagaggagactcccaga 3'	3' agagccgagatgagcagaac 5'	#84
GAPDH	NM_002046.3	5' gcccaatacaccaaatcc 3'	3'agccacatcgtcagacac 5'	#60
B-Actina		5' aaggcatttactcaactgtca 3'	3' tggattcatcagctgcatt 5'	

#### Criterios de selección

Pacientes con CUCI

#### Criterios de inclusión

Nacidos en México. Pacientes con diagnóstico confirmado de histopatología de CUCI. Rango de edad de entre 18 y 70 años de edad. Cualquier género.

#### Criterios de exclusión

Pacientes con diagnóstico de colitis aguda autolimitada, colitis microscópica, colitis medicamentosa, colitis isquémica, enterocolitis postradiación, diverticulitis, apendicitis, enterocolitis neutropénica, síndrome de la úlcera recta solitaria, cáncer y linfoma. Pacientes con patología autoinmune concomitante. Pacientes que no deseen participar en el estudio.

#### Criterios de eliminación

Falta de viabilidad de las muestras. No deseo de participar posterior de la firma del consentimiento informado.

#### Controles

#### Criterios de Inclusión

Nacidos en México. Pacientes con diagnóstico de anemia en estudio (para descartar sangrado de tubo digestivo bajo), pérdida de peso, o que lleguen a endoscopia por escrutinio. Rango de edad de entre 18 y 70 años de edad. Cualquier género.

#### Criterios de Exclusión

Pacientes con diagnóstico de colitis aguda autolimitada, colitis microscópica, colitis medicamentosa, colitis isquémica, enterocolitis postradiación, diverticulitis, apendicitis, enterocolitis neutropénica, síndrome de la úlcera recta solitaria, cáncer y linfoma. Pacientes con patología autoinmune concomitante. Pacientes que no deseen participar en el estudio.

#### Criterios de Eliminación

Falta de viabilidad de las muestras. No deseo de participar posterior de la firma del consentimiento informado.

#### **d. Inmunohistoquímica Indirecta**

1. Se llevó a cabo la colocación de cortes de tejido incrustado en parafina y de 5  $\mu\text{m}$  de grosor en laminillas cargadas positivamente. La desparafinización y rehidratación de los cortes a través de una serie de xileno y alcoholes graduados. El bloqueo de la peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% por 20 min. Empleando de suero normal al 3% como bloqueador de proteínas.

2. Las laminillas fueron incubadas con la adición de anticuerpos anti humano de conejo (TRPV2, TRPV5), anti humano de ratón (TRPV6), o anti humano de cabra (TRPV3, TRPV4) (Biotecnología Santa Cruz) diluido a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  por 18 h a 4°C. Luego, los especímenes tisulares fueron incubados (60 min, temperature ambiente) con conjugado de peroxidasa igG de cabra anti-conejo, conjugado de peroxidasa igG de burro anti-cabra (Ciencias Enzo Life, Inc., Farmingdale, NY, EUA y Biotecnología Santa Cruz) para detección de unión. Las laminillas fueron incubadas con el sustrato rojo permanente (Sigma-Aldrich Co.) para fosfatasa alcalina o diaminobencidina para peroxidase, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Contratación con hematoxilina de Mayer (modificación de Lillie) (DAKO, Glostrup, Dinamarca) e inmersión en baño con agua con amonio 37 mM/L, lavada gentilmente con agua desionizada por 2-5 min, deshidratada y montada con medio de montaje acuoso Faramount (DAKO).

3. Se hizo tinción de control negativo con suero humano diluido 1:100, en vez de anticuerpo primario. Blanco reactivo incubado con albúmina de huevo-salina (Sigma) con buffer de fosfato en lugar de anticuerpo primario. Ambos controles excluyeron tinción inespecífica o actividades enzimáticas endógenas.

4. Se realizó evaluación morfológica y morfométrica de los cortes con tinción de forma cegada con microscopio de luz. En breve conteo de células con expresión de TRPV1-6 en al menos 3 campos ópticos de cada corte en magnificación con poder de 320x. Los valores promedios por corte se utilizarán para el análisis estadístico. Expresión de resultados como

media más menos error estándar de la misma (SEM) de células cuantificadas por el programa Image Pro-Plus versión 5.1.1.

#### Criterios de selección

Pacientes con CUCI

#### Criterios de inclusión

Pacientes con CUCI Nacidos en México. Pacientes colectomizados por actividad grave de CUCI. Rango de edad de entre 18 y 70 años de edad. Cualquier género.

#### Criterios de exclusión

Pacientes con CUCI Pacientes con diagnóstico de colitis aguda autolimitada, colitis microscópica, colitis medicamentosa, colitis isquémica, enterocolitis postradiación, diverticulitis, apendicitis, enterocolitis neutropénica, síndrome de la úlcera recta solitaria, cáncer y linfoma. Pacientes con patología autoinmune concomitante.

#### Criterios de eliminación

Falta de viabilidad de las muestras.

#### Controles

#### Criterios de inclusión

Nacidos en México. Pacientes colectomizados como medida terapéutica por cáncer de colon (Utilización de zonas normales). Rango de edad de entre 18 y 70 años de edad. Cualquier género.

#### Criterios de exclusión

Pacientes con diagnóstico de colitis aguda autolimitada, colitis microscópica, colitis medicamentosa, colitis isquémica, enterocolitis postradiación, diverticulitis, apendicitis, enterocolitis neutropénica, síndrome de la úlcera recta solitaria, cáncer y linfoma. Pacientes con patología autoinmune concomitante.

Criterios de eliminación

Falta de viabilidad de las muestras.

#### **e. Variables**

Principales

Cuantificación de la expresión relativa del RNAm

Cuantificación de la expresión relativa del RNAm de TRPV1-6 mediante PCR en tiempo Real. Se realizará el aislamiento de RNA total con el estuche HighPure RNA tissue Kit (Roche) y la síntesis de cDNA mediante el estuche Transcriptor cDNA síntesis kit (Roche). La PCR en tiempo Real se realizó en un termociclador LightCycler 480 empleando ensayos con sondas TaqMan de la Universal Probe Library Human Set (Roche) previamente validados en nuestro laboratorio para la cuantificación (reproducibilidad y linealidad) y la mezcla de reacción LightCycler TaqMan Master (Roche).

Inmunohistoquímica indirecta

Se llevó a cabo en cortes de colon de 10 pacientes con CUCI activo que requirieron colectomía por actividad grave y en 10 pacientes que requirieron colectomía como tratamiento para cáncer de colon. El propósito de llevar a cabo esta parte fue complementar el análisis de la expresión génica con el de la expresión proteica para una mejor determinación del papel que desempeñan los TRPV en la CUCI.

Secundarias

Actividad Histológica

Medido por la escala de Riley (I, II o III): Análisis para determinar la actividad histológica al tiempo del diagnóstico y seguimiento de colonoscopia exploratoria de rutina.

Actividad Endoscópica

Determinado por la escala de Mayo (I, II o III): Determinado por médico colonoscopista durante la realización de toma de biopsias.

VARIABLES CLÍNICAS

Edad al Diagnóstico

Determinada como la edad en la que se hizo el diagnóstico mediante histopatología

Curso Clínico

Determinada de acuerdo con el número de recaídas (Inicialmente activo, después inactivo,

Extensión de la Enfermedad

Determinada de acuerdo con la escala de Montreal (I Colitis Distal, II Colitis Izquierda, III Pancolitis)

Tratamiento

Descrito tanto en medidas de atención médica como quirúrgica

#### **f. Frecuencia de las mediciones**

Realización de medición única ya que con una sola biopsia se puede extraer suficiente cantidad de material genético para realizar el estudio de la expresión génica de las citocinas y con una sola punción venosa para obtener 15 ml de sangre periférica.

#### **g. Estrategia de Análisis Estadístico**

Reacción en Cadena de la Polimerasa

El análisis de las unidades relativas de expresión génica se llevó a cabo empleando el software SPSS v.22.0

Fue empleada la prueba de Kolmogorov Smirnov como prueba de normalidad

Utilización de prueba ANOVA con subtests de Tukey o Dunn para llevar a cabo la comparación de las medias de los 3 grupos en los que se realizó la medición de expresión relativa de mRNA de la subfamilia TRPV1-6 con utilización de  $\beta$ -actina o GAPDH como genes constitutivos.

Análisis correlacional con variables clínicas

Utilización de SPSS v.22.0

Utilización de pruebas Chi cuadrada de Pearson, exacta de Fisher, coeficiente de correlación de Pearson, coeficiente de correlación de Spearman,

Inmunohistoquímica Indirecta

Empleo de ImagePro Plus v.11.0

Análisis morfométrico con realización de conteo de células inmunopositivas en 3 campos en las 5 laminillas de cada grupo.

Comparación de medias de grupos activo y control a través de prueba ANOVA con sub-análisis de Tukey o Dunn dependiendo de cada caso particular.



## 8. RESULTADOS:

### a. Características Clínicas y Sociodemográficas

Tabla 12: Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes incluidos para realización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (TRPV1)

Características clínicas de los pacientes con CUCI		n	%	Mediana de Expresión génica de TRPV1 (rango)	p
Género	Masculino	17	50	10.53 (7.86)	0.94
	Femenino	17	50	10.73 (7.82-13.29)	
Edad al diagnóstico	<40	25	73.52	10.90 (7.82-13.29)	0.02
	>40	8	23.52	9.82 (8.18-11.37)	
Manifestaciones Extraintestinales	Presente	33	62.3	10.33 (7.83-18.57)	0.18
	Ausente	20	37.7	10.93 (7.82-13.29)	
Extensión de la enfermedad	Colitis izquierda (E2) y colitis distal (E1)	15	45.5	10.73 (8.47-1.39)	0.91
	Colitis Extensa (E3)	18	54.5	10.65 (7.82-13.29)	
Años de evolución	<3	18	54.5	10.65 (8.47-13.29)	1.00
	>3	18	54.5	10.90 (7.82-12.39)	
Curso clínico de la enfermedad	Enfermedad sin recaídas	14	42.4	10.33 (7.82-13.29)	0.07
	Enfermedad con recaídas	19	57.6	10.90 (8.18-12.74)	

Tabla 13: Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes incluidos para realización de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (TRPV2-6)

Características clínicas		CUCI Activa (28)		CUCI Remisión (16)		Controles (25)	
		N	%	N	%	N	%
Género	Masculino	11	37.9	8	50	8	30.77
	Femenino	18	62.1	8	50	18	69.23
Edad (Mediana, rango)		40	24-72	47	16-75	54	23-74
Edad al diagnóstico (Media, DE)		31	6-56	34	9-66		
		6	1-24	7	0-17		
Años de evolución (Mediana, rango)							
Extensión de la enfermedad	E1	7	24.1	2	12.5		
	E2	2	6.8	1	6.3		
	E3	18	62.1	11	68.8		
	No clasificable	2	6.99	2	12.5		
Manifestaciones Extraintestinales	Presente	10	34.5	9	56.3		
	Ausente	17	58.6	5	31.3		
	No documentado	2	6.9	2	12.5		
Curso clínico de la enfermedad	Actividad inicial	11	37.9	2	12.5		
	Intermitente						
	Continuo	1	48.2	9	56.3		
	No documentado	2	6.9	2	12.5		
		2	6.9	3	18.8		
Tratamiento Médico	5-ASA	26	89.7	9	56.3		
	Esteroides	7	24.1	3	18		
	Tiopurinas	4	13.8	2	12.5		
	Anti-TNFa	1	3.4				

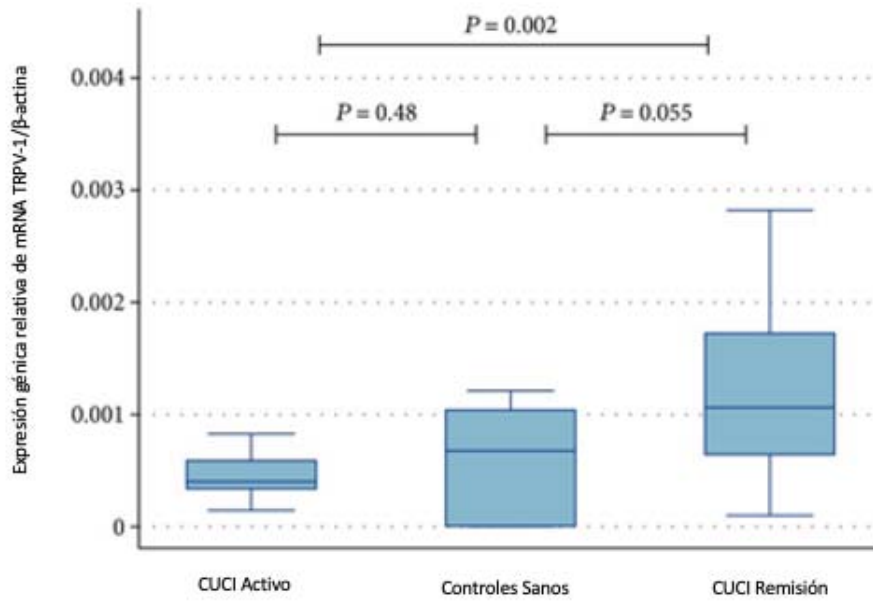
Tabla 14: Características clínicas y sociodemográficas de los pacientes incluidos para la realización de Inmunohistoquímica Indirecta

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Edad	48	74	79	67	62
Sexo	Masculino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
Edad al diagnóstico	25	64	75	66	60
Curso clínico	Continuo	Continuo	Continuo	Continuo	Continuo
Tiempo de Evolución	6	10	4	1	2
Manifestaciones Extraintestinales	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna
VSG	58	61	65	60	62
Tratamiento Médico	Sulfasalazina 3 g/día, Azatioprina 500 mg/día e Hidrocortisona 100 mg c/8 horas	Sulfasalazina 4.5 g/día, Azatioprina 500 mg/día e Hidrocortisona 100 mg c/8 horas	Sulfasalazina 4.5 g/día, Azatioprina 500 mg/día e Hidrocortisona 100 mg c/8 horas	Sulfasalazina 3 g/día, Azatioprina 500 mg/día e Hidrocortisona 100 mg c/8 horas	Sulfasalazina 4.5 g/día, Azatioprina 500 mg/día e Hidrocortisona 100 mg c/8 horas
Extensión	Pancolitis	Pancolitis	Pancolitis	Pancolitis	Pancolitis
Albúmina	3.79 g/dL	4 g/dL	3.6 g/dL	3.41 g/dL	3.3 g/dL

## b. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

Figura 1. Niveles de expresión génica de TRPV1

Los niveles de expresión génica en el caso del grupo con CUCI en remisión fueron significativamente más altos que en el grupo de pacientes con CUCI activo y controles.



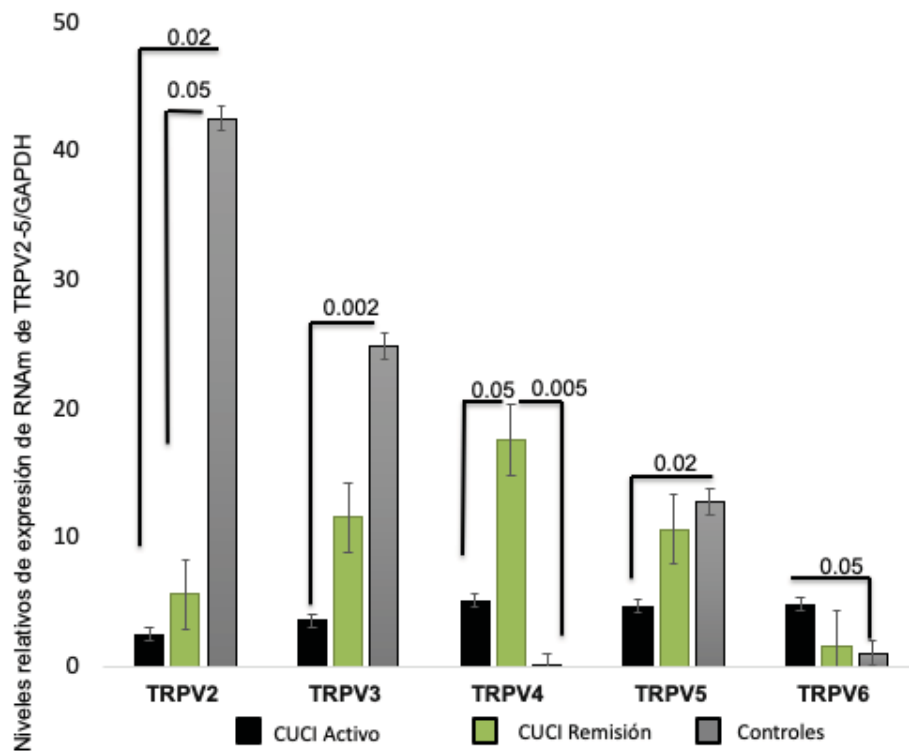


Figura 2.

### Niveles de expresión génica de TRPV2-TRPV6

La expresión génica de TRPV2 estuvo incrementada en el grupo control comparado con los pacientes con CUCI activo y en remisión ( $P = 0:002$  y  $P = 0:05$ ).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con CUCI activo comparado con los pacientes en remisión. La expresión génica de TRPV3 fue significativamente mayor en los controles que en los pacientes con CUCI activo ( $P = 0:002$ ).

La expresión génica de TRPV4 fue significativamente mayor en el tejido colónico de los pacientes con CUCI en comparación con los pacientes con CUCI activo ( $P = 0:05$ ) y controles

( $P = 0:005$ ). No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes con CUCI activo comparado con el grupo control.

El TRPV5 tuvo niveles de mRNA mayores en el grupo control comparado con los pacientes con CUCI activo ( $P = 0:02$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con CUCI en remisión comparado con los pacientes con CUCI activo y el grupo control.

La expresión génica de TRPV6 fue significativamente mayor en los pacientes con CUCI activo en comparación con los controles ( $P = 0:05$ ).

### **c. Análisis Correlacional de variables clínicas con Niveles de Expresión génica**

La regulación a la baja de TRPV1 se asoció con edad al diagnóstico menor a 40 años ( $p=0.02$ ) y curso clínico de la enfermedad caracterizado por actividad continua y con recaídas ( $p=0.07$ ).

#### d. Inmunohistoquímica Indirecta

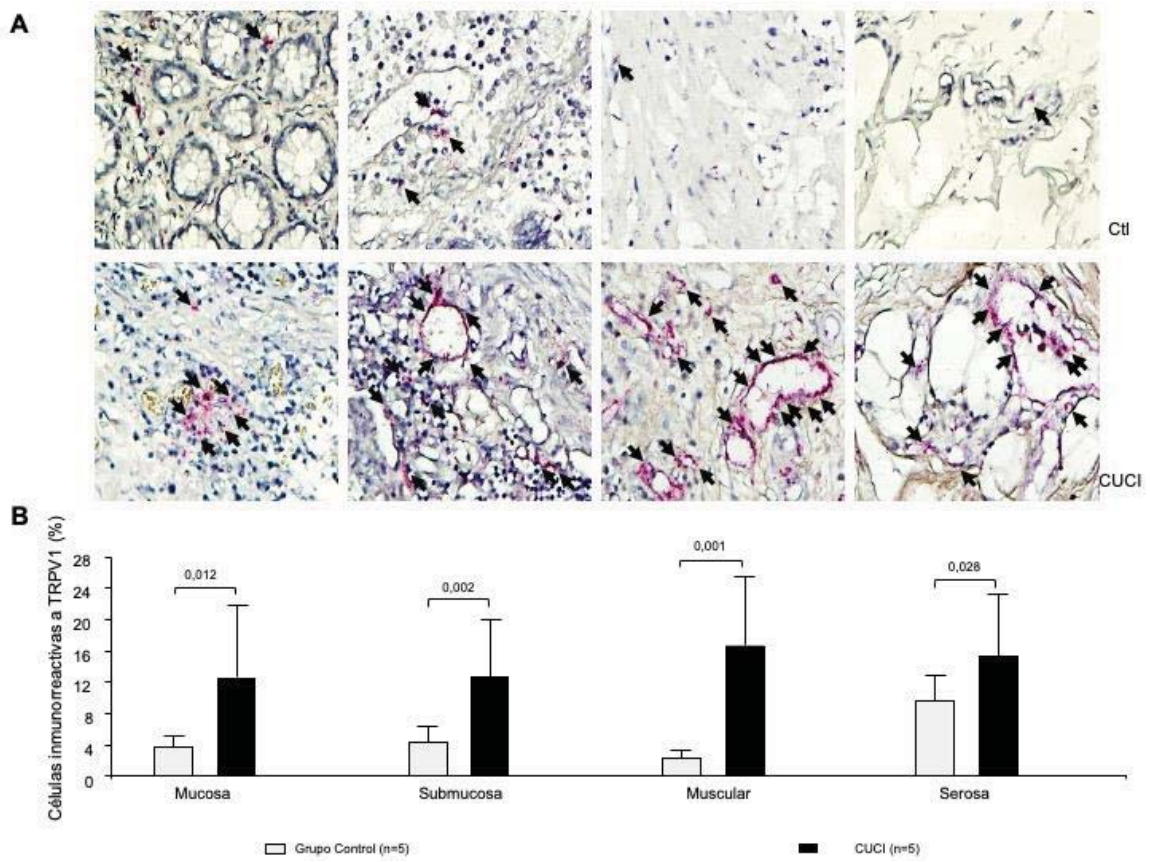


Figura 3. Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV1 en piezas de colectomía

El grupo de pacientes con CUCI activo mostró un nivel de expresión proteica significativamente mayor de TRPV1 a lo largo de todas las capas intestinales teniendo como probables estirpes celulares células de origen linfoide y células endoteliales.

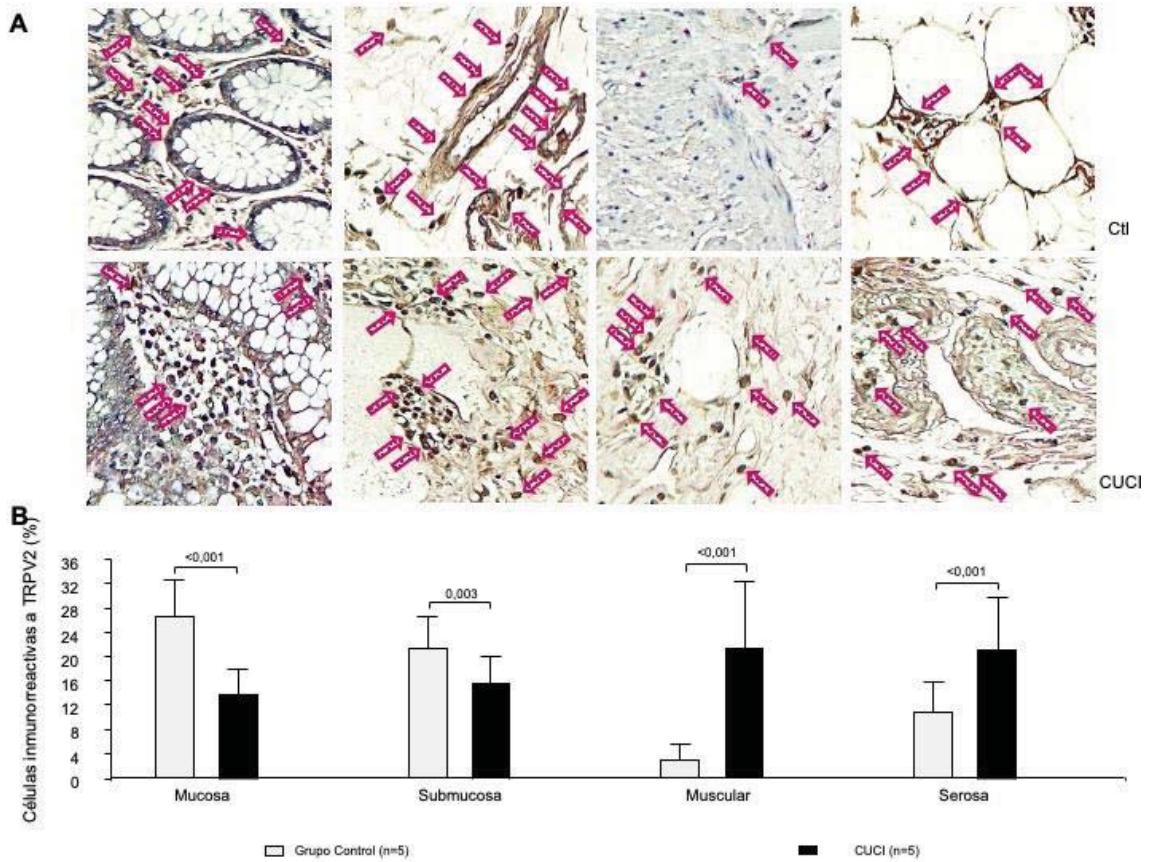


Figura 4.

Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV2 en piezas de colectomía

La expresión proteica de TRPV2 fue mayor en la mucosa ( $P < 0.001$ ) y submucosa ( $P = 0.003$ ), pero menor en músculo ( $P < 0.001$ ) y células de la serosa ( $P < 0.001$ ) en el caso de los controles en comparación con los pacientes afectados por CUCI.



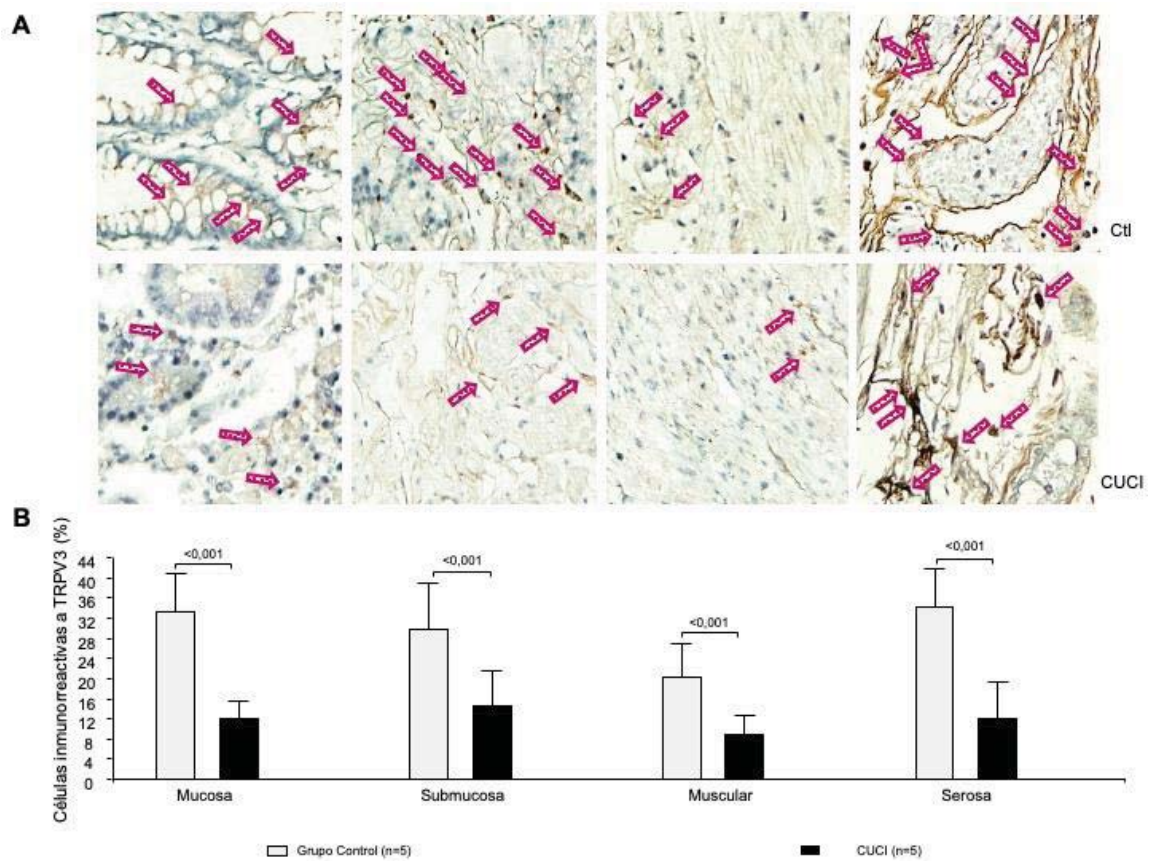


Figura 5.

### Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV3 en piezas de colectomía

La detección *in situ* de TRPV3 fue mayor en el caso de los controles en comparación con los pacientes afectados por CUCI a lo largo de todas las capas intestinales (mucosa,  $P < 0:001$ ; submucosa,  $P < 0:001$ ; músculo;  $P < 0:001$ ; and serosa,  $P < 0:001$ ).

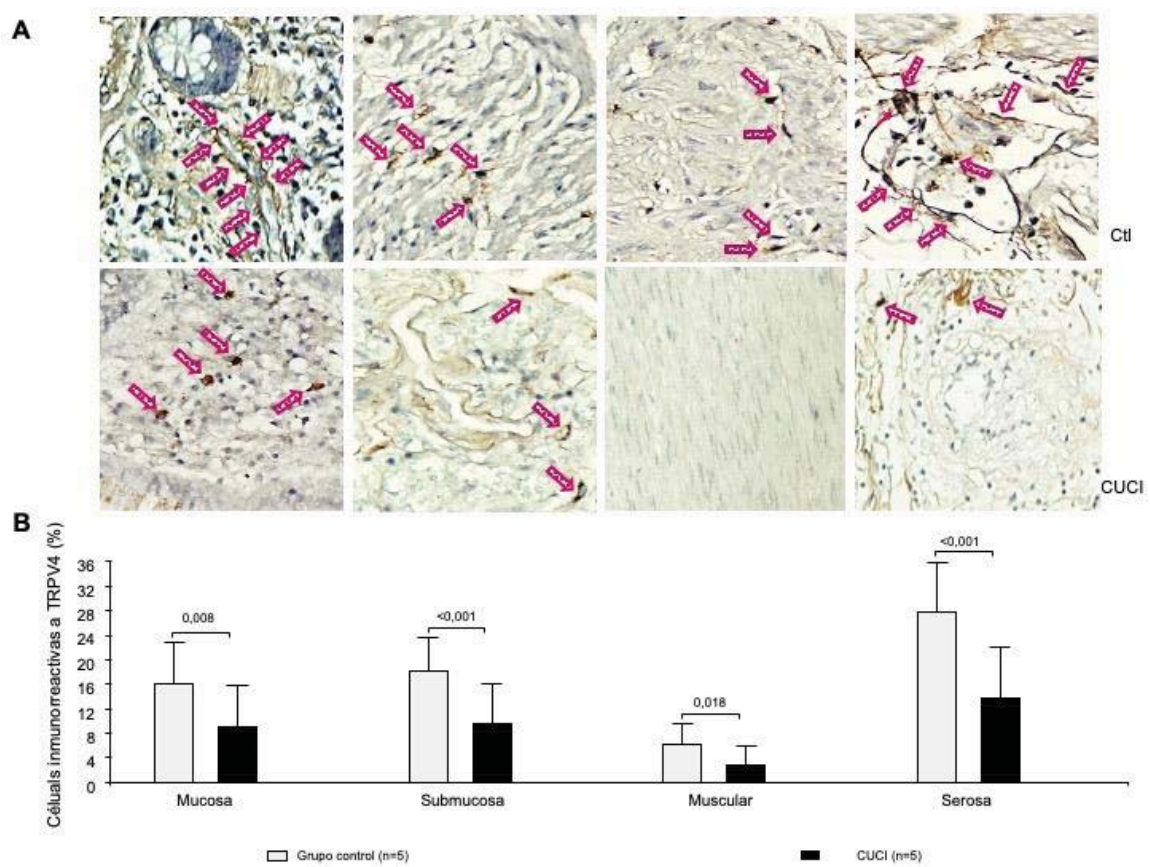


Figura 6.

### Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV4 en piezas de colectomía

La detección de la expresión proteica de TRPV4 fue menor en la mucosa ( $P = 0:008$ ), submucosa ( $P < 0:001$ ), muscular ( $P = 0:018$ ) y serosa ( $P < 0:001$ ) de los pacientes con CUCI comparados con el grupo control

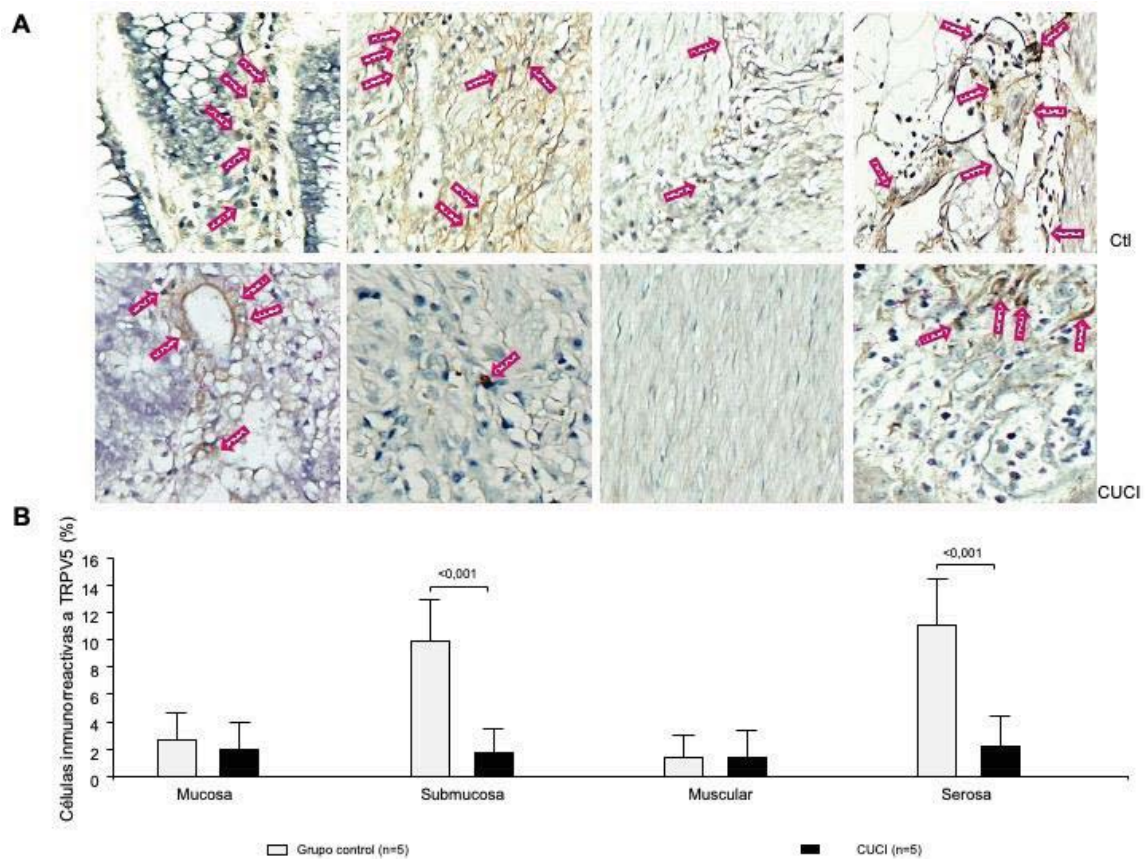


Figura 7.

### Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV5 en piezas de colectomía

La expresión proteica de TRPV5 mostró estar reducido a lo largo de todas las capas intestinales, aunque fue significativa solo en la submucosa ( $P < 0:001$ ) y serosa ( $P < 0:001$ ) en el caso del grupo con CUCI en comparación con los controles.

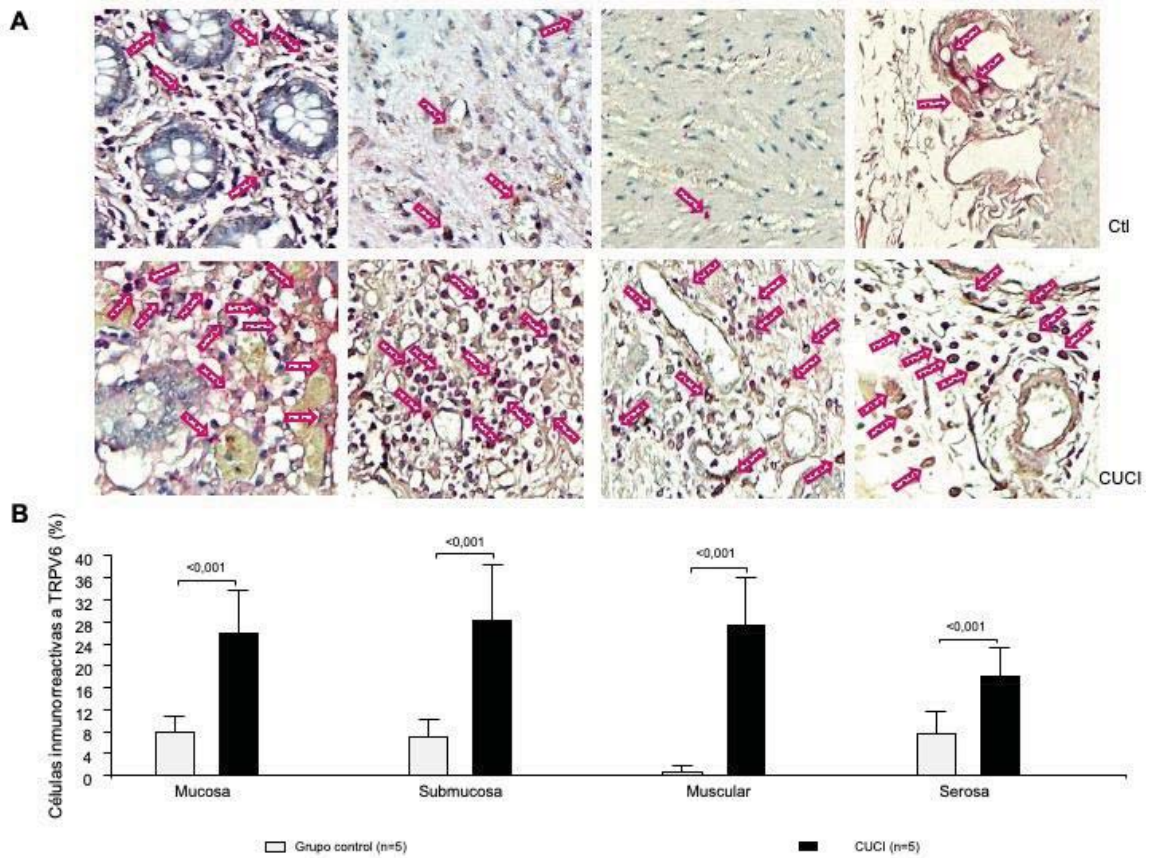


Figura 8.

Análisis Morfológico y Morfométrico de TRPV6 en piezas de colectomía.

La expresión proteica de TRPV6 fue mayor en cada capa intestinal en el caso del grupo con CUCI (mucosa,  $P < 0:001$ ; submucosa,  $P < 0:001$ , musculo,  $P < 0:001$ ; and serosa,  $P < 0:001$ ).

## 9. DISCUSIÓN:

La subfamilia TRPV se ha visto involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades gastrointestinales tales como la enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD), enfermedad por reflujo no esofágico (NERD) y el síndrome de intestino irritable (IBS) (118, 119).

Existe un patrón de expresión diferencial tanto génica como proteica de TRPV1 en pacientes con CUCI en comparación con los controles normales sin inflamación colónica. La expresión génica estuvo significativamente disminuida en pacientes con CUCI activa y se asoció con edad al diagnóstico menor de 40 años y curso clínico de la enfermedad caracterizado por actividad continua y relapsante. La expresión de TRPV1 estuvo incrementada en varios tipos de células en todas las capas colonicas de pacientes con CUCI activa comparado con tejido colonico normal (120). Se ha mostrado que TRPV1 juega un papel pivote en inmunidad e inflamación ya que está expresado tanto en monocitos, macrófagos y células dendríticas; dichos hallazgos se han llevado a cabo tanto en modelo murino como en estudios en humanos sugiriendo que la activación de TRPV1 es protectora en el caso de inflamación inducida por endotoxina; en contraste TRPV1 parece ser requerido por activación de receptor de T por mitógenos (121). Sin embargo, hace falta de estudios específicos con respecto a estudios de mecanismos inflamatorios. en el caso de la regulación de TRPV1 a nivel del epitelio intestinal.

Interesantemente, la expresión génica de TRPV2-5 estuvo disminuida en pacientes con CUCI activa comparado con el grupo de CUCI en remisión y controles sin inflamación intestinal.

En el caso de TRPV2, el grupo control mostró niveles mayores de expresión génica de TRPV2 comparado con los pacientes con CUCI activa. Mientras que el nivel de expresión proteica, en las capas internas del intestino tuvo un nivel incrementado de TRPV2 en la mucosa ( $P < 0:001$ ) y submucosa ( $P = 0:003$ ) pero menor en los músculos ( $P < 0:001$ ) y serosa ( $P < 0:001$ ) en el caso de los controles en comparación con los pacientes afectados por CUCI. De acuerdo con este resultado, un estudio previo reportó además un nivel de expresión proteica de canales TRPV en células epiteliales de la mucosa de muestras control sin EII y pacientes con CUCI en el que no se encontraron diferencias específicas entre los grupos estudiados (122). Más allá de eso, en el modelo de ratones con colitis inducida por DSS,

mayores niveles de expresión génica de TRPV2 se asociaron con mayores grados de inflamación intestinal (123). Respecto a la expresión proteica, tales resultados podrían estar relacionados con un nivel de expresión menor de TRPV2 por células de origen linfoide, siendo que las fuentes celulares principales encontradas en estudios previos son los linfocitos T en los cuales el receptor muestra una interacción directa con el receptor de células T y macrófagos (124, 125). La activación de TRPV2 se ha asociado con la producción de IL-6 e IL-8, pero tal producción no está documentada en el caso del tracto gastrointestinal (125). De acuerdo con los resultados de todos los estudios mencionados y del presente estudio se refuerza la veracidad de los hallazgos de Laragione T y cols. en cuanto a que la administración de agonistas para TRPV2 se asocia con la disminución de estados proinflamatorios. Sin embargo, es necesaria la realización posterior de estudios relevantes en el caso del tracto gastrointestinal (126).

Implicaciones específicas de TRPV3 en el tracto gastrointestinal aún no se han explorado. Sin embargo, este estudio ha demostrado que la expresión génica y proteica de TRPV3 a la baja se ha asociado con actividad de la enfermedad, como se reportó previamente por Rizopoulos et al. (124). El TRPV3 ya ha sido propuesto como un mecanismo relevante de inflamación gastrointestinal, pero aún no hay estudios acerca de vías específicas, aunque los efectos inflamatorios generales de agonistas y antagonistas específicos han sido descritos a detalle (125,127).

Interesantemente, la expresión génica de TRPV4 en pacientes con CUCI en remisión y grupos control estuvo incrementada en comparación con CUCI activo. La información anterior sugiere que un nivel de expresión alto de TRPV4 podría estar relacionado con un estado de colon sano. Conversamente, en otros estudios, la sobrerregulación de TRPV4 estuvo asociada con la presencia de inflamación en pacientes con CUCI y el modelo de colitis murino (122, 128 y 129), donde el canal TRPV4 podría incrementar la permeabilidad vascular en inflamación colónica. TRPV4 podría estar involucrado en la producción de IL-6 e IL-8 vía liberación de ATP para el desarrollo de inflamación (130). En el caso de TRPV4 ya se han caracterizado mecanismos de modificación postraducciona por cinasas y otras moléculas moduladoras; e incluso vías intracelulares específicas relacionadas con el

desarrollo de inflamación en diversas enfermedades sin embargo aún no han sido estudiadas a nivel intestinal (131).

En adición, la falta de TRPV5 parece estar relacionada con la inducción de CUCI. Radhakrishnan et al. (132) han demostrado que la expresión del canal TRPV5 en tejido renal estuvo involucrada en pérdida ósea en colitis experimental. El mecanismo plausible por el cual el canal TRPV5 podría estar involucrado en inflamación intestinal es la activación de internalización de este canal vía endocitosis clatrina dependiente para la entrada de  $Ca^{2+}$  controlada por cascadas de reciclado, pero este mecanismo aún no se ha caracterizado en pacientes con CUCI (133).

Se ha demostrado que TRPV6 está involucrado particularmente en el primer paso de absorción de Calcio en el intestino (134, 135, 136). Este estudio ha mostrado una mayor expresión génica y proteica en todas las capas intestinales de pacientes con CUCI y parece estar claramente relacionada con actividad de la enfermedad.

En un estudio previo por Meurer M et al. se encontraron niveles elevados de FGF-23 relacionados con un nivel incrementado de TRPV5 y TRPV6 en un modelo de lesión por isquemia-reperfusión renal sin embargo hace falta el estudio de tal y otras citocinas y su relación con la presencia de inflamación a nivel intestinal (137).

Aún queda pendiente la realización de estudios mecanísticos requeridos para revelar más claramente las implicaciones de esta subfamilia en la fisiopatología de la CUCI. Este estudio transversal está limitado a población mexicana, y siendo que la dieta está relacionada con la función y expresión de estos canales, estudios futuros en otras poblaciones con un mayor número de individuos son necesarias y también con una caracterización pertinente de patrones de dieta. Más allá de eso, los estudios translacionales de CUCI son requeridos siendo que evidencia acerca de que los miembros de la subfamilia TRPV podrían jugar un papel en la patogénesis de la inflamación intestinal en modelos murinos, así como en EII humana.

## **10. CONCLUSIONES:**

La subfamilia TRPV claramente está involucrada en el desarrollo del proceso inflamatorio en pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

Resulta relevante el estudio posterior de estos canales para su utilización como dianas terapéuticas y conocimiento de mayor profundidad sobre la fisiopatología de la enfermedad.

Este estudio se limita a población mexicana y siendo que la dieta está relacionada con la función de estos canales, estudios en otras poblaciones con mayores tamaños de muestra son necesarios y una caracterización de los patrones de dieta.

Los estudios traslacionales como este son importantes en el estudio de la CUCI, y hay algo de evidencia de que los miembros de la subfamilia TRPV podrían jugar un papel en la patogénesis los modelos murinos de inflamación intestinal, así como la EII humana.



## 11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: Cause and immunobiology. *Lancet*. 2007. May 12;369(9573):1627-40.
2. Martland GT, Shepherd NA. Indeterminate colitis: Definition, diagnosis, implications and plea for nosological snaitiy. *Histopathology*. 2007. Jan;50(1):83-96.
3. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004 May; 126(6):1504-17.
4. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology*. 1991; 91: 434-8.
5. Yamamoto-Furusho JK. Clinical Epidemiology of ucerative colitis in Mexico: a single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). *J Clin Gastroenterol*. 2009 Mar;43(3):221-4.
6. Ordas I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2012 Nov 3;380(9853):1606-19.
7. Molodecky N, Kaplan G. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (NY)*. 2010 May; 6(5):339-346.
8. Castro F, de Souza HSP. Dietary Composition and Effects in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients*. 2019 Jun 21; 11(6).
9. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:563-73.
10. Wendelsdorf K, Bassanganya-Riera J, Hontecillas R, Eubank S. Model of colonic inflammation: Immune modulatory mechanisms in inflammatory bowel disease. *J Theor Biol*. 2010 Jun 21; 264(4): 1225-1239.
11. Langner C, Magro F, Driessen A, Ensari A, Mantzaris GJ, Villanacci V, Becheanu G, Borralho Nunes P, Cathomas G, Fries W, Jouret-Mourin A, Mescoli C, de Petris G, Rubio CA, Shepherd NA, Vieth M, Eliakim R, Geboes K, European Society of Pathology European Crohns and Colitis Foundation. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Arch*. 2014 May;464(5):511-27.

12. Koliiani-Pace JL, Siegel CA. Prognosticating the Course of Inflammatory Bowel Disease. *Gastrointestinal Endosc Clin N Am*. 2019 Jul; 29(3):395-404.
13. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3;365(18):1713-25.
14. Brown SR, Coviello LC. Extraintestinal Manifestations Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am*. 2015 Dec;95(6):1245-59.
15. Trikudanathan G, Venkatesh PG, Navaneethan U. Diagnosis and therapeutic management of extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Drugs*. 2012;72(18):2333-49.
16. Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Prim Care*. 2017 Dec;44(4):673-692.
17. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2017 Apr 29;389(10080):1756-1770
18. Qayed E, et al. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease pathophysiology, diagnosis, management. 10th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2016.
19. Mohammed Vashist N, Samaan M, Mosli MH, Parker CE, MacDonald JK, Nelson SA, Zou GY, Feagan BG, Khanna R, Jairath V. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Jan 16;1
20. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in Ulcerative Colitis: Final report in a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2:1041.
21. Sutherland LR, Martin F, Greer S, Robinson M, Greenberger N, Saibi F, Martin T, Sparr J, Prokipchuk E, Borgen L. 5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis. *Gastroenterology*. 1987 Jun;92(6):1894-8.
22. Lobatón T, Bessissow T, De Hertogh G, Lemmens B, Maeler C, Van Assche G, Vermeire S, Bisschops R, Rutgeerts P, Bitton A, Afifi W, Marcus V, Ferrante M. The Modified Mayo Endoscopic Score (MMES): A New Index for the Assessment of Extension and Severity of Endoscopic Activity in Ulcerative Colitis Patients. *J Crohn Colitis*. 2015 Oct; 9(10):846-52.

23. Mosli MH, Parker CE, Nelson SA, Baker KA, MacDonald JK, Zou GY, Feagan BG, Khanna R, Levesque BG, Jairath V. Histologic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 May 25;5.
24. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006 Jun 55;(6): 749-753.
25. Strong SA. Management of acute colitis and toxic megacolon. *Clin Colon Rectal Surg*. 2010;23(4):274–284.
26. Magro F, Sousa HT. Editorial: ulcerative colitis submucosal fibrosis and inflammation: more than just strictures. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018 Apr;47(7):1033-1034.
27. Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 28;20(44):16389-97.
28. Shah H, Zezos P. Pouchitis: diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol*. 2020 Jan;36(1):41-47.
29. Venkatachalam K, Montell D. TRP channels. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:387-417.
30. Holzer P. (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24, 739-768.
31. Maggi, C.A. & Meli, A. (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol*. 19, 1-43.
32. Ogawa N, Kurokawa T, Mori Y. Sensing of redox status by TRP channels. *Cell Calcium*. 2016 Mar 4. Pii: S0143-4160(16)30012-4.
33. Yiangou Y, Facer P, Dyer NH, Chan CL, Knowles C, Williams NS, Anand P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet*. 2001 Apr 28;357(9265):1338-9.
34. Wouters MM, Balemans D, Van Wanrooy S, Dooley J, Cibert-Goton V, Alpizar YA, Valdez-Morales EE, Nasser Y, Van Veldhoven PP, Vanbrabant W, Van der Merwe S, Mols R, Ghesquière B, Cirillo C, Kortekaas I, Carmeliet P, Peetermans WE, Vermiere S, Rutgeerts P, Augustijns P, Hellings PW, Belmans A, Vanner S, Bulmer DC, Talavera K, Vanden Berghe P, Liston A, Boeckxstaens GE. Histamine Receptor H1-Mediated

- Sensitization of TRPV1 Mediates Visceral Hypersensitivity and Symptoms in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2016 Apr; 155(4):875-887.
35. Neri M. Irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease and TRPV1: How to disentangle the bundle. *Eur J Pain* 17 (2013) 1263-1264.
  36. Vinuesa AG, Sancho R, García-Limones C, Behrens A, ten Dijke P, Calzado MA, Muñoz E. Vanilloid Receptor-1 regulates neurogenic inflammation in colon and protects mice from colon cancer. *Cancer Res*. 2012 Apr 1;172(7):1705-16.
  37. Capasso R, Orlando P, Pagano E, Aveta T, Buono L, Borrelli F, Di Marzo V, Izzo AA. Palmitoylethanolamide normalizes intestinal motility in a model of post-inflammatory accelerated transit: involvement of CB1 receptors and TRPV1 channels. *Br J Pharmacol*. 2014 Sep; 171(17):4026-37
  38. Zhu L, Zhao L, Qu R, Zhu HY, Wang Y, Jiang X, Xu GY. Adrenergic stimulation sensitizes TRPV1 through upregulation of cystathionine  $\beta$ -synthetase in a rat model of visceral hypersensitivity. *Sci Rep*. 2015 Nov 3;5:16109.
  39. Kimball E.S., Wallace N.H., Schneider C.R., D'adrea M.R. and Hornby P.J. Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Neurogastroenterol Motil*. 2004; 16:811-818.
  40. Chu, C.J., Huang, S.M., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ewing, S.A., Miller, J.A., Zipkin, R.E., Daddario, N, Appendino, G., Di Marzo, V. and Walker, J.M. (2003) N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J. Biol. Chem.*, 278, 13633-13639.
  41. Huang, SM., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T.J., Krey, J.F., Chu, C.I., Miller, J.D., Davies, S.N., Geppetti, P., Walker, J.M. y Di Marzo, V. (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 8400-8405.
  42. Hwang, S.W., Cho, J., Kwak, J., Lee, S.Y., Kang, J., Jung S., Cho, K.H., Min, Y.G., Suh, D., Kim, U. and Oh, U. (2000) Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases, endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6155-60.

43. Szallasi A., Lewin N.A., Blumberg P.M., Vanilloid (capsaicin) receptor in the rat: positive cooperativity of resiniferatoxin binding and its modulation by reduction and oxidation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266 (1993) 678-683.
44. Szallasi A., Blumberg P.M., [3H]resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents, *Naunyn Schiedebergs Arch. Pharmacol.* 347 (1993) 84-91.
45. Susankova K., Tousova K., Vycklicky L., Teisinger J., Vlachova V. Reducing oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current *Mol. Pharmacol.* 70(2006)383-394.
46. Vycklicky L., Lyfenko A., Susankova K., Teisinger J., Vlachova V. Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1, *Neuroscience* 111(2002)435-441.
47. Yoshida T., Inoue R., Morii T., Takahashi N., Yamamoto S., Hara Y., Tominaga M., Shimizu S., Sato Y., Mori Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation, *Nat. Chem Biol.* 2 (2006) 596-607.
48. Bertin S, Aoki-Nonaka Y, de Jong PR, Nohara LL, Xu H, Stanwood SR, Srikath S, Lee J, To K, Abramson L, et al. The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4 T cells. *Nat Immunol.* 2014; 15(11):1055-63.
49. Prescott ED, Julius D. A modular PtdIns(4,5)P2 binding site as determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* 2003; 300:1284-8.
50. Kozai D, Ogawa N, Mori Y. Redox regulation of transient receptor potential channels. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Aug 20;21(6):971-86.
51. Chuang HH, Lin S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov 24;106(47):20097-102.
52. Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice, *PLoS One* 4 (2009) 20097-20102.
53. Wang S, Chuang H. C-terminal dimerization activates the nociceptive transduction channel transient receptor potential vanilloid 1. *J. Biol. Chem.* 286(2011)40601-40607.
54. Szallasi A, Lewin NA, Blumberg PM, Vanilloid (capsaicin) receptor in the rat: positive cooperativity of resiniferatoxin binding and its modulation by reduction and oxidation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266(1993)678-683.

55. Ogawa N, Kurokawa T, Fujiwara K, Polat OK, Badr H, Takahashi N, Mori Y. Functional and structural divergence in human TRPV1 channel subunits by oxidative cysteine modification, *J. Biol Chem.* 291 (2016) 4197-4210.
56. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 determined by electron cryo-microscopy, *Nature* 504 (2013) 107-112.
57. Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54 (2007) 905-918.
58. N. Ito, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki, Takeda S. Activation of calcium signaling through TRPV1 by Nnos and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nat. Med.* 19 (2013) 101-106.
59. Peralvarez-Marin A, Donate-Macian P, Gaudet, R. What do we know about the transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) ion channel? *FEBS J.* 280, 5471-5487 (2013).
60. Huynh KW, Cohen MR, Jiang J, Samantha A, Lodowski DT, Zhou ZH, Moiseenkova-Bell VY. Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM. *Nat Commun.* 2016 Mar 29;7:11130.
61. Kojima I, Nagasawa M. TRPV2. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 222:247-72. TRPV3
62. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregon, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci.* 2006 May;9(5):628-35.
63. Feketa VV, Marrelli SP. Systemic Administration of the TRPV3 Ion Channel Agonist Carvarol Induces Hypothermia. *PLoS One.* 2015 Nov 3;10(11).
64. Wu SW, Lindberg JE, Peters JH. Genetic and pharmacological evidence for low abundance TRPV3 expression in primary vagal afferent neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016 Feb 3.
65. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science.* 2002 Jun 14;296(5575):2046-9.
66. Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature.* 2002 Jul 11;418(6894):186-90.

67. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):181-6.
68. Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*. 2005 Mar 4;307(5714):1468-72.
69. Huang SM, Li X, Yu Y, Wang J, Caterina MJ. TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain*. 2011 May 17;7:37.
70. Miyamoto T, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. *Nat Commun*. 2011 Jun 28;2:369.
71. Marics I, Malapert P, Reynders A, Gaillard S, Moqrich A. Acute heat-evoked temperature sensation is impaired but not abolished in mice lacking TRPV1 and TRPV3 channels. *PloS One*. 2014 Jun 12;9(6).
72. Huang SM, Lee H, Chung MK, Park U, Yu YY, Bradshaw HB, Coulombe PA, Walker JM, Caterina MJ. Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2. *J Neurosci*. 2008 Dec 17;28(51):13727-37.
73. Hu H, Grandl J, Bandell M, Petrus M, & Patapoutian A. Two amino acid residues determine 2-APB sensitivity of the ion channels TRPV3 and TRPV4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 1626-1631.
74. Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Hwang SW. 17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception
75. Luo J, Hu H. Thermally activated TRPV3 channels. *Curr Top Membr*. 2014;74:325-64.
76. Yoshioka, T., Imura, K., Asakawa, M., Hirasawa, T., Deguchi, M., Matsutani, T., et al (2006). Spontaneous scratching behaviour in DS-Nh mice as possible model for pruritus in atopic dermatitis. *Immunology*, 118, 293-301.
77. Huang S. Targeting TRPV3 for the development of novel analgesics. *Open Pain J*. 2013;69(Spec Iss 1):119-126.

78. Yamamoto-Kasai E, Yasui K, Shichijo M, Sakata T, Yoshioka T. Impact of TRPV3 on the development of allergic dermatitis as a dendritic cell modulator. *Exp Dermatol*. 2013 Dec;22(12):820-4.
79. Sozucan Y, Kalender ME, Sari I, Suner A, Oztuzcu S, Arman K, Yumrutas O, Bozgeyik I, Cengiz B, Ipci YZ, Balakan O, Camci C. TRP genes family expression in colorectal cancer. *Exp Oncol*. 2015 Sep;37(3):208-12.
80. Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, and Hellers S (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103:525-535.
81. Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, and Plant TD (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* 2:695-702.
82. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, and Nilius B (2003) Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature (Lond)* 424:434-438.
83. Liedtke W, Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 11;100(23):13698-703.
84. Mizuno A, Matsumoto N, Inai M, and Suzuki M (2003) Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C96-C101.
85. Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parada CA, Chen X, Reichling DB, and Levine JD (2003) Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* 39:497-511.
86. Tian W, Salanova M, Xu H, Lindsley JN, Oyama TT, Anderson S, Bachmann S, and Cohen DM (2004) Renal expression of osmotically responsive cation channel TRPV4 is restricted to water-impermeant nephron segments. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F17-F24.
87. Jia Y, Wang X, Varty L, Rizzo CA, Yang R, Correll CC, Phelps PT, Egan RW, and HEY ja (2004) Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L272-L278.



88. Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, and Caterina MJ (2004b) TRPV3 y TRPV4 median las corrientes evocadas por calor en queratinocitos primarios de ratón. *J Biol Chem* 279:21569-21575.
89. Suzuki M, Watanabe Y, Oyama Y, Mizuno A, Kusano E, Hirao A, and Ookawara S (2003) Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *NeurosciLett* 353:189-192.
90. Tominaga M and Caterina MJ (2004) Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 61:3-12.
91. Nilius B, Vennekens R, Prenen J, Hoenderop JG, Bindels RJ, and Droogmans G (2000) Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca<sup>2+</sup> channel ECaC. *J Physiol* 527 (Pt 2):239-248.
92. Vennekens R, Hoenderop GJ, Prenen J, Stuver M, Willems PHGM, Droogmans G, Nilius B, and Bindels RJM (2000) Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca<sup>2+</sup> channel. *J Biol Chem* 275:3963-3969.
93. Yue L, Peng JB, Hediger MA, and Clapham DE (2001) CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature (Lond)* 410:705-709.
94. Bodding M and Flockerzi V (2004) Ca<sup>2+</sup> dependence of the Ca<sup>2+</sup> dependence of the Ca<sup>2+</sup>-selective TRPV6 channel. *J Biol Chem* 279:36546-36552.
95. Lambers TT, Widema AG, Nilius B, Hoenderop JG, and Bindels RJ (2004) TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation. *Science (Wash DC)* 306:1374-1377.
96. Hoenderop JG, Nilius B and Bindels RJ (2005) Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:1153-1158.
97. Hoenderop JG and Bindels RJ (2005) Epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 16:15-26.
98. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, and Bonkhoff H (2003) Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*. 22:7858-7861.
99. Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem*. 1999 Aug 6;274(32):22739-46.

100. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem*. 2001 Jun 1;276(22):19461-8.
101. Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B. Outer pore architecture of a Ca<sup>2+</sup>-selective TRP channel. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9;279(15):15223-30.
102. Fecher-Trost C, Wissenbach U, Beck A, Schalkowsky P, Stoerger C, Doerr J, Dembek A, Simon-Thomas M, Weber A, Wollenberg P, Ruppert T, Middendorff R, Maurer HH, Flockerzi V. The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet, decoded as methionine, upstream of canonical initiation at AUG. *J Biol Chem*. 2013 Jun 7;288(23):16629-44.
103. Akey JM, Eberle MA, Rieder MJ, Carlson CS, Shriver MD, Nickerson DA, Kruglyak L. Population history and natural selection shape patterns of genetic variation in 132 genes. *PLoS Biol*. 2004 Oct;2(10):e286.
104. TRPV6 exhibits unusual patterns of polymorphism and divergence in worldwide populations. *Hum Mol Genet*. 2006 Jul 1;15(13):2106-13.
105. Stajich JE, Hahn MW. Disentangling the effects of demography and selection in human history. *Mol Biol Evol*. 2005 Jan;22(1):63-73.
106. Hughes DA, Tang K, Strotmann R, Schöneberg T, Prenen J, Nilius B, Stoneking M. Parallel selection on TRPV6 in human populations. *PLoS One*. 2008 Feb 27;3(2):e1686.
107. Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V 2001 Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* 276:19461-19468.
108. Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR. Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest*. 2002 Dec;82(12):1755-64.
109. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*. 2003 Oct 30;22(49):7858-61.

110. Bolanz KA, Hediger MA, Landowski CP. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther.* 2008 Feb;7(2):271-9.
111. Weissberger P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, Vennekens R, Wissenbach U, Middendorff R, Flockerzi V, Freichel M. Male fertility depends on Ca<sup>2+</sup> absorption by TRPV6 in epididymal epithelia. *Sci Signal.* 2011 May 3;4(171):ra27.
112. Weissberger P, Kriebs U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, Mannebach S, Wissenbach U, Vennekens R, Middendorff R, Flockerzi V, Freichel M. Excision of TRPV6 gene leads to severe defects in epididymal Ca<sup>2+</sup> absorption and male fertility much like single D541A pore mutation. *J Biol Chem.* 2012 May 25;287(22):17930-41.
113. Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ 2003 Homo- and heterotetrametric architecture of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22:776-785.
114. 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.
115. Lambers TT, Widema AF, Nilius B, Hoenderop JG, Bindels RJ 2004 Regulation of the mouse epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV6 by the Ca<sup>2+</sup> -sensor calmodulin. *J Biol Chem* 279:28855-28861.
116. Bodding M, Flockerzi V 2004 Ca<sup>2+</sup> dependence of the Ca<sup>2+</sup> -selective TRPV6 Channel. *J Biol Chem* 279:36546-36552.
117. Van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D, Lamers D, Prenen J, Rescher U, Gerke V, Staub O, Nilius B, Bindels RJ 2003 Functional expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10- annexin 2 complex. *EMBO J* 22:1478-1487.
118. Beggs MR, Lee JJ, Busch K, Raza A, Dimke H, Weissgerber P, Engel J, Flockerzi V, Alexander RT. TRPV6 and Cav 1.3 Mediate Distal Small Intestine Calcium Absorption Before Weaning. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;8(4):625-642.
119. Radhakrishnan VM, Kuro-OM, Kiela PR, Ghishan FK. Post-translational loss of renal TRPV5 calcium channel expression Ca<sup>2+</sup> wasting, and bone loss in experimental colitis. *Gastroenterology.* 2013 Sep; 145(3):613-24.

120. Toledo-Mauriño JJ, Furuzawa-Carballeda J, Villeda-Ramírez MA, Fonseca-Camarillo G, Meza-Guillen D, Barreto-Zuñiga R, Yamamoto-Furusho JK. The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Associated with Active Inflammation in Ulcerative Colitis. *Mediators of Inflamm.* 2018 Jul 29;2018:6570371.
121. Omari SA, Adams MJ, Geraghty DP. TRPV1 Channels in Immune Cells and Hematological Malignancies. *Adv Pharmacol.* 2017;79:173-198.
122. Rizopoulos T, Papadaki-Petrou H, Assimakopoulou M, Expression profiling of the transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels 1,2,3 and 4 in mucosal epithelium of human ulcerative colitis, *Cell*, vol. 7, no. 6, p. 61, 2018.
123. Issa CM, Hambly BD, Wang Y et al, TRPV2 in the development of experimental colitis, *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 80, no. 5, pp. 307-312, 2014.
124. Qualls JE, Kaplan M, van Rooijen N, Cohen DA, Supression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes, *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 80, no. 4, pp. 802-815, 2006.
125. Son GY, Hong JH, Chang I, Shin DM, Induction of Il-6 and Il-8 by activation of thermosensitive TRP channels in human PDL cells, *Archives of Oral Biology*, vol. 60, no. 4, pp. 526-532, 2015.
126. Laragione T, Chenf KF, Tanner MR, He M, Beeton C, Al-Abed Y, Gulko PS. The Cation Channel TRPV2 Is a New Suppressor of Arthritis Severity, Joint Damage, and Synovial Fibroblast Invasion. *Clin Immunol.* 2015 Jun;158(2):183-92.
127. Nilius B, Biró T, Owsianik G. TRPV3: time to decipher a poorly understood family member! *J Physiol.* 2014 Jan 15; 592(Pt 2): 295-304.
128. De Petrocellis L, Orlando P, Moriello AS, Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation, *Acta Physiologica*, vol. 204, no. 2, pp. 255-266, 2012.
129. D'aldebert E, Cenac N, Rousset P et al, Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice, *Gastroenterology*, vol. 140, no. 1, pp. 275-285.e3, 2011.
130. Matsumoto K, Yamaba R, Inoue et al, Transient receptor potential vanilloid 4 channel regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran

- sulphate sodium-induced murine colitis, *British Journal of Pharmacology*, vol. 175, no. 1, pp. 84-99, 2018.
131. Darby WG, Grace MS, Baratchi S, McIntyre P. Modulation of TRPV4 by Diverse Mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016 Sep;78:217-228.
132. Ohsaki A, Tanuma SI, Tsukimoto M, TRPV4 channel regulated ATP release contributes to  $\gamma$ -irradiation
133. Radhakrishnan VM, Ramalingam R, Larmonier CB, Thurston RD, Laubitz D, Post-translational Loss of Renal TRPV5 Calcium Channel Expression, Ca<sup>2+</sup> Wasting, and Bone Loss in Experimental Colitis, *Gastroenterology*, vol. 145, no. 3, pp. 613-624, 2013.
134. van de Graaf SF, Rescher U, Hoenderop JG, Verkaart S, Bindels RJ, Gerke V, TRPV5 is internalized via clathrin-dependent endocytosis to enter a Ca<sup>2+</sup> controlled recycling pathway, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 7, pp. 4077-4086, 2008.
135. Skrzypski M, Khajavi N, Mergler S et al, TRPV6 channel modulates proliferation of insulin secreting INS-1E beta cell line, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, vol. 39, no. 2, pp. 163-173, 2006.
136. Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeyer et al. BA, TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation, *Cell Calcium*, vol. 39, no. 2, pp. 163-173, 2006.
137. Meurer M, Höcherl K. Renal Ischemia-Reperfusion Injury Impairs Renal Calcium, Magnesium, and Phosphate Handling in Mice. *Pflugers Arch.* 2019 Jun;471(6):901-914.

## **12. APENDICE I: (ABREVIATURAS)**

ACG Treonina

ADN Acido Desoxirribonucleico

APCMin/+ Neoplasia Intestinal Múltiple del gen ACP

ARN Acido Ribonucleico

ATP Adenosin Trifosfato

AUG Metionina

Ca<sup>2+</sup> Calcio

CAC Cáncer Asociado a Colitis

CaT1 Transportador Catiónico de Aminoácidos 1

cDNA Acido Desorribonucleico Complementario

CGRP Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina

CRC Cáncer Colorrectal

CUCI Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática

EC Enfermedad de Crohn

ECAC2 Canal de Calcio Epitelial 2

EII Enfermedad Inflamatoria Intestinal

FGF-23 Factor de Crecimiento de Fibroblastos 23

GERD Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico

H<sup>+</sup> Hidrógeno

HRH1 Receptor de Histamina H1

IB4 Isolectina B4

IFN- $\gamma$  Interferon gamma

IL-12 Interleucina 12

IL-6 Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

IL23 Interleucina 23

LPTE Linfopoyetina Tímica Estromal

MEI Manifestaciones Extraintestinales

Mg<sup>2+</sup> Magnesio

NERD Enfermedad por Reflujo No erosiva

NF- $\kappa$ B Factor Nuclear Kappa Beta

NOS Oxido Nítrico

PCa Permeabilidad a Calcio

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PIP2 Fosfoinositol Bifosfato

PNa Permeabilidad a Sodio

RT-PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

SEM Error Estándar de la Media

SII Síndrome de Intestino Irritable

STAT3 Transductor de Señal y activador de Transducción 3

Th1 T-helper 1

Th17 T-helper 17

TNF- $\alpha$  Factor de Necrosis Tumoral alfa

TRP Receptores de Potencial Transitorio

TRPA Receptores de Potencial Transitorio activados por Anquirina

TRPC Receptores de Potencial Transitorio activados por Canónicos

TRPM Receptores de Potencial Transitorio activados por Melastatina

TRPML Receptores de Potencial Transitorio activados por Muco lipina

TRPN Receptores de Potencial Transitorio activados Mecánicamente

TRPP Receptores de Potencial Transitorio activados por Polipéptidos

TRPV Receptores de Potencial Transitorio activados por Vaniloides



### 13. APÉNDICE II: (ARTÍCULOS PRESENTADOS)

1. Toledo-Mauriño JJ, Furuzawa-Carballeda J, Villeda-Ramírez MA, Fonseca-Camarillo, Meza-Guillén Daniela, Barreto-Zúñiga, Yamamoto-Furusho JK. The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is associated with Active inflammation in Ulcerative Colitis. *Mediators inflamm.* 2018; 2018:6570371.
2. Toledo-Mauriño JJ, Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Barreto-Zúñiga R, Martínez Benítez B, Granados J, Yamamoto-Furusho JK. TRPV subfamily (TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 and TRPV6) gene and protein expression in patients with Ulcerative Colitis. *Journal of Immunology Research.* 2020 May 8; 2020:2906845.

## Research Article

# The Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Associated with Active Inflammation in Ulcerative Colitis

Joel Jesús Toledo-Mauriño,<sup>1,2</sup> Janette Furuzawa-Carballeda ,<sup>3</sup> Marco A. Villeda-Ramírez,<sup>1</sup> Gabriela Fonseca-Camarillo ,<sup>1</sup> Daniela Meza-Guillen,<sup>4</sup> Rafael Barreto-Zúñiga,<sup>4</sup> and Jesús K. Yamamoto-Furusho <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inflammatory Bowel Disease Clinic, Department of Gastroenterology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>PECEM (Combined Study Plan in Medicine), Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Department of Endoscopy, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Jesús K. Yamamoto-Furusho; kazuofurusho@hotmail.com

Academic Editor: Vinod K. Mishra

Copyright © 2018 Joel Jesús Toledo-Mauriño et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) may play a role in the pathogenesis of ulcerative colitis (UC). The aim of the study was to determine the gene and protein expression of TRPV1 in UC patients and noninflamed controls. Gene expression was performed by RT-PCR, and protein expression was performed by immunohistochemistry. The gene expression of TRPV1 was significantly increased in the remission UC group compared to active UC patients ( $P = 0.002$ ), and an upregulation of the TRPV1 gene was associated with clinical outcomes such as age at diagnosis ( $<40$  years) ( $P = 0.02$ ) and clinical disease course characterized by relapsing and continuous activity ( $P = 0.07$ ). TRPV1 immunoreactive cells were conspicuously higher in all intestinal layers from active UC patients compared with noninflamed control tissue. These findings suggest that TRPV1 might be involved in UC pathogenesis.

## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) comprises both conditions Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) which are characterized by chronic and remitting course. It has been speculated that there is abnormal barrier function, inflammatory infiltrates in submucosa and mucosa, and dysregulated cytokine and T-helper cell profiles [1, 2].

The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is a nonselective cation channel which belongs to a family of receptors that have been involved in the permeability for divalent and monovalent cations including  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ , and  $\text{Mg}^{2+}$  named TRP (transient receptor potential) [3, 4].

The capsaicin is one of the natural ligands of TRPV1, a spicy component of hot peppers. Capsaicin suppresses the expression of inflammatory cytokines such as interleukins (IL-6 and IL-8), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), cyclooxygenase-2 (COX2), and prostaglandin E2 (PGE2) in chronic inflammatory states [5].

Previous studies have demonstrated that TRPV1 is involved in the stimulation of pain and inflammation specifically in those patients with irritable bowel syndrome (IBS) [6].

TRPV1 knockout mice models have reported that overexpression of TRPV1 was associated with enhancement of clinical symptoms and histopathological changes such as neutrophil accumulation [7, 2]. On the other hand, TNBS-induced colitis animal model has shown that TRPV1

may have a protective role in the inflammatory process due to TRPV1  $-/-$  knockout mice, revealing low inflammation activity index and myeloperoxidase activity level [8].

No previous studies have evaluated the role of TRPV1 in UC patients regarding clinical outcomes and the type of TRPV1-expressing cells. The aim of this study was to determine the gene and protein expression in patients with UC and noninflamed controls as well as its association with clinical outcomes.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Study Subjects.** A total of 53 individuals were divided into 3 groups: 17 active UC, 17 remission UC, and 19 normal controls without colonic inflammation (non-IBD controls) documented by histology. The diagnosis of UC was performed according to clinical, endoscopic, and histopathological findings.

All UC patients were included during the period from January 2014 to July 2015 belonging to the Inflammatory Bowel Disease Clinic at the National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán. Relevant clinical and demographic information from all UC patients were collected from interview and clinical medical records. The variables evaluated were age at diagnosis, gender, type of medical treatment (5-aminosalicylates, steroids, thiopurines, and biological therapy), disease extension according to Montreal Classification (E3: pancolitis, E2: left colitis, and E1: proctitis), the presence of extraintestinal manifestations (peripheral and axial joint affection, primary sclerosing cholangitis, pyoderma gangrenosum, erythema nodosum, and uveitis) and clinical course classified as initially active and long-term remission, intermittent activity (<2 relapses per year), and chronic continual activity (persistent activity without remission periods). Colonoscopy was performed for taking biopsies and to calculate the Mayo Score Activity Index [9–11]. The normal control group consisted of noninflamed controls without inflammatory bowel disease undergoing colonoscopy for other reasons. All patients who agree to participate in the study signed written informed consent.

**2.2. Sample Processing and Gene Expression Analysis.** All colonic biopsies were taken by colonoscopy and were immediately placed in RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until processing. Total RNA extraction from colonic biopsies was made using RNA extraction kit (High Pure RNA Tissue Kit, Roche). Biopsies were mixed using homogenizer for 1 minute with lysis buffer, one wash with ethanol was made using purification columns, the mix was then centrifuged at  $13,000 \times g$  for 15 seconds, a second wash was made by using washing buffer at  $13,000 \times g$  for 15 seconds, and finally,  $100 \mu\text{L}$  was added to elution buffer in order to dilute total RNA. Electrophoresis confirmed RNA extracts in a 1% agarose gel visualized by a UV transilluminator. The cDNA synthesis was made from  $20 \mu\text{L}$  of total RNA reverse transcription based on the following protocol: preincubation:  $25^{\circ}\text{C} \times 10$  minutes, incubation:  $55^{\circ}\text{C} \times 30$  minutes, and followed by denaturalization:  $85^{\circ}\text{C} \times 5$  minutes by using a thermocycler (Perkin-Elmer).

TABLE 1: Oligonucleotides used for gene expression.

Gene	Left	Right
TRPV1	cagcagcgagaccctaa	Cctgcaggagtcggttca
IL-6	caggagcccagctatgaact	gaaggcagcaggcaacac
$\beta$ -Actin	aaggcattacttcaaactgtca	tggattcatcagctgattt

The gene expression of TRPV1, IL-6, and  $\beta$ -actin (reference gene) was performed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) using  $20 \mu\text{L}$  of cDNA for each gene. Amplification was made by the following conditions: denaturalization program at  $95^{\circ}\text{C} \times 10$  minutes, 45 amplification cycles ( $95^{\circ}\text{C} \times 10$  seconds, alignment  $60^{\circ}\text{C} \times 10$  seconds, extension  $40^{\circ}\text{C} \times 30$  seconds), and a cooling cycle at  $40^{\circ}\text{C} \times 30$  seconds. The thermocycler LightCycler 2.0 Roche<sup>®</sup> was used by employing validated assays for quantification (reproducibility and linearity), with sense and antisense oligonucleotides from Invitrogen<sup>®</sup> and TaqMan probes for each gene (Universal Probe Library, Library Set, Human, Roche). Oligonucleotide sequences are shown in Table 1. It is important to note that we used IL-6 gene expression level because our group already demonstrated that IL-6 is a better marker than TNF- $\alpha$  for detecting inflammation in the colonic mucosa and had a high correlation with histological activity in Mexican patients with UC [12].

**2.3. Immunohistochemical Procedure.** The TRPV1 protein expression was determined by using  $5 \mu\text{m}$  thick sections of available formalin-fixed paraffin-embedded tissue from 5 colon surgical specimens of severe active UC patients and 5 from controls without IBD. All surgical specimens were deparaffinized and rehydrated with xylene and alcohol. Endogenous peroxidase and binding of nonspecific proteins were blocked with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 10% of normal donkey serum (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology), respectively. All colon surgical specimens were incubated with rabbit anti-human TRPV1 (Santa Cruz Biotechnology) diluted at  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  for 18 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Binding was detected by incubating sections for 60 min at room temperature with goat anti-rabbit IgG antibody alkaline phosphatase conjugate (Santa Cruz Biotechnology). Slides were incubated with the substrate permanent red (Sigma-Aldrich Co.) for 10 min. The sections were counterstained with Mayer's hematoxylin (Lillie's modification) (DAKO, Glostrup, Denmark) and immersed into a bath of 7 mM/L ammonia water, rinsed gently in deionized water for 2–5 min, dehydrated, and mounted with Faramount aqueous mounting medium (DAKO). Negative control staining was performed with normal donkey serum diluted 1:100, instead of primary antibody, and the IHC universal negative control reagent specifically designed to work with rabbit, mouse, and goat antibodies (IHC universal negative control reagent, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA, ADI-950-231). The reactive blank was incubated with phosphate buffer saline-egg albumin (Sigma-Aldrich) instead of the primary antibody. Controls excluded nonspecific staining or endogenous enzymatic activities. Morphometric evaluation of stained

TABLE 2: Demographical and clinical characteristics of patients with UC.

Clinical characteristics of UC patients		<i>n</i>	%	TRPV1 expression median (range)	<i>P</i>
Gender	Male	17	50	10.53 (7.86–18.57)	0.94
	Female	17	50	10.73 (7.82–17.57)	
Age at diagnosis	<40	25	73.52	10.90 (7.82–13.29)	0.02
	>40	8	23.52	9.82 (8.18–11.37)	
Extraintestinal manifestations	Present	33	62.3	10.33 (7.83–18.57)	0.18
	Absent	20	37.7	10.93 (7.82–13.29)	
Extent of disease	Left colitis (E2) and distal colitis (E1)	15	45.5	10.73 (8.47–13.39)	0.91
	Extensive colitis (E3)	18	54.5	10.65 (7.82–13.29)	
Years of evolution	<3	18	54.5	10.65 (8.47–13.29)	1.00
	>3	15	45.5	10.90 (7.82–12.39)	
Clinical course of disease	Nonrelapsing disease	14	42.4	10.33 (7.82–13.29)	0.07
	Relapsing disease	19	57.6	10.90 (8.18–12.74)	

\*Extent of disease is presented according to Montreal classification for disease extent in patients with ulcerative colitis (Satsangi J. 2006).

sections was performed in a blinded manner. TRPV1-expressing cells were assessed by estimating the positive staining cells in three fields ( $\times 320$ ) and were reported as the percentage of immunoreactive cells of the inflammatory infiltrates located at mucosa, submucosa, muscular, and serosa. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of cells quantified by the program Image-Pro Plus version 5.1.1.

**2.4. Ethical Considerations.** This study was performed according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethical and Medical Committee at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, and a written informed consent was obtained from all individuals.

**2.5. Statistical Analysis.** The statistical analysis was performed using SPSS version 17.0, Kruskal-Wallis nonparametric test, Spearman's correlation, Fisher's exact test, and odds ratio (OR) in order to determine the strength of association. Immunohistochemistry statistical analysis was done by using one-way analysis of variance on ranks by Dunn's method for all pairwise multiple comparison procedure (SigmaStat 11.2 program, Aspire Software International, Leesburg, VA, USA). Data were expressed as median, range, and mean  $\pm$  standard deviation (SD)/standard error of the mean (SEM). A *P* value  $< 0.05$  was considered as statistically significant.

### 3. Results

**3.1. Demographic and Clinical Characteristics.** A total of 34 patients with UC (17 female and 17 male with a mean age of  $40.60 \pm 13.38$  years) and 19 non-IBD controls (10 female and 9 male with a mean age of  $47.22 \pm 15.92$  years) were studied. The disease extent was evaluated by total colonoscopy, and biopsies were obtained from all segments of the colon. The medical was based on 97.1% with 5-aminosalicylates

(5-ASA), 29.4% steroids, 23.5% thiopurines, and 2.9% anti-TNF therapy as shown in Table 2.

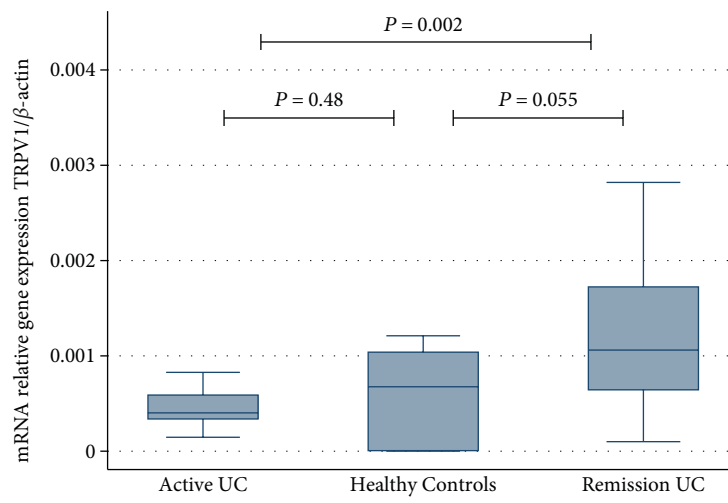
**3.2. TRPV1 and IL-6 Gene Expression in Colonic Tissue from Patients with UC.** The TRPV1 gene expression was significantly increased in the remission UC group compared to the active UC group ( $P = 0.002$ ). The gene expression of TRPV1 was higher in UC remission compared to the normal controls without inflammation ( $P = 0.055$ ). No significant difference was found between patients with active UC compared with normal controls as shown in Figure 1. The TRPV1 downregulation was associated with age at diagnosis younger than 40 years ( $P = 0.02$ ) and clinical disease course characterized by relapsing and continuous activity ( $P = 0.07$ ) as shown in Table 2.

The gene expression of TRPV1 and IL-6 in patients with active UC, remission UC, and normal controls are shown in Figure 1. It is important to note that active UC patients had significantly higher levels of IL-6 gene expression than those in normal controls and remission UC patients ( $P = 0.001$  and  $P = 0.002$ , resp.). The gene expression of IL-6 was similar in normal controls and the remission UC group ( $P = 0.772$ ).

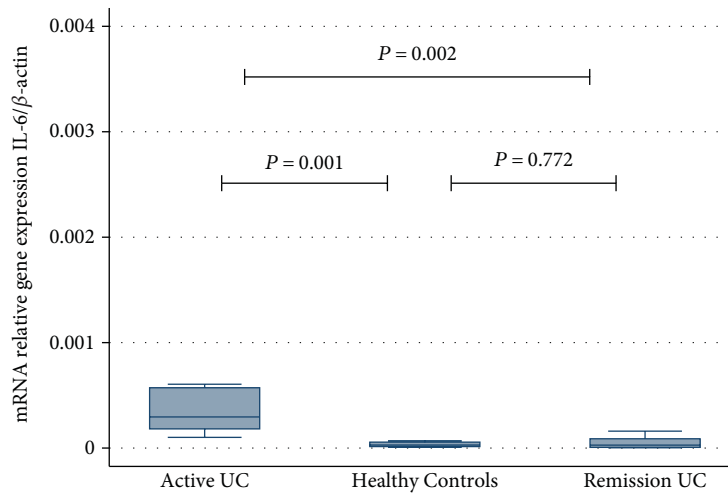
**3.3. TRPV1-Expressing Cells in Patients with UC and Non-IBD Controls.** The TRPV1 protein expression showed that percentage of TRPV1 immunoreactive cells was conspicuously higher in lymphocytes, mast, endothelial, epithelial, and muscle cells localized in the mucosa, submucosa, muscular, and adventitia from severe active UC patients compared to normal control colonic tissue as shown in Figure 2.

### 4. Discussion

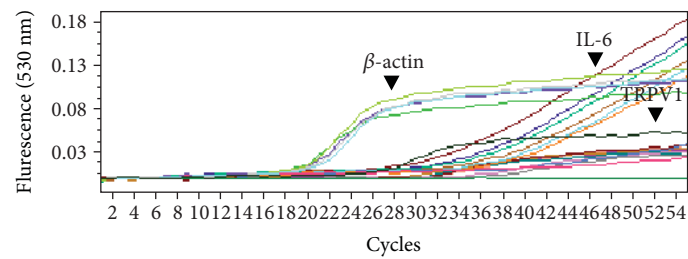
The findings of the present study demonstrated that there is a differential gene and protein expression of TRPV1 in UC patients compared to normal controls without colonic inflammation. The TRPV1 gene expression was significantly decreased in patients with active UC and was associated with



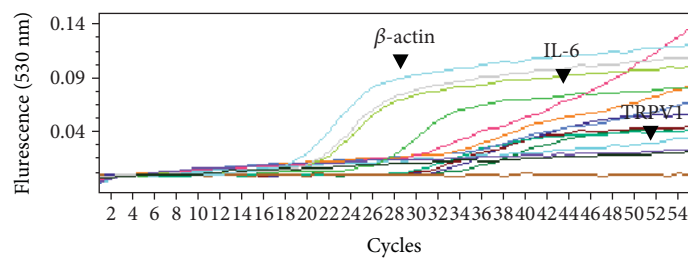
(a)



(b)



(c)



(d)

FIGURE 1: Continued.

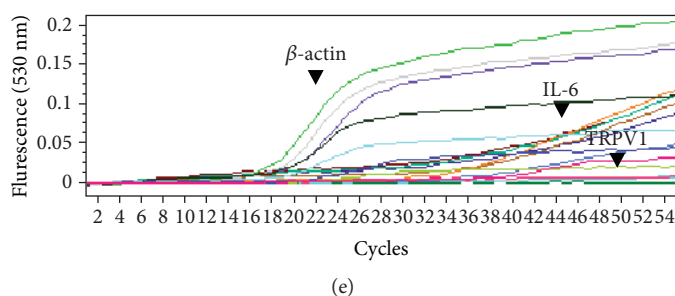


FIGURE 1: Gene expression of TRPV1 and IL-6 quantified by RT-PCR in colonic mucosa from patients with active and remission UC compared to non-IBD controls. (a) TRPV1 mRNA expression levels. (b) IL-6 mRNA expression levels. Bars show mean  $\pm$  standard error of the mean of transcript levels from UC patients with  $\beta$ -actin as housekeeping gene determined by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . \* $P$  value  $< 0.05$  was considered as significant. Panels (c), (d), and (e) showed original RT-PCR cycles to clearly appreciate the level of TRPV1 mRNA expression in active UC, normal controls, and remission UC, respectively.

age at diagnosis younger than 40 years and clinical disease course characterized by relapsing and continuous activity.

On the other hand, the protein expression of TRPV1 was increased in several types of cells in all colonic layers from severe active UC patients compared with normal colonic tissue.

This paradoxical finding between the gene and protein expression could be explained because the mRNA presence is not always related to protein expression (correlation between the RNA and protein profile is between 33 and 40% and depends on the half-life of different proteins (minutes to days) and also several mechanisms such as post-transcriptional modification, RNA transport, mRNA degradation, complex gene regulatory process, RNA processing, alternative splicing, and RNA stability). Besides, colonic samples were used to determine gene expression in the mucosa compared to protein expression that was determined by immunohistochemistry from surgical specimens with severe UC activity in all colonic layers.

These findings suggest that TRPV1 might play an important role in the pathogenesis of severe UC due to TRPV1 that was found to be overexpressed in all intestinal layers and was associated with clinical outcomes. This TRPV1 protein expression increased in all colonic layers from patients with severe active UC suggesting that upregulation is a possible defense mechanism in the colon in order to decrease bacterial invasion and inflammatory process.

UC is initiated by abnormal immune-mediated responses, mainly by  $CD4^+$  T cells to luminal microbial products and loss of peripheral tolerance in genetically susceptible individuals [13, 14]. CD is characterized as a Th1-mediated inflammatory response with overproduction of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and TNF- $\alpha$  whereas UC is considered a Th2-mediated immune disease with massive production of interleukin IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 [15]. Few papers have shown the role of TRPV family members as ion channels functionally expressed in neuronal tissue and immune cells including T cells [15, 16]. The TRPV1 channel acts as a homotetramer and heterotetramer with other TRP channel subunits [17]. Bertin et al. demonstrated that the TRPV1 channel was expressed in  $CD4^+$  T cells and increased the proinflammatory profile in murine models of IBD [18]. Mechanistically, it has been identified

that TRPV1 contributes to T cell receptor- (TCR-) induced calcium ( $Ca_2^+$ ) influx and produces phosphorylation by the lymphocyte tyrosine-protein kinase, a possible gating mechanism for the TRPV1 channel in  $CD4^+$  T cells upon TCR stimulation [19].

Massa et al. demonstrated that TRPV1 might have a protective role in IBD and other diseases such as hypertension and sepsis [8]. In the case of gastrointestinal diseases like IBD and IBS, it has been associated with a severe inflammatory response as it was found in the present study and also reported in chronic cough and arthritis [20–23].

The present study demonstrated that TRPV1 gene expression levels negatively correlated with the degree of inflammation according to IL-6 gene expression as previously reported by De Fontgalland et al. [24] where a paradoxical decrease of TRPV1 was found in the group of patients with active UC compared to normal controls.

The protein expression analysis showed that TRPV1 was importantly increased in severe active UC patients suggesting that this upregulation of TRPV1 in the protein expression of patients with severe active UC may affect nerve terminals and immune cells suggesting that TRPV1 may have an important participation in the colonic immunomodulation of the inflammatory response as well as in the pathogenesis of UC as demonstrated in a previous study [25].

By the way, Kun et al. recently reported a strong TRPV1 immunopositivity within mononuclear and plasma cells infiltrating the colonic mucosa in patients with IBD [26]. Our study also confirmed these findings where there is an increased infiltration of TRPV1+ cells with morphology suggestive of mononuclear, plasma, and T cells in the colonic mucosa of patients with severe UC. Collectively, these results suggest that high protein expression and infiltration of TRPV1-expressing cells in the colon may contribute to the pathophysiology of IBD as also reported by Akbar et al. [25].

## 5. Conclusion

A high protein expression of TRPV1 by lymphocytes and mast, endothelial, epithelial, and muscle cells was found in severe activity of UC patients suggesting the role of TRPV1

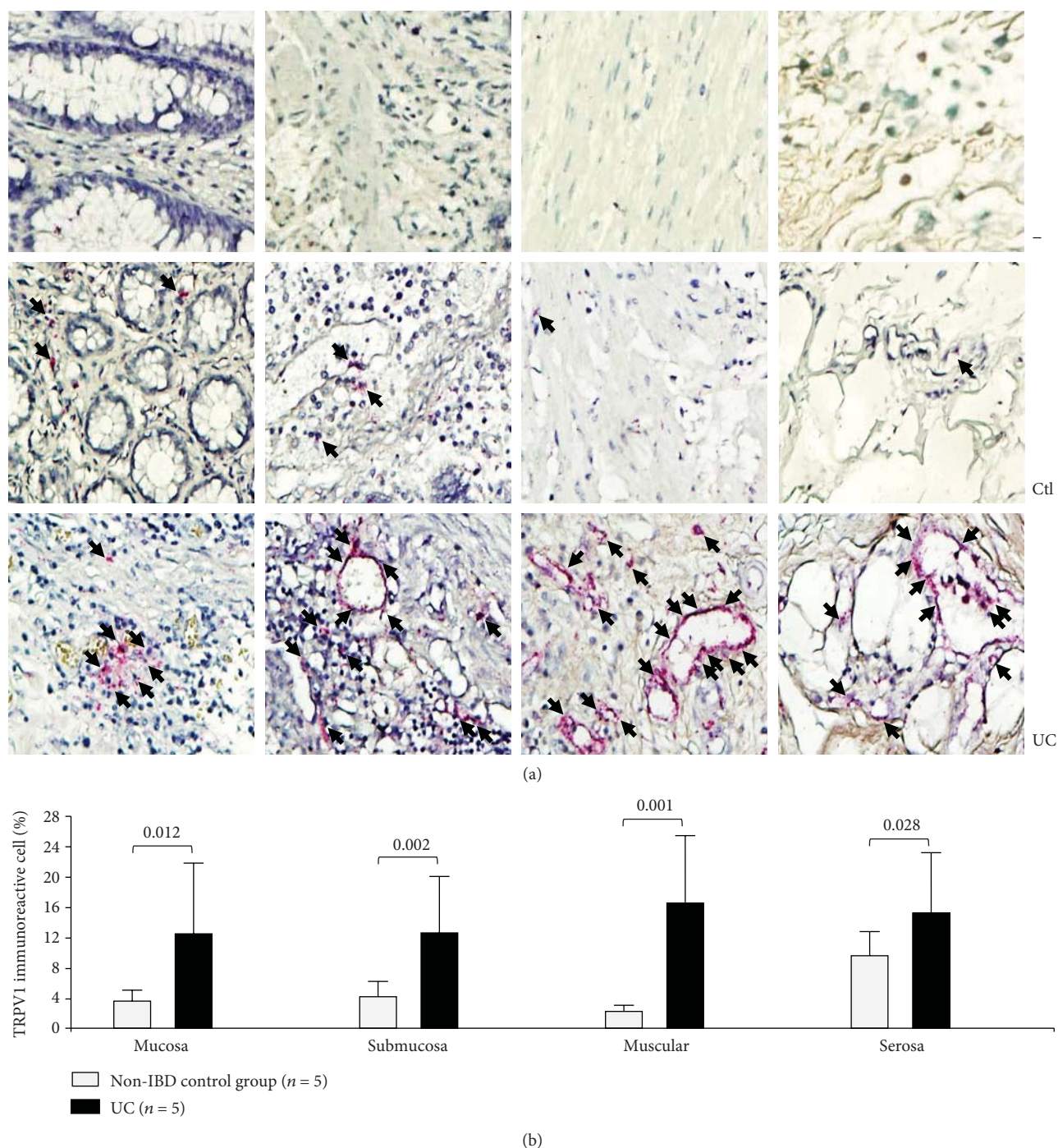


FIGURE 2: TRPV1 protein expression in colonic tissue from patients with severe ulcerative colitis and controls. Negative controls are also presented (-). (a) Representative immunoperoxidase photomicrographs of ulcerative colitis (lower panel,  $n = 5$ ) and non-IBD colonic tissue (control; upper panel,  $n = 5$ ). Arrows depict TRPV1 immunoreactive cells in mucosa, submucosa muscular, and serosa layers. Original magnification was  $\times 320$ . (b) Bars indicate percentage of TRPV1-producing cells in noninflamed colonic tissues (control,  $n = 5$ ) and active UC patients ( $n = 5$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

in the development of inflammatory process in UC patients. The presence of TRPV1 gene expression was associated with young age at diagnosis and clinical course characterized by relapsing clinical course of disease in UC patients.

### Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

The study was supported by the Inflammatory Bowel Disease Clinic, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, and PECEM (Combined Study Plan in Medicine), Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- [1] W. Strober, I. Fuss, and P. Mannon, "The fundamental basis of inflammatory bowel disease," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 3, pp. 514–521, 2007.
- [2] E. S. Kimball, N. H. Wallace, C. R. Schneider, M. R. D'Andrea, and P. J. Hornby, "Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice," *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 16, no. 6, pp. 811–818, 2004.
- [3] K. Alawi and J. Keeble, "The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 125, no. 2, pp. 181–195, 2010.
- [4] A. Messeguer, R. Planells-Cases, and A. Ferrer-Montiel, "Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor," *Current Neuropharmacology*, vol. 4, no. 1, pp. 1–15, 2006.
- [5] S.-E. Choi, T. H. Kim, S. A. Yi et al., "Capsaicin attenuates palmitate-induced expression of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by increasing palmitate oxidation and reducing c-Jun activation in THP-1 (human acute monocytic leukemia cell) cells," *Nutrition Research*, vol. 31, no. 6, pp. 468–478, 2011.
- [6] S. J. M. van Wanrooij, M. M. Wouters, L. van Oudenhove et al., "Sensitivity testing in irritable bowel syndrome with rectal capsaicin stimulations: role of TRPV1 upregulation and sensitization in visceral hypersensitivity," *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 109, no. 1, pp. 99–109, 2014.
- [7] I. Szitter, G. Pozgai, K. Sandor et al., "The role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors in dextran sulfate-induced colitis in mice," *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 42, no. 1, pp. 80–88, 2010.
- [8] F. Massa, A. Sibae, G. Marsicano, H. Blaudzun, M. Storr, and B. Lutz, "Vanilloid receptor (TRPV1)-deficient mice show increased susceptibility to dinitrobenzene sulfonic acid induced colitis," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 84, no. 2, pp. 142–146, 2006.
- [9] S. A. Riley, V. Mani, M. J. Goodman, M. E. Herd, S. Dutt, and L. A. Turnberg, "Comparison of delayed release 5-aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse," *Gut*, vol. 29, no. 5, pp. 669–674, 1988.
- [10] K. W. Schroeder, W. J. Tremaine, and D. M. Ilstrup, "Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study," *The New England Journal of Medicine*, vol. 317, no. 26, pp. 1625–1629, 1987.
- [11] M. Henriksen, J. Jahnsen, I. Lygren et al., "Ulcerative colitis and clinical course: results of a 5-year population-based follow-up study (the IBSEN study)," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 12, no. 7, pp. 543–550, 2006.
- [12] G. C. Fonseca-Camarillo, M. A. Villeda-Ramírez, F. Sánchez-Muñoz et al., "IL-6 and TNF- $\alpha$  gene expression in the rectal mucosal of patients with chronic idiopathic ulcerative colitis and controls," *Revista de Gastroenterología de México*, vol. 74, no. 4, pp. 334–340, 2009.
- [13] R. J. Xavier and D. K. Podolsky, "Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease," *Nature*, vol. 448, no. 7152, pp. 427–434, 2007.
- [14] A. Kaser, S. Zeissig, and R. S. Blumberg, "Inflammatory bowel disease," *Annual Review of Immunology*, vol. 28, no. 1, pp. 573–621, 2010.
- [15] E. C. Schwarz, M. J. Wolfs, S. Tonner et al., "TRP channels in lymphocytes," *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 179, pp. 445–456, 2007.
- [16] L. L. Nohara, S. R. Stanwood, K. D. Omilusik, and W. A. Jefferies, "Tweeters, woofers and horns: the complex orchestration of calcium currents in T lymphocytes," *Frontiers in Immunology*, vol. 6, pp. 6–234, 2015.
- [17] K. Venkatchalam and C. Montell, "TRP channels," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76, no. 1, pp. 387–417, 2007.
- [18] S. Bertin, Y. Aoki-Nonaka, P. R. de Jong et al., "The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4<sup>+</sup> T cells," *Nature Immunology*, vol. 15, no. 11, pp. 1055–1063, 2014.
- [19] S. Bertin, Y. Aoki-Nonaka, J. Lee et al., "The TRPA1 ion channel is expressed in CD4<sup>+</sup> T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1," *Gut*, vol. 66, no. 9, pp. 1584–1596, 2017.
- [20] P. Vaishnava and D. H. Wang, "Capsaicin sensitive-sensory nerves and blood pressure regulation," *Current Medicinal Chemistry Cardiovascular and Hematological Agents*, vol. 1, no. 2, pp. 177–188, 2003.
- [21] N. Clark, J. Keeble, E. S. Fernandes et al., "The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin," *The FASEB Journal*, vol. 21, no. 13, pp. 3747–3755, 2007.
- [22] D. A. Groneberg, A. Niimi, Q. T. Dinh et al., "Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 170, no. 12, pp. 1276–1280, 2004.
- [23] J. Keeble, F. Russell, B. Curtis, A. Starr, E. Pinter, and S. D. Brain, "Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 52, no. 10, pp. 3248–3256, 2005.
- [24] D. De Fontgalland, S. J. Brookes, I. Gibbins, T. C. Sia, and D. A. Wattchow, "The neurochemical changes in the innervation of human colonic mesenteric and submucosal blood vessels in ulcerative colitis and Crohn's disease," *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 26, no. 5, pp. 731–744, 2014.
- [25] A. Akbar, Y. Yiangou, P. Facer et al., "Expression of the TRPV1 receptor differs in quiescent inflammatory bowel disease with or without abdominal pain," *Gut*, vol. 59, no. 6, pp. 767–774, 2010.
- [26] J. Kun, I. Szitter, Á. Kemény et al., "Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles," *PloS One*, vol. 9, no. 9, article e108164, 2014.



## Research Article

# TRPV Subfamily (TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6) Gene and Protein Expression in Patients with Ulcerative Colitis

Joel J. Toledo Mauriño,<sup>1,2</sup> Gabriela Fonseca-Camarillo ,<sup>1</sup> Janette Furuzawa-Carballeda ,<sup>3</sup> Rafael Barreto-Zuñiga,<sup>4</sup> Braulio Martínez Benítez ,<sup>5</sup> Julio Granados ,<sup>6</sup> and Jesus K. Yamamoto-Furusho <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inflammatory Bowel Disease Clinic, Department of Gastroenterology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>MD/PhD Program (PECEM), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04360 Coyoacán, México City, Mexico

<sup>3</sup>Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Department of Endoscopy, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>5</sup>Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>6</sup>Department of Transplantation, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Jesus K. Yamamoto-Furusho; kazuofurusho@hotmail.com

Academic Editor: Francesca Santilli

Copyright © 2020 Joel J. Toledo Mauriño et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Introduction.** TRPVs are a group of receptors with a channel activity predominantly permeable to  $\text{Ca}^{2+}$ . This subfamily is involved in the development of gastrointestinal diseases such as ulcerative colitis (UC). The aim of the study was to characterize the gene and protein expression of the TRPV subfamily in UC patients and controls. **Methods.** We determined by quantitative PCR the gene expression of TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6 in 45 UC patients (29 active UC and 16 remission UC) and 26 noninflamed controls. Protein expression was evaluated in 5  $\mu\text{m}$  thick sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from 5 customized severe active UC patients and 5 control surgical specimens. **Results.** TRPV2 gene expression was increased in the control group compared with active UC and remission patients ( $P = 0.002$  and  $P = 0.05$ , respectively). TRPV3 gene expression was significantly higher in controls than in active UC patients ( $P = 0.002$ ). The gene expression of TRPV4 was significantly higher in colonic tissue from patients with remission UC compared with active UC patients ( $P = 0.05$ ) and controls ( $P = 0.005$ ). TRPV5 had significantly higher mRNA levels in a control group compared with active UC patients ( $P = 0.02$ ). The gene expression of TRPV6 was significantly higher in the colonic tissue from patients with active UC compared with the control group ( $P = 0.05$ ). The protein expression of TRPV2 was upregulated in the mucosa and submucosa from the controls compared with the UC patients ( $P \leq 0.003$ ). The protein expression of TRPV3 and TRPV4 was upregulated in all intestinal layers from the controls compared with the UC patients ( $P < 0.001$ ). TRPV5 was upregulated in the submucosa and serosa from the controls vs. UC patients ( $P < 0.001$ ). TRPV6 was upregulated in all intestinal layers from the UC patients vs. controls ( $P \leq 0.001$ ). **Conclusion.** The TRPV subfamily clearly showed a differential expression in the UC patients compared with the controls, suggesting their role in the pathophysiology of UC.

## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of diseases that comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC); both disorders are characterized by disturbances in the immune system and abnormal function of the gastrointestinal tract [1, 2]. Neuronal inflammatory pathways have also been described to be an important mechanism that participates in the development of IBD [3].

Transient receptor potential channels (TRP) constitute a distinct superfamily of ion channels and are distantly related to voltage-gated  $K^+$ ,  $Na^+$ , and  $Ca^{2+}$  superfamilies. Thus, transient receptor potential channels of the vanilloid subtype (TRPV) subfamily comprise channels critically involved in nociception and thermosensitivity (TRPV1-4), whereas TRPV5 and TRPV6 are involved mainly in  $Ca^{2+}$  absorption/reabsorption [4].

TRPV2 is activated by noxious heat ( $>53^\circ$ ), mechanic stimulus (stretching and swelling), IGF-1, HA, 2-APB, canabidiol, and probenecid [5, 6].

In a model of TRPV2-deficient mice, the severity of DSS-induced colitis was lower in macroscopic, microscopic, and immunohistochemical levels in comparison with wild-type animals [7]. These findings could be an effect from a reduced recruitment of macrophages to inflamed tissue, but it has been also suggested that they could rely on the fact that TRPV2 participates in the regulation of the number and function of Th and Tc cells [8].

TRPV3 is a channel that is highly sensitive to camphor, carvacrol, menthol, eugenol, caravel, turmoil, and by warm temperatures close to the core body temperature [9].

TRPV4 is a polymodal gated TRP channel that is activated by a diverse range of stimuli, including acidic pH, temperature, mechanical stress, the synthetic  $4\alpha$ -PPD, and arachidonic acid metabolites (epoxyeicosatrienoic acids) [10]. Fichna et al. induced colitis in mice by the intracolonic administration of TNBS, and they observed that mice treated with the TRPV4 antagonist RN1734 showed a significant protection for the development of signs of colitis [11], suggesting that TRPV4 could constitute a promising pharmacological target for IBD treatment.

The TRPV5 and TRPV6 are highly  $Ca^{2+}$ -sensitive channels. They are responsible for limiting the rate of  $Ca^{2+}$  entry into cells during transcellular  $Ca^{2+}$  reabsorption [12–14]. The functional roles of TRPV5 and TRPV6 are interconnected with each other, given that TRPV5 knockout mice upregulate their intestinal TRPV6 expression to compensate for the negative  $Ca^{2+}$  balance caused by the loss of TRPV5-mediated  $Ca^{2+}$  reabsorption in the kidney [15–17]. Changes in the expression of TRPV5 and TRPV6 could be involved in the development of IBD and bone-related extraintestinal manifestations [18].

Previously, we published a study about gene and protein expression of TRPV1 in patients with UC, which established its association with the presence of intestinal inflammation [19].

Apart from the aforementioned data, the expression and distribution of these channels in the intestine from IBD patients are still insufficiently known. For this reason, the

aim of the present study was to characterize gene and protein expression of the TRPV2-TRPV6 subfamily in patients with UC.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Patients.** We determined the gene expression of TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6 in a total of 71 patients and controls belonging to the Inflammatory Bowel Disease Clinic at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. Patients were diagnosed based on the established clinical, endoscopic, and histopathological criteria for UC and noninflammatory control subjects who underwent colonoscopy having a diagnosis of anemia under study, weight loss, or who underwent endoscopy. Individuals were divided into three groups: 29 active UC patients, 16 remission UC patients, and 26 controls.

Colon tissue specimens were evaluated by an independent GI pathologist and classified IBD histologically as being either active or inactive. Active disease was defined histologically by the presence of neutrophilic inflammation, including cryptitis and crypt abscesses. The mucosa that was uninvolved was defined as mucosa free of endoscopically and histologically active or chronic inflammation. In the case of inactive disease, chronic inflammation, crypt distortion, and/or lymphoid aggregates were common, although neutrophilic inflammation was absent.

Colonoscopy was performed for the calculus of the Mayo Score Activity Index. Disease extension was defined by colonoscopy. The disease activity was determined by Mayo Score and Riley criteria for endoscopic and histological activity, respectively, as well as a novel integral disease activity index for UC [20].

### 2.2. Tissue Samples

**2.2.1. Sample Processing and Gene Expression Analysis.** The methodology used was based on a previous study that evaluated TRPV1 role in UC patients [19]. Acquisition of colonic biopsies from noninflammatory control patients and patients affected by UC was by a punch of the colonic mucosa. Only one biopsy was obtained from each patient, and then, it was preserved in cryovial tubes with 0.5 ml of nucleic acid preserver (RNAlater<sup>®</sup>); then, they were kept on  $-70^\circ\text{C}$  until the moment of RNA extraction.

RNA was extracted (according to manufacturer's methodology) from colonic mucosa biopsies using an RNA extraction kit (Roche<sup>®</sup> High Pure RNA Tissue Kit). Homogenization of biopsies was done with a lysis buffer (1 min) and then washed using 100% ethanol. Purification was done by columns, and the mix was centrifuged ( $13.000 \times g$ , 15 s). Finally,  $50 \mu\text{M}$  of elution buffer was added to dilute total RNA.

Two hundred nanograms of total RNA was reverse transcribed into cDNA with the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics<sup>®</sup>, Mannheim, Germany).

Real-time PCR (RT-PCR) was performed using cDNA that resulted from retrotranscription as a substrate using LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master kit and LightCycler<sup>®</sup> 480

TABLE 1: Primers designs from Universal ProbeLibrary.

Gene	GeneBank	Oligonucleotides	Probe UPL
TRPV2	NM_016113.4	5' ggtgttgccctgactgga 3' 3' cagccctgctactgagaa 5'	#3
TRPV3	NM_145068.2	5' aatctcgggctggttgg 3' 3' ccaacacgaaggcttctactc 5'	#81
TRPV4*	NM_021625.4 NM_147204.2 NM_001177428.1 NM_001177431.1 NM_001177433.1	5' ccagtaggcctcatcc 3' 3' gctcctccagctgcttac 5'	#66
TRPV5	NM_019841.4	5' tggggtctgtccagaattt 3' 3' ctgccttctggagcttgt 5'	#82
TRPV6	NM_018646.2	5' gaaggagaggactcccaga 3' 3' agagccgagatgagcagaac 5'	#84
GAPDH	NM_002046.3	5' gcccaatcagccaaatcc 3' 3' agccacatcgctcagacac 5'	#60

\*Oligonucleotides were designed considering all the alternative splicing variations.

TABLE 2: Sociodemographic characterization of the patients and controls.

Clinical characteristics		Active UC (28)		Remission UC (16)		Controls (25)	
		n	%	n	%	n	%
Gender	Male	11	37.9	8	50	8	30.77
	Female	18	62.1	8	50	18	69.23
Age (median, range)		40	(24-72)	47	(16-75)	54	(23-74)
Age at diagnosis (mean, SD)		31	(6-56)	34	(9-66)		
Years of evolution (median, range)		6	(1-24)	7	(0-17)		
Extent of disease	E1	7	24.1	2	12.5		
	E2	2	6.8	1	6.3		
	E3	18	62.1	11	68.8		
	Not classifiable	2	6.9	2	12.5		
Extraintestinal manifestations	Present	10	34.5	9	56.3		
	Absent	17	58.6	5	31.3		
	Not documented	2	6.9	2	12.5		
Clinical course of disease	Initially active	11	37.9	2	12.5		
	Intermittent	1	48.2	9	56.3		
	Continuous	2	6.9	2	12.5		
	Not documented	2	6.9	3	18.8		
Medical treatment	5-ASA	26	89.7	9	56.3		
	Steroids	7	24.1	3	18.8		
	Thiopurines	4	13.8	2	12.5		
	Anti-TNF $\alpha$	1	3.4				

Multiwell Plate 96. For the amplification of the regions of interest, the reaction was made in 10  $\mu$ l. Amplification was performed under the next conditions: a denaturation program (95°C, 10 min), 45 amplification cycles (denaturation (95°C, 10s), annealing (60°C, 10s), extension (40°C, 30s), and one cooling cycle (40°C, 30s).

For the determination of gene expression (TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6) and GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase as a constitutive gene),

Light Cycler 480 (Roche Diagnostics®, Mannheim, Germany) thermocycler was used with quantitative validated assays (reproducibility and linearity), employing primers from the Universal ProbeLibrary SET (Human of Roche®) and TaqMan probes for each gene as shown in Table 1.

2.2.2. *Immunohistochemistry.* Immunohistochemical conditions (titration of primary and secondary antibodies) were standardized like in previous reports [19, 21, 22]. The

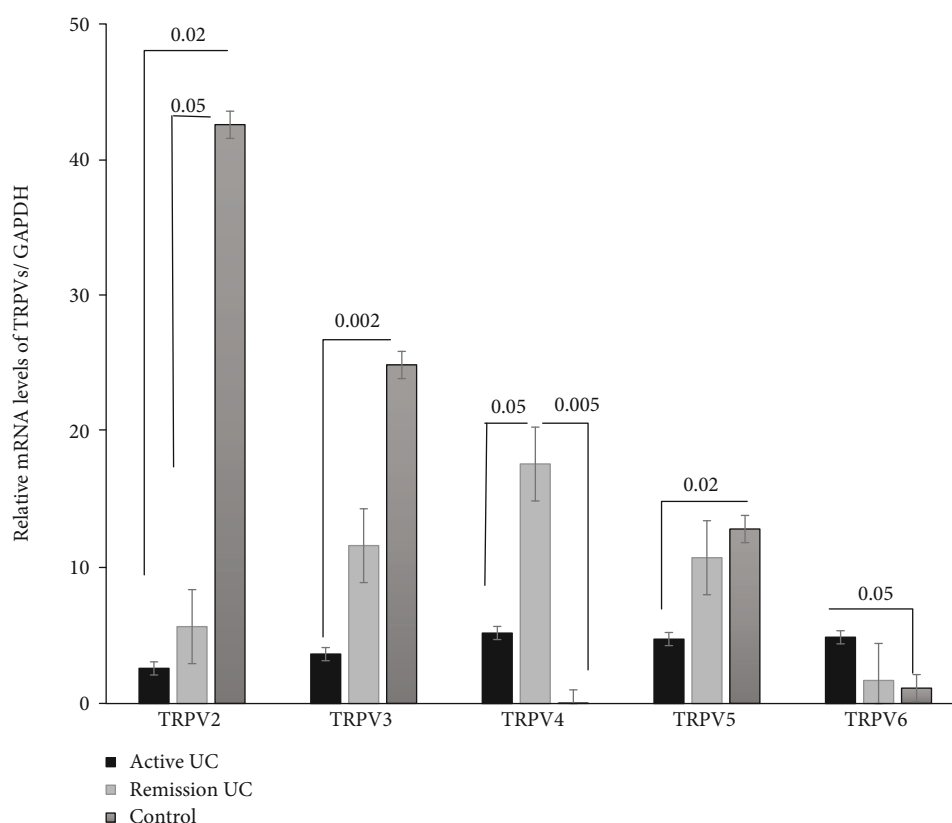


FIGURE 1: TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6 gene expression quantified by RT-PCR in colonic mucosa from patients with active and remission UC compared to non-IBD controls. Bars show mean  $\pm$  standard error of the mean of transcript levels from UC patients with GAPDH as constitutive gene determined by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . \* $P$  value  $< 0.05$  was considered as significant.

TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6 protein expression was determined on a single run, using  $5\ \mu\text{m}$  thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissue from 5 colectomized active UC patients and 5 controls with colon cancer patients (noninflamed zones were used as control tissue).

First, deparaffinization and rehydration was developed using xylene and graded alcohols. Antigen retrieval with citrate buffer and pH 6.0 during 10 min at  $100^\circ\text{C}$  was performed. Slides were washed with deionized water and then with a wash buffer. Tissues were treated with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ABC Staining System) and 10% of normal donkey serum (Santa Cruz Biotechnology), in order to block endogenous peroxidase and prevent binding of nonspecific proteins. Slides were incubated with the addition of rabbit anti-human (TRPV2, TRPV5), mouse anti-human (TRPV6), or goat anti-human (TRPV3, TRPV4) (Santa Cruz Biotechnology) diluted at  $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$  for 18 h at  $4^\circ\text{C}$ . Then, tissue specimens were incubated (60 min, room temperature) with goat anti-rabbit IgG antibody alkaline phosphatase conjugate, goat anti-mouse IgG antibody peroxidase conjugate, or donkey anti-goat IgG antibody peroxidase conjugate (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA, and Santa Cruz Biotechnology) for detection of binding. Slides were incubated with the substrate permanent red (Sigma-Aldrich Co.) for alkaline phosphatase or diaminobenzidine for peroxidase, during 10 min at room temperature. Sections were counter-

stained with Mayer's hematoxylin (Lillie's modification) (Dako, Glostrup, Denmark) and immersed into a bath of ammonia water (7 mM/l), rinsed in deionized water (2-5 min), dehydrated, and mounted employing Faramount aqueous mounting medium (Dako). Normal human serum (1:100) was used instead of primary antibody in the case of negative control staining and the IHC universal negative control reagent (specific for rabbit, mouse, and goat antibodies) (Enzo Life Sciences). For reactive blank phosphate buffer saline-egg albumin (Sigma-Aldrich) was used instead of primary antibody. Nonspecific staining of endogenous enzyme block was excluded in case of controls.

**2.3. Statistical Analysis.** Gene expression statistical analysis was performed using Dunn's test of multiple comparisons, and overlays were deleted. Results are reported as mean  $\pm$  SEM. A  $P$  value  $< 0.05$  was considered as significant.

Protein expression was evaluated by a morphometric evaluation of immune-stained sections in a blinded manner. TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6 immunopositive cells were counted in three fields at  $320\times$  and were reported as the percentage of immunoreactive cells of the inflammatory infiltrates located at the mucosa, submucosa, muscular layer, and serosa. Mean  $\pm$  SEM was reported for each case. Software used to be Image-Pro Plus v.5. Statistical analysis of continuous variables was performed by  $t$ -test and the nonparametric Mann-Whitney rank-sum test.

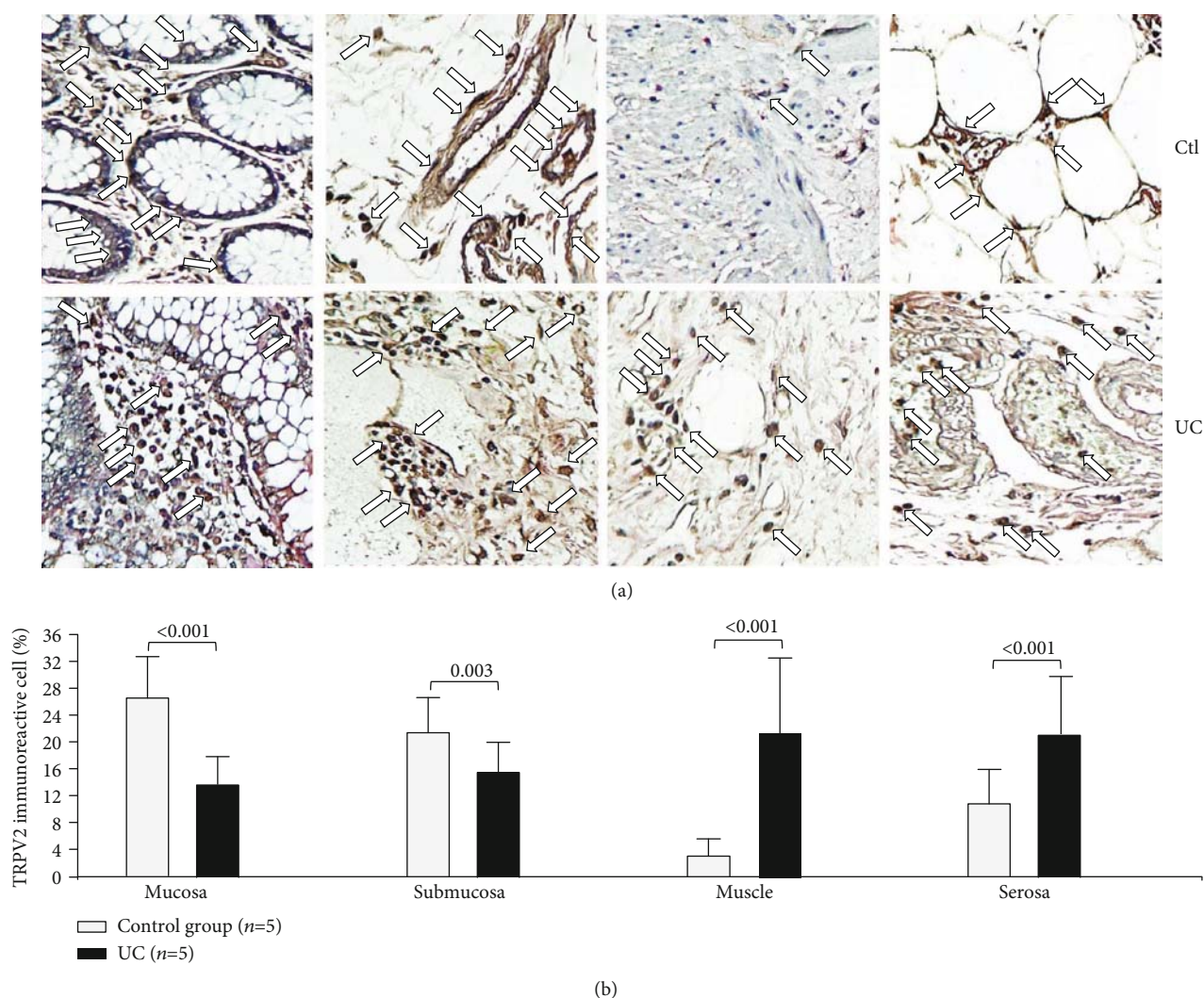


FIGURE 2: Protein expression of TRPV2 in intestinal tissue from patients with UC and controls. TRPV2 protein expression in colonic tissue samples obtained from patients with severe ulcerative colitis and noninflamed colonic tissue. (a) Immunoperoxidase photomicrographs of ulcerative colitis (lower panel,  $n = 5$ ) and non-IBD colonic tissue (control; upper panel,  $n = 5$ ). Arrows indicate TRPV2 immunoreactive cells in the mucosa, submucosa, muscular, and serosa layers. Original magnification was  $\times 320$ . (b) TRPV2-producing cell percentage in noninflamed colonic tissues (control,  $n = 5$ ) and active UC patients ( $n = 5$ ) is shown in bars.

### 3. Results

A total of 45 patients with UC (19 men and 26 women; mean age: 43.5 years) and 26 controls (8 men and 18 women; mean age: 54.0 years) were evaluated. With regard to disease activity, 29 had active disease and 16 were in remission according to Yamamoto-Furusho score. The extent of the disease was evaluated by using total colonoscopy. Biopsies were taken from different segments of colon in all cases. The Montreal classification was used to define the extent of UC: 19 had pancolitis (E3), 3 had left-sided colitis (E2), 9 had proctitis (E1), and 2 were not classifiable.

With regard to the medical treatment, 35 patients were taking sulfasalazine or 5-aminosalicylates (5-ASA), 10 were taking oral or systemic steroids, 6 were taking azathioprine, and 1 was treated with anti-TNF therapy. Sociodemographic and clinical characteristics are shown in Table 2.

**3.1. Differential Gene Expression of the TRPV Subfamily in Patients with Ulcerative Colitis.** TRPV2 gene expression was increased in the control group compared with active and remission UC patients ( $P = 0.002$  and  $P = 0.05$ ). No statistically significant difference was found among patients with active UC compared with remission patients. In the same vein, TRPV3 gene expression was significantly higher in the controls than in the active UC patients ( $P = 0.002$ ). The gene expression of TRPV4 was significantly higher in the colonic tissue from patients with remission UC compared with the active UC patients ( $P = 0.05$ ) and controls ( $P = 0.005$ ). No statistically significant difference was found among patients with active UC compared with the control group. TRPV5 has significantly higher mRNA levels in the control group compared with the active UC patients ( $P = 0.02$ ). No statistically significant differences were found between patients with remission UC compared with the active UC and control groups. Finally, TRPV6 gene expression was significantly

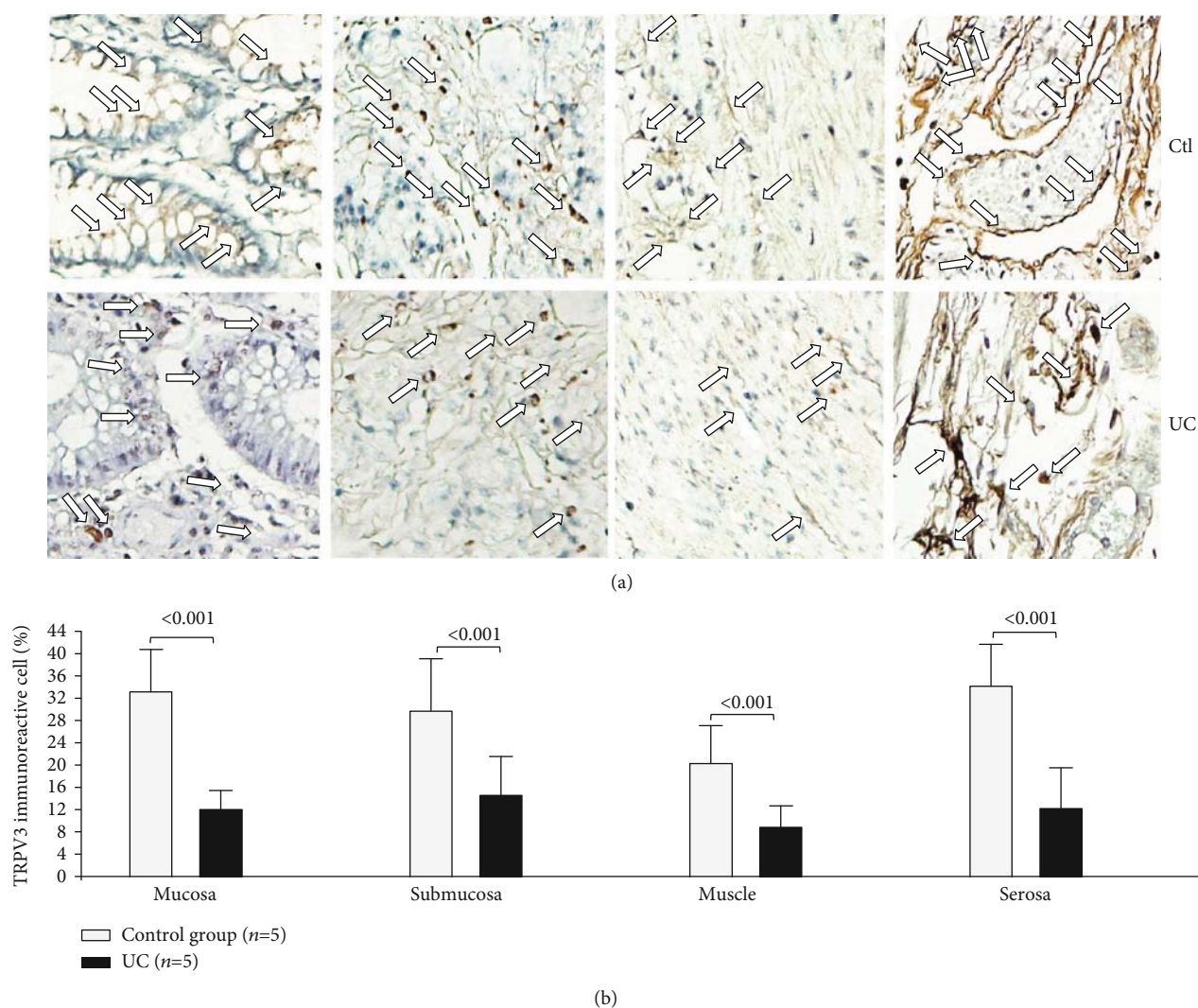


FIGURE 3: Protein expression of TRPV3 in intestinal tissue from patients with UC and controls. TRPV3 protein expression in slides with colonic tissue obtained from patients with severe ulcerative colitis and noninflamed colonic tissue. (a) Immunoperoxidase photomicrographs of ulcerative colitis (lower panel,  $n = 5$ ) and non-IBD colonic tissue (control; upper panel,  $n = 5$ ). Arrows indicate TRPV3 immunoreactive cells in the mucosa, submucosa, muscular, and serosa layers. Original magnification was  $\times 320$ . (b) TRPV3-producing cell percentage in noninflamed colonic tissues (control,  $n = 5$ ) and active UC patients ( $n = 5$ ) is shown in bars.

higher in active UC patients compared with the controls ( $P = 0.05$ ) (Figure 1).

**3.2. Protein Expression of TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6 in Patients with UC.** Histological findings of UC included expansion of chronic inflammation (lymphoplasmacytic infiltrates) in the mucosa, cryptitis that in some cases progressed to crypt abscesses, and mucosal ulceration. A shortening of the crypts and distortion of their branches, as well as irregular luminal border, were observed. A reduction of the intraepithelial mucin was also detected. In a mere morphological analysis, it was observed that mononuclear inflammatory infiltrates, enriched in lymphocytes and plasma cells, were also present in the lamina propria. In most of the cases, submucosal fibrosis was present.

The protein expression of TRPV2 was higher in the mucosa ( $P < 0.001$ ) and submucosa ( $P = 0.003$ ), but lower

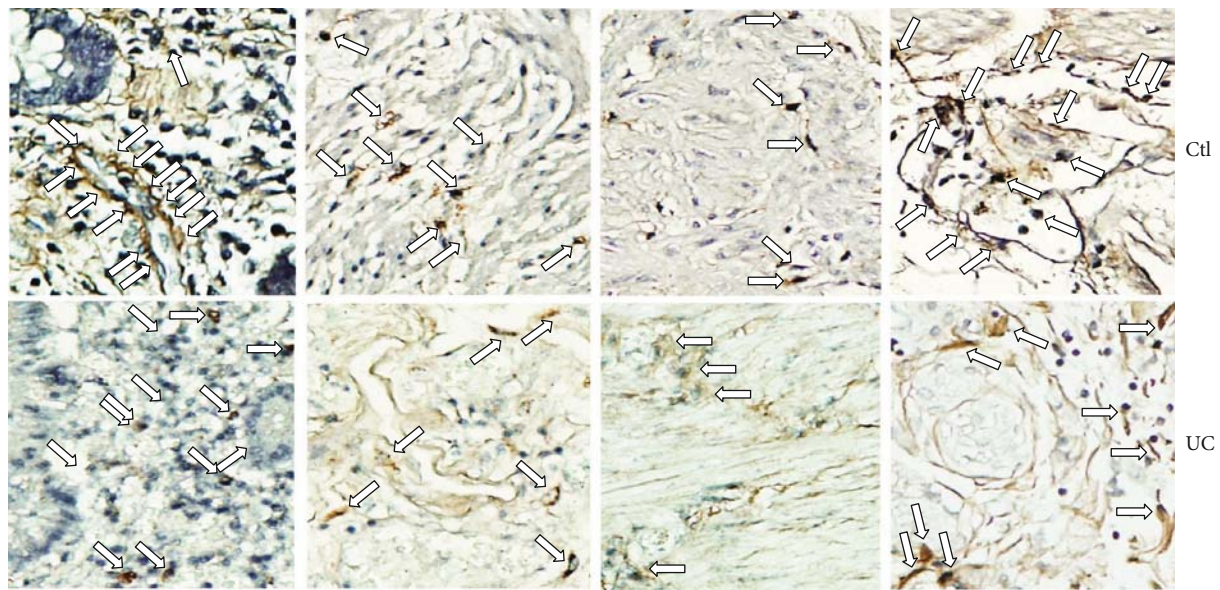
in the muscular ( $P < 0.001$ ) and cells from the serosa ( $P < 0.001$ ) in the case of the controls in comparison to patients affected by UC (Figure 2).

Detection *in situ* of TRPV3 was higher in the case of the controls in comparison to patients affected by UC across all intestinal layers (mucosa,  $P < 0.001$ ; submucosa,  $P < 0.001$ ; muscular,  $P < 0.001$ ; and serosa,  $P < 0.001$ ; Figure 3).

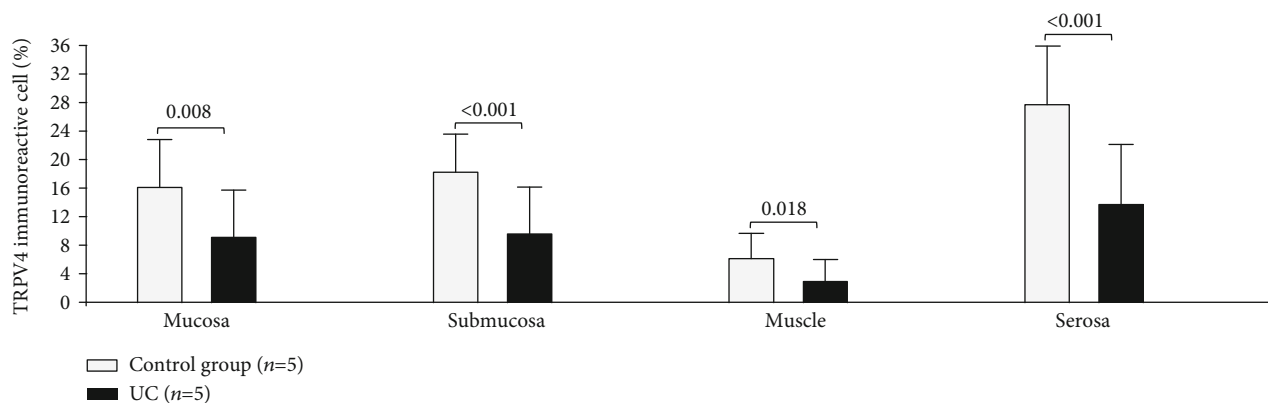
TRPV4 protein detection was lower in the mucosa ( $P = 0.008$ ), submucosa ( $P < 0.001$ ), muscular ( $P = 0.018$ ), and serosa ( $P < 0.001$ ) of UC patients compared to the control group (Figure 4).

The protein expression of TRPV5 appeared to be reduced across all intestinal layers although it was only significant in the submucosa ( $P < 0.001$ ) and serosa ( $P < 0.001$ ) in the case of the UC group in comparison to the controls (Figure 5).

The TRPV6 protein expression was higher in every intestinal layer in the case of the UC group (mucosa,  $P < 0.001$ ;



(a)



(b)

FIGURE 4: Protein expression of TRPV4 in intestinal tissue from patients with UC and controls. TRPV4 protein expression in slides with colonic tissue obtained from patients with severe ulcerative colitis and noninflamed colonic tissue. (a) Immunoperoxidase photomicrographs of ulcerative colitis (lower panel,  $n = 5$ ) and non-IBD colonic tissue (control; upper panel,  $n = 5$ ). Arrows indicate TRPV4 immunoreactive cells in the mucosa, submucosa muscular, and serosa layers. Original magnification was  $\times 320$ . (b) TRPV4-producing cell percentage in noninflamed colonic tissues (control,  $n = 5$ ) and active UC patients ( $n = 5$ ) is shown in bars.

submucosa,  $P < 0.001$ , muscular,  $P < 0.001$ ; and serosa,  $P < 0.001$ ; Figure 6).

#### 4. Discussion

The TRPV subfamily has been involved in the pathophysiology of several gastrointestinal diseases such as gastroesophageal reflux disease (GERD), nonesophageal reflux disease (NERD), and irritable bowel syndrome (IBS) [17, 18].

Thus, in this study, we determined the gene and protein expression of the other members of the TRPV subfamily, in order to provide the characterization of these receptors in patients with active and remission UC.

Interestingly, the gene expression of TRPV2-5 was decreased in patients with active UC compared to the group of UC in remission and controls without intestinal inflammation.

Previously, we published a study about gene and protein expression of TRPV1 in which its association with the presence of intestinal inflammation was described [19]. Thus, in the present study, we determined the gene and protein expression of other members of the TRPV subfamily, in order to provide the characterization of these receptors in patients with active and remission UC [19].

In the case of TRPV2, the control group showed higher levels of TRPV2 gene expression compared to the active UC patients. While in the protein expression analysis, the internal layers of the intestine had an increased expression of TRPV2 in the mucosa ( $P < 0.001$ ) and submucosa ( $P = 0.003$ ) but lower in the muscular ( $P < 0.001$ ) and serosa ( $P < 0.001$ ) in the case of the controls in comparison to patients affected by UC. According to this result, a previous study also reported increased TRPV channel protein expression in mucosa epithelial cells of

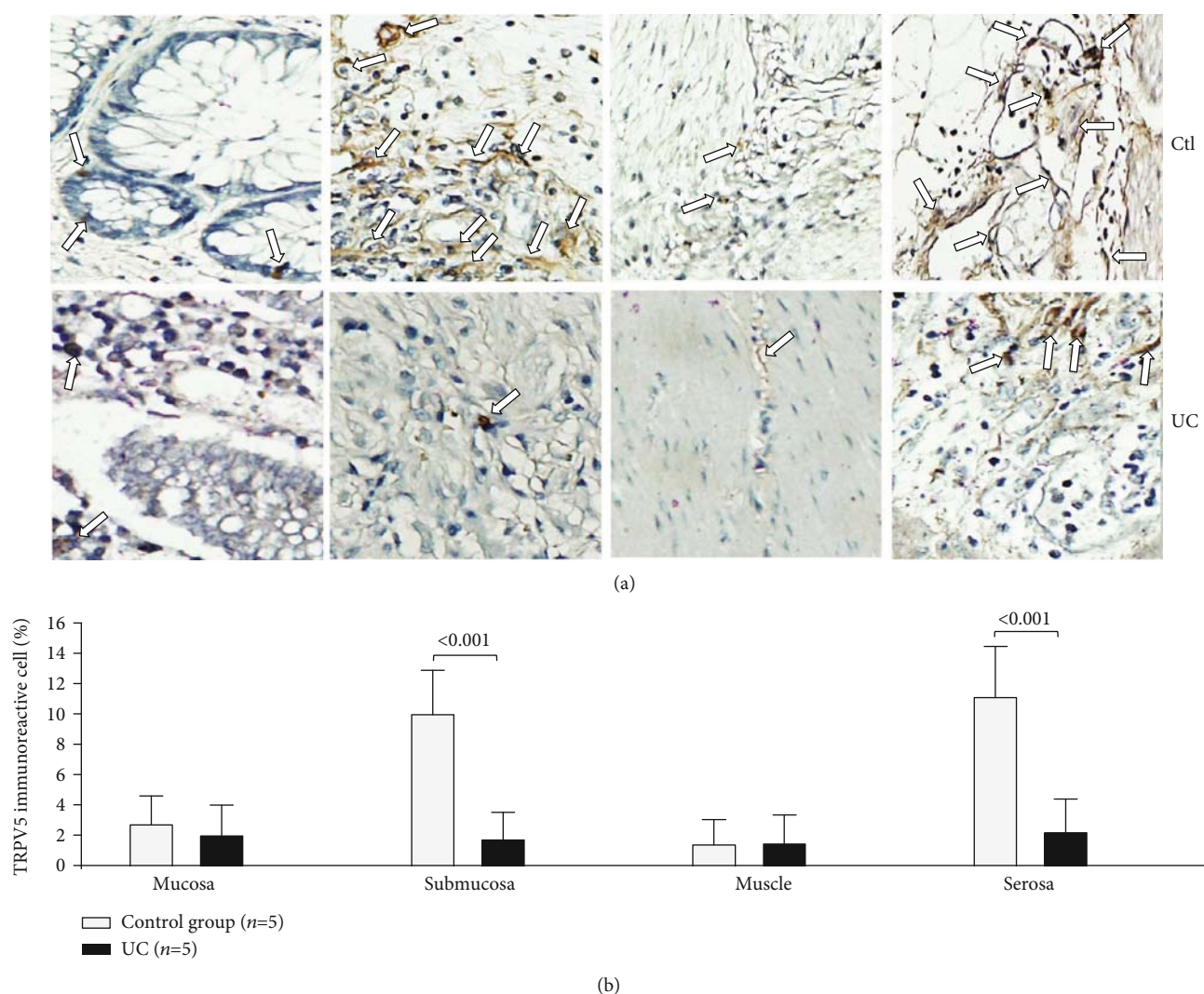


FIGURE 5: Protein expression of TRPV5 in intestinal tissue from patients with UC and controls. TRPV5 protein expression in slides with colonic tissue obtained from patients with severe ulcerative colitis and noninflamed colonic tissue. (a) Immunoperoxidase photomicrographs of ulcerative colitis (lower panel,  $n=5$ ) and non-IBD colonic tissue (control; upper panel,  $n=5$ ). Arrows indicate TRPV5 immunoreactive cells in the mucosa, submucosa muscular, and serosa layers. Original magnification was  $\times 320$ . (b) TRPV5-producing cell percentage in noninflamed colonic tissues (control,  $n=5$ ) and active UC patients ( $n=5$ ) is shown in bars.

non-IBD control samples and UC patients [23]. Furthermore, in mice with DSS-induced colitis model, higher TRPV2 gene expression was associated with higher degrees of intestinal inflammation [7]. Regarding protein expression, such results could be related to a lower level of expression of TRPV2 by lymphoid cells, since the main cellular sources found in previous studies are T-cell lymphocytes in which the receptor shows a direct interaction with T-cell receptor and macrophages [23, 24]. TRPV2 activation has been associated with the production of IL-6 and IL-8, but such production is not documented in the case of the gastrointestinal tract [25].

Specific implications of TRPV3 in the gastrointestinal tract have not been explored. Nonetheless, this study has demonstrated that gene and protein TRPV3 downregulated expression was associated with disease activity, as previously reported by Rizopoulos et al. [23]. TRPV3 has already been

proposed as a relevant mechanism for gastrointestinal inflammation, but there are still no studies about specific pathways [26].

Interestingly, the gene expression of TRPV4 in patients with UC in the remission and control groups was increased in comparison with active UC. The above information suggests that a high expression of TRPV4 could be related with a healthy colon state.

Conversely, in other studies, TRPV4 upregulation was associated with the presence of inflammation in UC patients and in colitis model mice [23, 27, 28], where the TRPV4 channel could increase the vascular permeability in colonic inflammation. TRPV4 might be involved in the production of IL-6 and IL-8 via ATP release for the development of inflammation [29].

In addition, the lack of TRPV5 appears to be correlated with the induction of UC. Radhakrishnan et al. [30] have



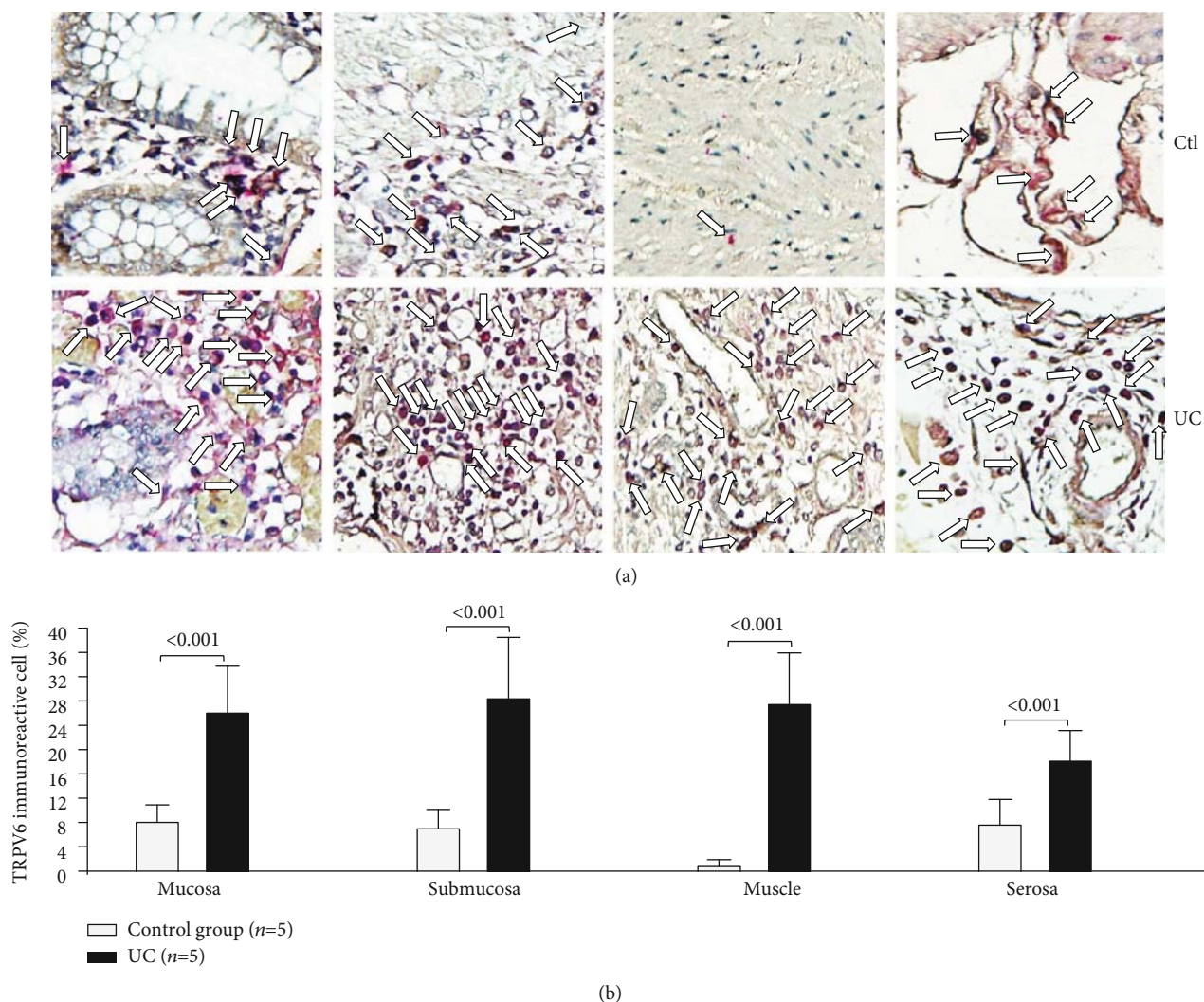


FIGURE 6: Protein expression of TRPV6 in intestinal tissue from patients with UC and controls. TRPV6 protein expression in slides with colonic tissue obtained from patients with severe ulcerative colitis and noninflamed colonic tissue. (a) Immunoperoxidase photomicrographs of ulcerative colitis (lower panel,  $n = 5$ ) and non-IBD colonic tissue (control; upper panel,  $n = 5$ ). Arrows indicate TRPV6 immunoreactive cells in the mucosa, submucosa muscular, and serosa layers. Original magnification was  $\times 320$ . (b) TRPV6-producing cell percentage in noninflamed colonic tissues (control,  $n = 5$ ) and active UC patients ( $n = 5$ ) is shown in bars.

demonstrated that TRPV5 channel expression at the renal tissue was involved in bone loss in experimental colitis. The plausible mechanism by which this TRPV5 channel could be involved in the intestinal inflammation is the activation of internalization of this channel via clathrin-dependent endocytosis to enter  $\text{Ca}^{2+}$  controlled by recycling cascades, but this mechanism has not yet been characterized in patients with UC [31].

It has been demonstrated that TRPV6 is particularly involved in the first step in calcium absorption in the intestine [32, 33]. This study has shown high gene and protein expression in all intestinal layers from UC patients, and it appears to be clearly related to disease activity.

Mechanistic studies required to reveal more clearly the implications of this subfamily in the pathophysiology of UC.

This transversal study is limited to Mexican population, and since diet is related to the function and expression of these channels, further studies in other populations with a bigger number of individuals are needed and also with a pertinent characterization of dietary patterns. Moreover, translational studies in UC are required since there is some evidence that TRPV subfamily members could play a role in the pathogenesis of intestinal inflammation in murine models, as well as human IBD.

## 5. Conclusion

The TRPV2-6 channels clearly showed a differential expression in UC patients compared to the controls, suggesting a possible role in the development of intestinal inflammation in UC patients. The description of TRPV 2-TRPV 6

expression is the first of its kind and may lay the groundwork for future investigations focused on the role of these channels in IBD.

## Abbreviations

$\mu\text{m}$ :	Micrometer
2-APB:	2-Amino diphenyl borate
4 $\alpha$ -PPD:	Phorbol ester 4 $\alpha$ phorbol 12,13-didecanoate
ANOVA:	Analysis of variance
Ca <sup>2+</sup> :	Calcium
CD:	Crohn's disease
DSS:	Dextran sulphate sodium
g:	Gravity
GI:	Gastrointestinal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hydrogen peroxide
HA:	Heat activator
IBD:	Inflammatory bowel disease
IGF-1:	Insulin-like growth factor 1
IgG:	Immunoglobulin G
IHC:	Immunohistochemistry
K <sup>+</sup> :	Potassium
min:	Minute
ml:	Milliliter
mRNA:	Messenger ribonucleic acid
pH:	Potential hydrogen
Na <sup>+</sup> :	Sodium
RNA:	Ribonucleic acid
RT-PCR:	Real-time polymerase chain reaction
s:	Second
SD:	Standard deviation
Tc:	T-cytotoxic
Th:	T-helper
TNBS:	Trinitro benzene sulphononic acid
TRPV:	Transient receptor potential vanilloid
UC:	Ulcerative colitis.

## Data Availability

Data will be provided based on requirement.

## Ethical Approval

The study was approved by the ethical committee of Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

## Conflicts of Interest

The authors declare they have no competing interests.

## Acknowledgments

This study was supported by the Inflammatory Bowel Disease Clinic, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán and MD/PhD Program PECEM, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- [1] J. Braun and B. Wei, "Body traffic: ecology, genetics and immunity in inflammatory bowel disease," *Annual Review of Pathology*, vol. 2, pp. 401–429, 2007.
- [2] E. S. Kimball, N. H. Wallace, C. R. Schneider, M. R. D'Adrea, and P. J. Hornby, "Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice," *Neurogastroenterology & Motility*, vol. 16, no. 6, pp. 811–818, 2004.
- [3] S. E. Lakhan and A. Kirchgessner, "Neuroinflammation in inflammatory bowel disease," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 7, no. 1, article 37, 2010.
- [4] K. Venkatachalam and C. Montell, "TRP channels," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 76, pp. 387–417, 2007.
- [5] M. J. Caterina, T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake, and D. Julius, "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat," *Nature*, vol. 398, no. 6726, pp. 436–441, 1999.
- [6] N. Qin, M. P. Neepker, Y. Liu, T. L. Hutchinson, M. L. Lubin, and C. M. Flores, "TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons," *The Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 24, pp. 6231–6238, 2008.
- [7] C. M. Issa, B. D. Hambly, Y. Wang et al., "TRPV2 in the development of experimental colitis," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 80, no. 5, pp. 307–312, 2014.
- [8] G. Santoni, V. Farfariello, S. Liberati et al., "The role of transient receptor potential vanilloid type-2 ion channels in innate and adaptive immune responses," *Frontiers in Immunology*, vol. 4, p. 34, 2013.
- [9] H. Lee and M. J. Caterina, "TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells," *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, vol. 451, no. 1, pp. 160–167, 2005.
- [10] B. Nilius, J. Vriens, J. Prenen, G. Droogmans, and T. Voets, "TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity," *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, vol. 286, no. 2, pp. C195–C205, 2004.
- [11] J. Fichna, A. Mokrowiecka, A. I. Cygankiewicz et al., "Transient receptor potential vanilloid 4 blockade protects against experimental colitis in mice: a new strategy for inflammatory bowel diseases treatment," *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 24, no. 11, pp. e557–e560, 2012.
- [12] J. G. Hoenderop, B. Nilius, and R. J. Bindels, "Molecular mechanism of active Ca<sup>2+</sup> reabsorption in the distal nephron," *Annual Review of Physiology*, vol. 64, pp. 529–549, 2002.
- [13] J. G. Hoenderop, R. Vennekens, D. Muller et al., "Function and expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2," *The Journal of Physiology*, vol. 537, pp. 747–761, 2001.
- [14] M. K. C. van Goor, J. G. J. Hoenderop, and J. van der Wijk, "TRP channels in calcium homeostasis: from hormonal control to structure- function relationship of TRPV5 and TRPV6," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1864, no. 6, pp. 883–893, 2017.
- [15] T. Suzuki, C. P. Landowski, and M. A. Hediger, "Mechanisms and regulation of epithelial Ca<sup>2+</sup> absorption in health and disease," *Annual Review of Physiology*, vol. 70, no. 1, pp. 257–271, 2008.
- [16] T. E. Hughes, J. S. Del Rosario, A. Kapoor et al., "Structure-based characterization of novel TRPV5 inhibitors," *eLife*, vol. 8, article e49572, 2019.

- [17] J. Van der Wijst, M. K. Van Goor, M. F. Schreuder, and J. G. Hoenderop, "TRPV5 in renal tubular calcium handling and its potential relevance for nephrolithiasis," *Kidney International*, vol. 96, no. 6, pp. 1283–1291, 2019.
- [18] M. R. Beggs, J. J. Lee, K. Busch et al., "TRPV6 and  $Ca_v1.3$  mediate distal small intestine calcium absorption before weaning," *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, vol. 8, no. 4, pp. 625–642, 2019.
- [19] J. J. Toledo-Mauriño, J. Furuzawa-Carballeda, M. A. Villeda-Ramírez et al., "The transient receptor potential vanilloid 1 is associated with active inflammation in ulcerative colitis," *Mediators of Inflammation*, vol. 2018, Article ID 6570371, 7 pages, 2018.
- [20] J. K. Yamamoto-Furusho, K. E. Bozada-Gutiérrez, A. Sánchez-Rodríguez, F. Bojalil-Romano, R. Barreto-Zuñiga, and B. Martínez-Benitez, "Validation of a novel integral disease index for evaluating the grade of activity in Mexican patients with ulcerative colitis: a prospective cohort study," *Revista de Gastroenterología de México*, vol. 84, no. 3, pp. 317–325, 2019.
- [21] F.-C. Gabriela, J. Furuzawa-Carballeda, J. Granados, and J. K. Yamamoto-Furusho, "Expression of interleukin (IL)-19 and IL-24 in inflammatory bowel disease patients: a cross-sectional study," *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 177, no. 1, pp. 64–75, 2014.
- [22] J. K. Yamamoto-Furusho, I. Ascaño-Gutiérrez, J. Furuzawa-Carballeda, and G. Fonseca-Camarillo, "Differential expression of MUC12, MUC16, and MUC20 in patients with active and remission ulcerative colitis," *Mediators of Inflammation*, vol. 2015, Article ID 659018, 8 pages, 2015.
- [23] T. Rizopoulos, H. Papadaki-Petrou, and M. Assimakopoulou, "Expression profiling of the transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels 1,2,3 and 4 in mucosal epithelium of human ulcerative colitis," *Cell*, vol. 7, no. 6, p. 61, 2018.
- [24] J. E. Qualls, A. M. Kaplan, N. van Rooijen, and D. A. Cohen, "Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 80, no. 4, pp. 802–815, 2006.
- [25] G. Y. Son, J. H. Hong, I. Chang, and D. M. Shin, "Induction of IL-6 and IL-8 by activation of thermosensitive TRP channels in human PDL cells," *Archives of Oral Biology*, vol. 60, no. 4, pp. 526–532, 2015.
- [26] L. De Petrocellis, P. Orlando, A. S. Moriello et al., "Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation," *Acta Physiologica*, vol. 204, no. 2, pp. 255–266, 2012.
- [27] E. D'aldebert, N. Cenac, P. Rousset et al., "Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice," *Gastroenterology*, vol. 140, no. 1, pp. 275–285.e3, 2011.
- [28] K. Matsumoto, R. Yamaba, K. Inoue et al., "Transient receptor potential vanilloid 4 channel regulates vascular endothelial permeability during colonic inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis," *British Journal of Pharmacology*, vol. 175, no. 1, pp. 84–99, 2018.
- [29] A. Ohsaki, S. I. Tanuma, and M. Tsukimoto, "TRPV4 channel-regulated ATP release contributes to  $\gamma$ -irradiation-induced production of IL-6 and IL-8 in epidermal keratinocytes," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 41, no. 10, pp. 1620–1626, 2018.
- [30] V. M. Radhakrishnan, R. Ramalingam, C. B. Larmonier, R. D. Thurston, and D. Laubitz, "Post-Translational Loss of Renal TRPV5 Calcium Channel Expression,  $Ca^{2+}$  Wasting, and Bone Loss in Experimental Colitis," *Gastroenterology*, vol. 145, no. 3, pp. 613–624, 2013.
- [31] S. F. Van de Graaf, U. Rescher, J. G. Hoenderop, S. Verkaart, R. J. Bindels, and V. Gerke, "TRPV5 is internalized via clathrin-dependent endocytosis to enter a  $Ca^{2+}$  controlled recycling pathway," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 7, pp. 4077–4086, 2008.
- [32] M. Skrzypski, N. Khajavi, S. Mergler et al., "TRPV6 channel modulates proliferation of insulin secreting INS-1E beta cell line," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1853, no. 12, pp. 3202–3210, 2015.
- [33] E. C. Schwarz, U. Wissenbach, B. A. Niemeyer et al., "TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation," *Cell Calcium*, vol. 39, no. 2, pp. 163–173, 2006.