



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGULACIÓN DEL CANAL TRPV1 POR EFECTO
DEL RECEPTOR SIGMA 1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

REBECA JUÁREZ CONTRERAS



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SARA LUZ MORALES LÁZARO
2016**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Con amor a mis padres

Agradecimientos.

A la UNAM por convertirse en mi hogar.

A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro por dirigir este proyecto.

Al comité tutorial formado por: Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dr. Ricardo González Ramírez, Bióloga Teresa Montiel Montes y al M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo por su asesoría y contribuciones a este trabajo.

A la Dra. Tamara Rosenbaum Emir por permitir el uso del laboratorio donde se realizó este trabajo y por sus sugerencias a este trabajo.

A la Biol. Alejandra Llorente Gil por su apoyo técnico para el desarrollo de este proyecto.

Al Laboratorista Félix Sierra Ramírez por su apoyo técnico.

A los miembros del laboratorio por su contribución a este trabajo Miguel Ortíz Rentería y Ameyalli Gómez Ilescas.

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

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

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

Este proyecto fue financiado por el Programa de la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGPA)-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IA202815.

De forma personal quiero agradecer primero a Dios, por todo lo que representa para mí y por poner en mi vida a personas maravillosas que me convierten en lo que soy.

A mi familia, que amo con todo mi corazón y que me ha dado todo. Mis padres que me han enseñado la importancia del respeto, la justicia, la compasión y el valor del trabajo. A mis hermanos por guiarme, ser mis amigos, compañeros y mis primeros maestros.

A la tía Caro por el apoyo que me ha brindado toda la vida y por ser miembro de mi familia.

A Lorena por lo que me ha enseñado.

A Isaac, por influir de tantas formas en mi vida, porque su apoyo incondicional y su confianza.

A los miembros del laboratorio, la Dra. Sara por su paciencia, su apoyo y por todo lo que me ha enseñado, a la Dra. Tamara por la confianza de permitirme ocupar el laboratorio, a Alejandra por su consejo y apoyo, a Félix por sus observaciones, a Miguel y Ameyalli por su amistad. Gracias a todos por hacer de este proceso una experiencia que recordare siempre con mucho cariño.

A los amigos que no podría contar y que me acompañaron en mi formación académica, a los profesores que participaron de la misma.

Gracias a los que me acompañaron en los momentos buenos y sobre todo que se quedaron conmigo en los momentos malos.

Índice.

Resumen.	1
1. Introducción.	2
1.1. Canales iónicos.	2
1.2. Canales TRP.	3
1.3. TRPV1.	4
1.4. σ 1R.	8
2. Hipótesis.	13
3. Objetivos	13
3.1. Objetivo general.	13
3.2. Objetivos particulares.	13
4. Materiales y métodos.	14
Cultivo celular.	14
Extracción de ARN total.	14
RT-PCR (Reverse transcription-Polimerase Chain Reaction).	15
Transfección.	18
Tratamientos con inhibidores del σ 1R.	19
Obtención de proteína total.	20
Cuantificación de proteína.	20
Obtención de tejidos.	21
Inmunodetección de proteínas en fase sólida (Western blot).	21
Biotinilación.	25
Inmunoprecipitación.	26
Inmunocitoquímica.	28
Evaluación de la corrección de la fluorescencia celular total (CTCF).	29
Tratamientos con inhibidores de las vías de degradación de proteínas	29
Conducta.	30
Pretratamiento de 24 h.	31
Proceso de datos.	31
5. Resultados.	32
5.1. Expresión del Receptor Sigma 1 (σ 1R) en Sistema de expresión endógeno y transitorio del canal TRPV1.	32
5.2. Inhibición de σ 1R y su efecto sobre el canal TRPV1.	33
5.3. El antagonismo de σ 1R altera los niveles de TRPV1 en membrana plasmática.	35
5.4. Evaluación de la posible interacción entre el canal TRPV1 y σ 1R.	37
5.5. El antagonismo de σ 1R promueve la degradación del canal TRPV1.	40
5.6. El antagonismo del σ 1R en el sistema de expresión endógeno afecta la nocicepción mediada por el canal TRPV1.	41
6. Discusión.	44
7. Conclusiones.	48
8. Perspectivas del proyecto.	49
9. Bibliografía.	50

Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

BiP: Proteína de unión a inmunoglobulinas (*Binding immunoglobulin protein*).

BD: BD 1063 o 1-[2-etil]-4-metilpiperazina.

BSA: Albumina de suero bovino.

D10: Medio de cultivo DMEM complementado con suero fetal bovino al 10%.

DMSO: Dimetil sulfoxido.

DRG: Ganglios de la raíz dorsal (*Dorsal root ganglion*).

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal B ovine Serum*).

F11: Línea celular de un hibridoma por fusión de DRG de rata con neuroblastoma de ratón.

GAPDH: Gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa.

HEK293: Línea celular de células de riñón de embrión humano (*Human embryonic kidney*).

IgG: Inmunoglobulinas.

IP: Inmunoprecipitado.

KO- σ 1R: Ratones transgénicos que no expresan a σ 1R.

ON: Durante toda la noche (*Over night*).

PBS: Buffer de fosfatos.

PBST: PBS adicionado con tween 20.

PKA: Proteína cinasa A.

PKC: Proteína cinasa C.

PT: Proteínas totales solubilizadas.

PM: Proteínas de membrana.

PVDF: Polivinilideno fluorido.

Ratón KO: Ratones transgénicos que no expresan una proteína.

RE: Retículo endoplásmico.

σ 1R: Receptor no opioide sigma 1.

TG: Ganglio trigémino (*trigemin ganglion*).

TRP: Receptor de potencial transitorio (*Transient Receptor Potential*).

TRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide subtipo 1 (*transcient recep tor potential vaniloid 1*).

rTRPV1: Canal TRPV1 de rata.

hTRPV1: Canal TRPV1 de humano.

Vh: vehículos.

Resumen.

El canal TRPV1 es importante para la comunicación entre la célula y el ambiente al servir como un receptor polimodal capaz de responder a condiciones nocivas; dada su participación en enfermedades con dolor crónico se han identificado numerosos agonistas al canal, sin embargo, se conocen pocos antagonistas, así mismo los estudios que buscan entender la regulación de la expresión del TRPV1 y su interacción con otras proteínas son escasos a pesar del potencial de este campo de investigación; en este sentido recientemente se ha propuesto que existe relación entre el dolor mediado por el canal TRPV1 y la chaperona llamada receptor sigma 1 (σ 1R). El σ 1R es la única chaperona capaz de interactuar y regular a numerosas proteínas ya que participa en diversos procesos celulares, entre los que destaca la nocicepción. Se ha reportado que ratones KO- σ 1R sensibilizados con capsaicina muestran menor dolor que los animales silvestres y de forma semejante en un modelo de inducción de migraña en ratas se encontró que la administración de un antagonista específico para el σ 1R disminuye el dolor inducido por la capsaicina, esto forma la base para considerar que existe una estrecha relación entre el canal TRPV1 y el σ 1R, sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios para explicar los mecanismos moleculares implicados. En el presente trabajo se propuso demostrar si el σ 1R actúa como un regulador importante del canal TRPV1 capaz de influir en la detección de estímulos nocivos y la generación de la respuesta de dolor, para lo cual se exploró el mecanismo implicado en la relación σ 1R-TRPV1. Inicialmente se demostró la expresión del σ 1R a nivel de ARNm y de proteína en ganglios de la raíz dorsal y ganglios del trigémino (sistemas de expresión endógena del canal TRPV1) y en las líneas celulares HEK293 y F11. Posteriormente se evaluó el efecto de la inhibición del σ 1R sobre los niveles proteicos totales del canal TRPV1 y de superficie celular, observándose disminución de los niveles proteicos del canal por la incubación por 24 h con el antagonista del σ 1R, independientemente de la especie de origen del canal (rata, ratón y humano). Al indagar sobre la relación de ambas proteínas no se encontró una clara evidencia de interacción o de colocalización entre TRPV1 y el σ 1R en condiciones basales. Se determinó que la disminución de los niveles de proteína del canal por la incubación con el antagonista del σ 1R es consecuencia de la degradación por la vía del proteosoma. Finalmente y de forma importante se encontró que el antagonista del σ 1R tiene efecto en los niveles de proteína de TRPV1 en el sistema de expresión endógeno del canal (DRG de ratón) e incluso afecta la nocicepción de los animales 24 h después de la inyección subcutánea, disminuyendo el dolor por la inyección intradérmica de capsaicina.

La modulación del dolor a través del canal TRPV1 y su asociación con proteínas como la chaperona σ 1R, con lo cual se abre un campo de investigación que apenas comienza a dilucidarse.

1. Introducción.

El estudio de los mecanismos que permiten la interacción entre los organismos y el medio requiere del acercamiento a la célula, por ser la unidad morfológica y funcional de los organismos vivos. Toda célula requiere del intercambio constante de materia y energía, dependiendo de factores como las señales que se reciben (aferencias), los centros de proceso de la información y las respuestas generadas (eferencias) por efecto del estímulo; la dinámica celular depende de la membrana plasmática, una bicapa de fosfolípidos cuyas cabezas hidrofílicas se posicionan hacia el medio externo o hacia el citosol mientras que las colas hidrofóbicas se disponen en una región lipofílica (Cooper, 2000). Las interacciones, composición y abundancia de los componentes de la membrana, por ejemplo los fosfolípidos presentes participan en procesos que impactan en la supervivencia (Saucedo-García *et al.*, 2011) y en conjunto con las proteínas proporcionan identidad y funcionalidad celular (Voet *et al.*, 2009).

La membrana plasmática actúa como la barrera que mantiene la diferencia de cargas entre el espacio intracelular y extracelular, gracias a su permeabilidad selectiva que permite el paso sólo a moléculas hidrófobas pequeñas y a moléculas polares pequeñas no cargadas, resulta levemente permeable al agua así como a la urea, pero es impermeable a los iones y moléculas polares por lo cual su incorporación requiere de otros elementos como proteínas de transporte o bien de canales iónicos a través de los cuales pasar (Cooper, 2000; Lodish *et al.*, 2005).

1.1. Canales iónicos.

Los canales iónicos son poros macromoleculares selectivos que regulan el gradiente electroquímico al actuar como compuertas de flujo principalmente para los iones Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Cl^- (Muñiz *et al.*, 1996). Típicamente se describe que dichos canales presentan un estado cerrado en el que no hay paso de iones y uno abierto donde si existe el flujo (Cooper, 2000), aunque existen otros estados intermedios entre la apertura y el cierre (Hille, 2001).

El gradiente electroquímico es diferente en ambos lados de la membrana lo que establece el potencial de membrana, por la mayor concentración de iones positivos en uno de los lados. Este voltaje se mantiene gracias a la difusión pasiva de iones a través de canales iónicos que pueden ser regulados por ligandos, voltaje, temperatura o estrés mecánico (por ejemplo la presión sobre la piel), entre otros; estos estímulos abren el poro durante milisegundos en los que se genera un flujo rápido de iones que cambia el potencial de membrana y genera la señal eléctrica que se transmite

a otras células, ya que se dispara el transporte activo para recuperar el gradiente de concentración, este mecanismo es crucial en sistemas excitables como el nervioso y el muscular (Wilson *et al.*, 2007). Los cambios en el potencial de acción pueden también inducir cambios en la zona presináptica donde, en el caso de las sinapsis químicas, se liberan neurotransmisores, moléculas capaces de transmitir información de una neurona a otra (Purves *et al.*, 2001).

En el sistema nervioso, en particular en las neuronas, la apertura de canales iónicos que comunican al sistema nervioso periférico con el sistema nervioso central influye en la sobrevivencia del organismo pues este mecanismo controla procesos como la contracción de fibras musculares, la secreción de neurotransmisores, neurohormonas, enzimas digestivas así como otras funciones (Hille, 2001).

1.1. Canales TRP.

Entre los canales iónicos implicados en la percepción del medio se ha destacado el estudio de la familia de los canales TRP (*Transient Receptor Potential*); estos sensores se consideran polimodales ya que pueden responder a estímulos de tipo térmico, químico, mecánico y osmótico, (Moran *et al.*, 2004) y están conservados desde los nemátodos hasta los vertebrados (Christensen y Corey, 2007; Nilius y Flockerzi, 2014).

Los canales TRP median el flujo de cationes por lo que regulan los niveles de Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, distribuyéndose en diferentes células excitables y no excitables (Ramsey *et al.*, 2006). Esta familia de canales fue descrita a partir de una mutante de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, en la que se observó la presencia de canales iónicos que estimulados por la luz respondían de manera transitoria (Minke, 1977). Actualmente se reconoce como parte de este grupo a 28 miembros (27 presentes en mamíferos) que se dividen de acuerdo a la homología entre sus secuencias en siete subfamilias, los TRPC (canónico), TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPML (mucolipina), TRPP (policistina) y TRPN (*non-mechanoreceptor potential C*, NOMP) este último tipo no se encuentra en mamíferos (Clapham, 2003). Todos los canales TRP son complejos proteínicos constituidos por cuatro subunidades (homotetrámeros); cada subunidad se constituye por seis dominios transmembranales (S1-S6) y presentan una región permeable a cationes (poro) entre la región S5 y S6 (Morales-Lázaro *et al.*, 2013; Nilius y Flockerzi, 2014).

Entre los ligandos que pueden activar a los canales TRP (agonistas) se encuentran sustancias de origen exógeno como lo son la alicina, mentol, carbamol, cinamida y el borato de 2-aminoetoxidifenilo (2-APB) o bien de fuente endógena, como el fosfatidil inositol bifosfato y sus

derivados metabólicos como el DAG, los eicosanoides, la anandamida, nucleótidos purínicos y sus metabolitos (adenosin difosfato ribosa, β -NAD⁺) así como iones inorgánicos divalentes como el Ca²⁺ y el Mg²⁺ (Ramsey *et al.*, 2006; Llorente, 2007). Adicionalmente algunos TRP pueden activarse por cambios en la temperatura y el pH (Nilius y Flockerzi, 2014). Estos canales permiten obtener información para detectar la luz, la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, osmolaridad, sabor, ferohormonas, acidez, oxidación, inflamación, temperatura y dolor (Tominaga *et al.*, 1998; Zheng, 2013). Se ha demostrado que los canales TRP participan de múltiples procesos a nivel neuronal como la señalización de la glía, el monitoreo sistémico de la osmoregulación, la termorregulación, el acoplamiento neuro-glial-vascular, la iniciación de la respuesta al estrés neuronal, la neuroprotección y la neurodegeneración en el cerebro (Ramsey *et al.*, 2006; Nilius y Flockerzi, 2014).

Una de las funciones en las que participan de forma importante los TRP es en la nocicepción, es decir, la detección de estímulos que causan daño o pueden causarlo. Esta es precisamente una de las áreas de mayor inversión por la industria, dadas las implicaciones para la salud humana.

1.3. *TRPV1*.

La familia de los canales TRPV se compone de seis miembros, los cuales tienen la función de actuar como detectores para estímulos de tipo térmico, mecánico, osmótico así como la regulación del Ca²⁺ con lo que participan también de la propiocepción y del tacto (Liedtke y Kim, 2005; Offermanns, 2008).

En los últimos diez años se han generado numerosos trabajos sobre un miembro de la subfamilia vaniloide, el canal TRPV1 (figura 1) que puede activarse por diferentes estímulos y que ha despertado interés por participar en la percepción del dolor (Caterina *et al.*, 1997; Szallasi *et al.*, 2007; Morales-Lázaro y Rosenbaum, 2015), sensación fundamental para la sobrevivencia (Kavaliers, 1989).

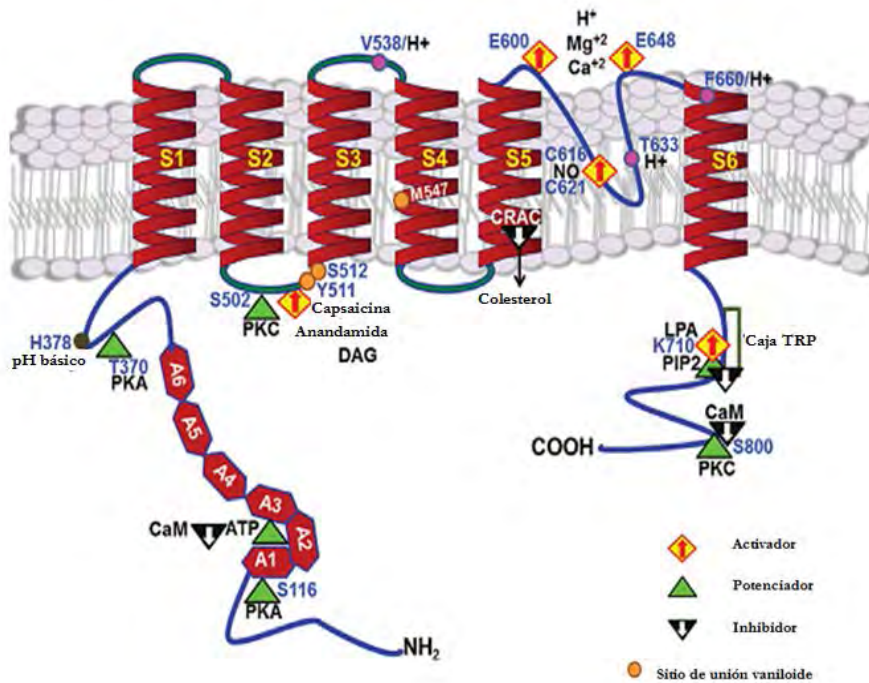


Figura 1. Estructura del canal TRPV1. En el diagrama se muestran los seis dominios transmembranales (S1-S6) y la región del poro formada por el asa entre la S5 y S6. Se presentan los distintos sitios de unión de ligandos al canal y su estructura en la membrana plasmática. Intracelularmente se encuentran los seis repetidos de anquirina (A1-A6). Se muestran además dos sitios de unión a la calmodulina (CaM) en las regiones del -NH₂ y -COOH terminales. Se señalan los diversos sitios en los que se pueden unir compuestos con la capacidad de modificar la actividad del canal (activadores, potenciadores e inhibidores). (Tomado de Morales-Lázaro *et al.*, 2013).

El canal TRPV1 se expresa principalmente en neuronas periféricas sensoriales, como lo son las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (*Dorsal Root Ganglion*, DRG) y en neuronas del ganglio trigémino (TG), estas permiten la detección de estímulos potencialmente dañinos. Específicamente se encuentra en neuronas de tamaño pequeño o mediano no mielinizadas o poco mielinizadas, clasificadas como fibras C o A δ respectivamente, a las que se restringe la capacidad nociceptiva (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998; Willis y Coggeshall, 2004). También se ha reportado su expresión en hipocampo, hipotálamo, tálamo, corteza, cerebelo, bulbo olfatorio, mesencéfalo, sistema límbico, así como en tejido no nervioso por ejemplo músculo liso, riñón, intestino, entre otros (Hwanga *et al.*, 2005; Tóth *et al.*, 2005; Nilius y Flockerzi, 2014). Por el carácter polimodal del canal TRPV1 se le considera punto de partida para nuevas investigaciones, particularmente en el campo de la analgesia por su contribución a la transducción de dolor mediante la integración de estímulos como la temperatura elevada (>42°C), cambios en el pH (Caterina *et al.*, 1997; Dhaka *et al.*, 2009), permite detectar sustancias químicas como la capsaicina, la cual es abundante en las plantas del género *Capsicum* (sustancia que genera el picor en los chiles), el olvanil (análogo de la

capsaicina) y la resiniferatoxina (compuesto que se extrae del látex de la planta *Euphorbia resinífera*) (Caterina *et al.*, 1997; Szallasi y Blumberg, 1989; Szallasi *et al.*, 2007). De forma semejante algunos compuestos endógenos liberados durante la inflamación o el daño tisular pueden activar directamente al canal TRPV1 como el ácido lisofosfatídico, o LPA (Nieto-Posadas *et al.*, 2011) y la anandamida, así como algunos productos derivados de la lipooxigenasa. Por su parte otros de estos compuestos como bradicininas, leucotrienos, histamina y prostaglandinas disminuyen su umbral de activación, es decir sensibilizan al canal (Rosenbaum y Simon, 2007). Este comportamiento se observa generalmente en neuropatías en las que se incrementa el dolor por la activación del canal TRPV1 (Nilius y Flockerzi, 2014) lo que se relaciona principalmente con modificaciones de los dominios intracelulares del canal, mediante cinasas, fosfatasas y/o por hidrólisis de fosfoinosítidos que incrementan la actividad del canal, o bien por el aumento de la expresión del receptor en terminales periféricas lo que acentúa la respuesta nociceptiva (Planells-Cases, *et al.*, 2005; Qiao *et al.*, 2015).

Una vez que se activa el canal TRPV1 se genera el paso de cationes de forma no selectiva y de acuerdo a la siguiente afinidad: $\text{Ca}^{+2} > \text{Na}^{+} > \text{K}^{+} > \text{Cs}^{+}$, estas corrientes de entrada provocan cambios en el potencial de membrana de la célula, señal que se transmite desde la periferia hasta la médula espinal, se envía al cerebro donde es interpretada y se genera la sensación de dolor (Nilius y Flockerzi, 2014; Vriens *et al.*, 2014). Luego de la excitación de los nervios se presenta un estado refractario, el cual es reversible y se conoce como desensibilización, ya que no hay respuesta del canal incluso en presencia de agonistas (Szallasi y Blumberg, 2007). Esta desensibilización permite a la célula amortiguar el impacto de estímulos químicos o físicos (Szallasi y Blumberg, 2007) y depende de mecanismos e interacciones con moléculas como la calmodulina, o la cinasa de anclaje A 79/150 (AKP79 en humano y AKP150 en ratón) esta proteína funciona como plataforma para la unión del canal TRPV1 con la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa Cε (PKCε) y la calcineurina por lo que suprimir la actividad de esta enzima puede atenuar la respuesta de dolor (Szallasi *et al.*, 2007; Btsh *et al.*, 2015; Samelson *et al.*, 2015).

De acuerdo al estímulo, el canal TRPV1 genera la respuesta adecuada, si se provoca dolor agudo se requiere de respuestas en segundos, por lo que se activa la desfosforilación del canal por Ca^{2+} ya que se activan proteínas dependientes de este catión divalente como la calmodulina y la calcineurina (Koplas *et al.*, 1997; Rosenbaum *et al.*, 2004). En el caso de los estímulos que no requieren de respuestas inmediatas, como la aplicación constante de un agonista se produce la internalización del canal para su degradación posterior, lo que requiere al menos de varios minutos (Koplas *et al.*, 1997; Szallasi y Blumberg, 2007).

Los procesos de sensibilización y desensibilización dependen, en general, de modificaciones del canal como la fosforilación que se da en residuos específicos de Serina (Ser) y Treonina (Thr) lo que incrementa la sensibilidad, por lo que el canal se abre con estímulos de baja intensidad, por ejemplo en neuropatías se activa con la temperatura corporal (Vriens *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015). De forma semejante la PKA es capaz de fosforilar a la Ser 116 y Thr 370 del amino terminal del canal, mientras que la PKC ϵ actúa sobre Ser 502 y Ser 800 del canal (Winter *et al.*, 2013; Nilius y Flockerzi, 2014) lo que favorece la probabilidad de apertura del canal (Studer y McNaughton, 2010). Por otra parte la calcio calmodulina cinasa II (CaMKII) fosforila en Thr 704, con lo que beneficia la unión a la capsaicina (Rosenbaum y Simon, 2007; Srinivasan *et al.*, 2008) y de forma semejante la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) participa de la fosforilación de Thr 406 del canal lo que contribuye a la hiperalgesia durante la inflamación (Liu *et al.*, 2015). Por el contrario la desfosforilación de TRPV1 genera desensibilización, por lo que la actividad de fosfatasas dependientes de calcio como la calcineurina (PPP3C o serina-treonina proteína fosfatasa 2B) puede atenuar la respuesta ante estímulos dolorosos (Jung *et al.*, 2004; Szallasi y Blumberg, 2007).

Otras modificaciones como la glicosilación del canal TRPV1 se han estudiado con menos detalle, sin embargo, se sabe que es importante para la selectividad, formación, estabilidad y actividad de los canales (Hoefherr *et al.*, 2014), en ausencia de las glicosilaciones se ha reportado que la respuesta a la capsaicina disminuye (Veldhuis *et al.*, 2012).

La regulación del tráfico del canal TRPV1 hacia la membrana plasmática y su correcta conformación estructural representan objetivos terapéuticos (Green and Millar, 1995; Ferrandiz-Huertas, *et al.*, 2014), además de su complejidad al estar formado por homotetrameros (por lo que presenta interacciones entre las subunidades) su mantenimiento en la membrana requiere de por lo menos tres procesos que idealmente están en equilibrio: i) la síntesis de nuevos canales (Ferrandiz-Huertas, *et al.*, 2014; Planells-Cases y Ferrer-Montiel, 2007) que son liberados de forma normal o bien son reclutados a la membrana a causa de un estímulo desde sus reservorios (por ejemplo presencia de Ca²⁺ o de mediadores inflamatorios); ii) la degradación, que puede llevarse a cabo por la vía del proteosoma (mediante marcaje con ubiquitinas) o bien por vía del lisosoma (en cuerpos multivesiculares) de acuerdo a las necesidades de la célula (Glickman y Ciechanover, 2002; Sanz-Salvador, *et al.*, 2012) y iii) el reciclaje, proceso en el que los canales internalizados en vesículas pueden volver a ser utilizados (Goswami *et al.*, 2010). Para mediar estos procesos se requiere de la participación de enzimas como la PKC que induce el tráfico del canal desde sus reservas hasta la membrana plasmática (Morenilla-Palao *et al.*, 2004) donde interactúa con otros elementos, por ejemplo el complejo que se forma con la proteína asociada al receptor del ácido γ -amino butírico tipo A (GABARAP), que en células HEK293 y en DRGs de ratón, propicia la

interacción del dominio C terminal del canal TRPV1 con la tubulina, lo que contribuye a la formación de sitios de unión que comunican al canal con el citoesqueleto, con lo que incrementa la expresión, tráfico y mantenimiento del canal TRPV1 en la membrana plasmática (Goswami, 2012).

Otra asociación importante del canal TRPV1 es la que se da con Kv β 2, una subunidad de los canales de K⁺ dependientes de voltaje, que estimula mayor expresión del canal en la membrana plasmática, lo que como consecuencia genera mayor sensibilidad a la capsaicina (Bavassano *et al.*, 2013). Este tipo de interacciones que pueden regular la cantidad de canal TRPV1 en la membrana plasmática, resultan atractivas por su impacto fisiológico.

Por la importancia del canal TRPV1 se ha generado una amplia lista de agonistas (sustancias con la capacidad de potenciar) sin embargo, el conocimiento que se tiene de los antagonistas (sustancias con la capacidad de inhibir) aún es pobre. Actualmente sabemos que existen antagonistas de origen natural como la adenosina, el colesterol, las resolvinas y el ácido oleico (Puntambekar *et al.*, 2004; Picazo-Juárez, *et al.*, 2011; Jansson *et al.*, 2013; Morales-Lázaro *et al.*, 2016). A la par también han sido descritos antagonistas sintéticos de buena efectividad sin embargo, generan efectos adversos como la hipertermia (Jancsó-Gábor *et al.*, 1970), lo que representa una desventaja para el tratamiento del dolor o inflamación asociados a la sobreactivación o sobreexpresión del canal TRPV1 en padecimientos con dolor crónico. Por todas estas implicaciones para la salud TRPV1 es un blanco importante de estudio no solamente para entender su funcionamiento, también para comprender los mecanismos moleculares y celulares que regulan su abundancia en la membrana plasmática (por ser la localización desde donde ejerce su función nociceptiva), con el fin de proponer nuevas estrategias para atenuar los efectos producidos a través de este portal del dolor (Caterina *et al.*, 1997; Morales-Lázaro *et al.*, 2013).

1.4. Receptor Sigma 1.

En los últimos años se ha descrito la importancia de algunas proteínas intracelulares para la activación o la adecuada localización del canal TRPV1; en este sentido recientemente se ha propuesto la modulación de la actividad del canal TRPV1 a través de la chaperona llamada receptor sigma 1 (σ 1R), sin embargo, no se ha dilucidado el mecanismo molecular implicado (Bae *et al.*, 2009; Entrena *et al.*, 2009).

El descubrimiento de los receptores sigma fue resultado de la búsqueda de compuestos antagonistas a los receptores opioides, proponiéndose una clasificación de estos en los grupos μ , κ y σ (Martin *et al.*, 1976); sin embargo, el grupo sigma presenta alta afinidad a familias de compuestos de

naturaleza distinta a la opioide, lo que llevó a que actualmente se les considere como un tipo diferente de receptores (Su, 1982; Matsumoto, 2007; Maurice y Su, 2009). Existen dos subtipos de receptor sigma designados como 1 y 2 que difieren en peso molecular (26 kDa y 18 kDa), distribución en tejidos y patrones de selección por drogas (Matsumoto, 2007). La expresión del σ 1R así como su estudio son predominantes a los del σ 2R, en parte por la falta de compuestos altamente selectivos y por la dificultad para clonarlo, a diferencia del σ 1R del que ya se cuenta con estas herramientas (Hanner *et al.*, 1996; Maurice y Su, 2009).

Determinar la función del σ 1R ha resultado controversial ya que no presenta homología con otras proteínas de mamíferos y a pesar de tener 30% de identidad con la C7-C8 esteroles isomerasa, una enzima del metabolismo en levaduras sin embargo, no hay evidencia de que tenga actividad de este tipo (Moebius *et al.*, 1996; Matsumoto, 2007; Su *et al.*, 2016).

Recientemente se identificó a el σ 1R como una proteína importante por tratarse de una chaperona de características peculiares, al ser regulada por diversos ligandos y tener la capacidad de modular la activación de numerosas proteínas (receptores, enzimas y canales iónicos) con las que interactúa (Su *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2011; Zamanillo *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016).

Por años la estructura del σ 1R se basó únicamente en la predicción mediante las características de su secuencia, constituida por 223 aminoácidos (Matsumoto, 2007; Crottès *et al.*, 2013), sin embargo, recientemente se obtuvo la cristalografía de esta proteína con lo que se describe una arquitectura trimérica con la presencia de un solo dominio transmembranal en cada protómero (Schmidt, *et al.*, 2016). Esta arquitectura se debe al dominio carboxilo terminal que se encuentra adyacente a la membrana, este mantiene una distancia pequeña de alrededor de 9,300 Å entre los protómeros citosólicos, por el contrario, las hélices transmembranales se mantienen separadas por lo que se forma una estructura triangular (figura 2). El dominio proximal a la membrana es extremadamente hidrofóbico lo que ofrece la posible explicación de su inclusión en la membrana, por su parte las estructuras de barril β conforman el sitio de unión a ligandos (Schmidt, *et al.*, 2016). A pesar de la diversa naturaleza de los ligandos, en general todos presentan en su estructura aminas terciarias (alquiladas), como en los esfingolípidos endógenos (Ruoho *et al.*, 2012; Schmidt, *et al.*, 2016). También se ha determinado, con base en la secuencia del σ 1R, que esta proteína cuenta con dos sitios de unión para colesterol o esteroides, además de que puede interactuar con una amplia gama de compuestos como esfingolipidos (ceramidas, esfingosina y monogliceramidas), sustancias sintéticas y naturales que presentan de moderada a alta afinidad, entre estas sustancias se han identificado drogas de tipo psicoactivo como el haloperidol, antidepresivos como la fluvoxamina y la sertralina, psicoestimulantes como la cocaína y las metanfetaminas, anticonvulsivos, como la

fenitoína, así como ciertos neuroesteroides por ejemplo la dehidroepiandrosterona y la progesterona (Fujimoto y Hayashi, 2011; Moriguchi *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2011).

Se ha reportado que el σ 1R es altamente conservado entre especies, por lo que se ha sugerido es capaz de cumplir con la misma función en todas las células (Mei y Pasternak, 2001; Matsumoto, 2007; Maurice y Su, 2009) ya que se encuentra expresado de forma ubicua (Cobos *et al.*, 2008; Crottès *et al.*, 2013), aunque con mayor presencia en sistema nervioso central, en diversas áreas del cerebro y cerebelo, así como en sistema nervioso periférico (SNP); especialmente en DRG donde participa en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} contribuyendo a la nocicepción (Matsumoto, 2007; Cobos *et al.*, 2008; Bangaru *et al.*, 2013; Crottès *et al.*, 2013).

La participación del σ 1R en el dolor ha sido ampliamente documentada (Bangaru *et al.*, 2013; Bae *et al.*, 2009; Entrena *et al.*, 2009) y se considera a esta proteína como objetivo terapéutico (Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013), ya que sus antagonistas tienen la capacidad de disminuir el dolor y acentuar el efecto analgésico de otras drogas (Gris *et al.*, 2014; Kwon *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2012) mientras que los agonistas atenúan el efecto de la analgesia y pueden generar conducta espontánea de dolor por vía del receptor de N-metil-D-aspartato, abreviado como NMDA (Xiao-Fei *et al.*, 2012; Zamanillo *et al.*, 2013; Pabba *et al.*, 2014).

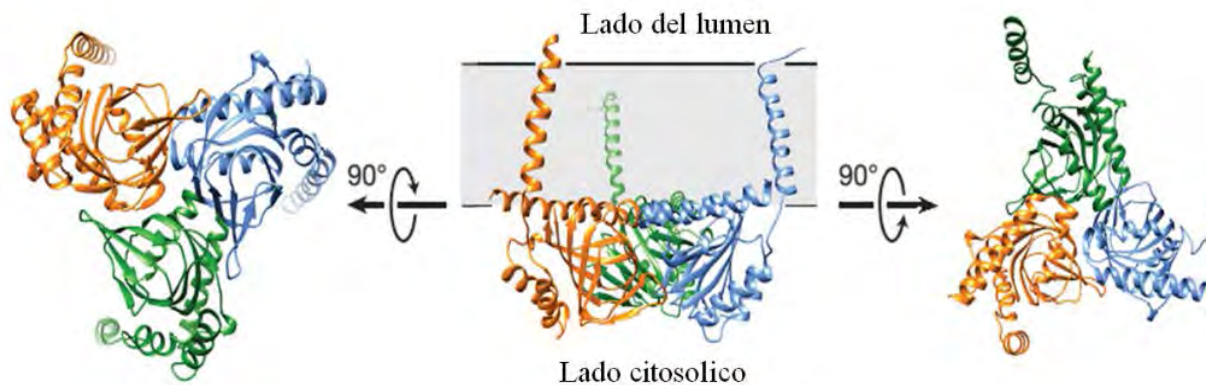


Figura 2. **Estructura general de σ 1R.** La cristalografía realizada muestra un trímero de forma triangular que presenta un dominio transmembranal por protómero, mientras que en la región citosólica se encuentran tres dominios de forma de barril β mismos en los que se encuentra el sitio de unión a ligando. (Tomado de Schmidt, *et al.*, 2016).

Se ha reportado que en condiciones normales el σ 1R se encuentra en retículo endoplásmico (RE) como parte del grupo de chaperonas como la calreticulina y BiP que regulan los niveles de Ca^{2+} y participan en el adecuado plegamiento de proteínas, que de no llevarse a cabo, puede activar vías para la degradación a través del proteosoma, al beneficiar el marcaje con ubiquitinas para su reconocimiento por el proteosoma 26S, una proteasa multicatalítica que degrada proteínas

complejas a péptidos (Lecker *et al.*, 2006). De forma particular se encuentra al $\sigma 1R$ localizado en un subdominio especializado del RE que regula la comunicación entre la mitocondria y el RE, sitio denominado membrana del RE asociada a la mitocondria (MAM), sin embargo, presenta alta movilidad que lleva a encontrar a esta proteína también en la envoltura nuclear e incluso en membrana plasmática (Fujimoto y Hayashi, 2011). A pesar de que no se conocen los detalles del desplazamiento del $\sigma 1R$, se ha identificado que la composición de las membranas en las que reside es fundamental, por ejemplo, la MAM cuenta con numerosos microdominios resistentes a detergentes por ser ricos en colesterol y ceramidas, el $\sigma 1R$ está asociado a estos dominios y al disminuir estos componentes se causa la translocación de la chaperona hacia la cisterna del RE (Hayashi y Fujimoto, 2010; Su, *et al.*, 2010).

En condiciones basales el $\sigma 1R$ se encuentra en el RE en estado de latencia en un complejo con BiP, al entrar en condiciones de estrés, por ejemplo, el incremento del Ca^{2+} citoplasmático o la presencia de especies reactivas a oxígeno (ROS), ocasiona la disociación del complejo con lo que el $\sigma 1R$ se activa (Fujimoto y Hayashi, 2011; Ortega-Roldan *et al.*, 2013). En estado activo el $\sigma 1R$ se une al receptor de 1,4,5-trifosfato (IP3R), un complejo glicoprotéico que sirve como canal de Ca^{2+} , con lo que permite el flujo de iones desde sus sitios de almacén (RE y aparato de Golgi) hacia el citosol (Hayashi, 2015) o hacia la mitocondria (Hayashi y Su, 2007; Matsumoto, 2007).

Dada la capacidad del $\sigma 1R$ para desplazarse y asociarse con otras proteínas no se conoce el detalle de todas las funciones en las que está implicado, pero se acepta que participa de la regulación del calcio mitocondrial, afecta directamente la bioenergética celular, funge como modulador de señales entre organelos y regula el tráfico de otras proteínas a la membrana plasmática (Phan *et al.*, 2003; Hayashi y Su, 2007; Matsumoto, 2007; Maurice *et al.*, 2001; Mavlyutov *et al.*, 2015). Es precisamente en la membrana plasmática donde interactúa con diversas proteínas fundamentales para el organismo entre las que se incluyen a receptores para dopamina (RDA), opioides μ , NMDA, cannabinoides (CB1R) y muscarínicos de acetilcolina (mAChR) así como la integrina y canales dependientes de voltaje (Kv y Nav), por mencionar algunos, pero se estima que puede unirse a muchas otras proteínas (Aydar *et al.*, 2002; Lupardus *et al.*, 2000; Balasuriya *et al.*, 2012; Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013; Pabba *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2016). En el citosol se asocia al dominio celular de entrapamiento y movilidad (ELMOD) y la Rac-GTPasa (Zamanillo *et al.*, 2013; Bangaru *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016). En la MAM no solo se une a BiP e IP3R, también a canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), el gen inducible de insulina y finalmente en la envoltura nuclear forma un complejo con la proteína de unión RAN2 (RANBP2) y actúa como regulador transcripcional (Zamanillo *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016).

La actividad del σ 1R repercute en procesos de supervivencia celular (Beltrán *et al.* 2004), liberación de neurotransmisores, conducta anti-amnésica, anti-estrés, anti-depresivo, anti-psicosis, anti-adicción (se ha observado que los antagonistas del σ 1R pueden bloquear efectos tóxicos de la cocaína y de las metanfetaminas, reducen las convulsiones y su letalidad), participa de la génesis de neuritas, (Beltrán *et al.* 2004; Phan *et al.* 2003), del control motor, diversos procesos endocrinos e inmunes y la anti-nocicepción (Lupardus *et al.*, 2000; Beltrán *et al.* 200; Romero *et al.*, 2012). Estos procesos pueden modificarse mediante los numerosos ligandos del σ 1R (Hayashi y Su, 2007), algunos pueden actuar incluso en concentraciones nanomolares, como en el caso de la progesterona (antagonista) o bien como el sulfato de pregnenolona (agonista) estas sustancias evitan la disociación del σ 1R con BiP o la favorecen, respectivamente (Matsumoto, 2007; Tsai *et al.*, 2009). Al disociarse del complejo que forma con BiP el σ 1R puede inhibir a los canales iónicos dependientes de voltaje y posiblemente potenciar a los activados por ligando, hecho fundamental para procesos nociceptivos en los que se ha implicado la actividad de esta chaperona de forma importante sin que se conozca a detalle cómo se lleva a cabo esta interacción (Matsumoto, 2007; Puente *et al.*, 2009; Vriens *et al.*, 2014). Se ha determinado que la expresión del σ 1R es importante para la percepción del dolor, mediante el uso de ratones transgénicos que carecen de esta proteína (KO- σ 1R), se comprobó la reducción de hasta el 55% del dolor inducido por formalina (Cendán *et al.*, 2005). En el caso específico de la activación del canal TRPV1, los ratones KO- σ 1R presentan menor sensibilidad ante un estímulo mecánico luego de la inyección con capsaicina en comparación con los animales silvestres (Entrena *et al.*, 2009). Además de esto, la inhibición mediante un antagonista selectivo para el σ 1R (BD1047) disminuye el dolor en un modelo de inducción de migraña por capsaicina, donde la coinyección disminuye la actividad de zonas del cerebro implicadas en el dolor (Bae *et al.*, 2009). Estos antecedentes, dan las primeras evidencias de la importancia del receptor σ 1, en la generación del dolor a través de la activación del canal TRPV1 y abre una línea de estudio para determinar el mecanismo molecular por el cual es posible este efecto.

2. Hipótesis.

El canal TRPV1 puede ser regulado por el receptor σ 1 lo que resulta importante para la detección de estímulos nocivos y la generación de la respuesta de dolor.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

Determinar el mecanismo por el cual el σ 1R modula el dolor generado a través de la activación del canal TRPV1.

3.2. Objetivos particulares.

3.2.1.) Determinar la expresión del σ 1R a nivel de ARNm en ganglios de la raíz dorsal y ganglios del trigémino (sistemas de expresión endógena del canal TRPV1) y en las líneas celulares HEK293 y F11.

3.2.2.) Determinar la expresión del σ 1R a nivel de proteína en los sistemas de expresión endógena del canal TRPV1 (ganglios de la raíz dorsal y ganglio trigémino) y en las líneas celulares HEK293 y F11.

3.2.3.) Evaluar el efecto de la inhibición del σ 1R sobre el canal TRPV1.

3.2.4.) Evaluar si la inhibición del σ 1R altera la cantidad de canales TRPV1 de superficie celular.

3.2.5.) Determinar si existe interacción entre TRPV1 y el σ 1R.

3.2.6.) Determinar por inmunocitoquímica si TRPV1 y el σ 1R se distribuyen en las mismas regiones subcelulares.

3.3.8.) Determinar el efecto de la inhibición del σ 1R en la conducta de dolor inducida por la activación del canal TRPV1.

4. Material y Métodos

Cultivo celular.

Se realizaron cultivos de la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, ATCC) en medio de cultivo DMEM con alta glucosa (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) complementado con FBS (*Fetal Bovine Serum*, HyClone) al 10% y solución de estreptomicina 10,000 µg/ml y penicilina 10,000 u/ml (medio referido en adelante como D10). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ con cambio de medio diario y pasajes celulares cada tercer día. Cada pasaje se realizó a partir de la adición de solución de tripsina EDTA 0.05% (Invitrogen) con la que se disoció la monocapa de células, la reacción enzimática se bloqueó al agregar el mismo volumen de D10. La suspensión se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, finalmente se homogenizó el botón celular en 1 ml de medio D10 y se realizaron diluciones para obtener cultivos subconfluentes de alrededor del 50% respecto al original.

Extracción de ARN total.

Se realizó la extracción de ARN total a partir de cultivo y tejidos con base en la técnica de Chomczynski (1993) cuyo fundamento es el uso de un reactivo que contiene tiocinato de guanidina y fenol, sustancias que permiten separar de forma simultánea el ARN, ADN y proteínas en fases que se distinguen de acuerdo a su color.

El material biológico obtenido se lavó con buffer de fosfatos (PBS) frío y se le adicionó TRIzol (Invitrogen) para homogenizar mecánicamente (1 mL de TRIzol por cm³ de tejido o por 10⁶ de células). Se agregó cloroformo (200 µL por mL de TRIzol utilizado) y se agitó vigorosamente por 15 s, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 10 min. La suspensión se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C, como resultado de este paso se obtuvieron las tres fases de las que se recuperó únicamente la superior, por contener el ARN total. De esta fase incolora se precipitó el ARN total con isopropanol (500 µL por mL de TRIzol), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, pasado ese tiempo se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el botón resultante con etanol al 75% en agua con dietil policarbonato (DEPC, agua libre de nucleasas). Se centrifugó nuevamente a 7,500 g por 5 min a 4°C, el sobrenadante fue desechado y el precipitado se mantuvo a temperatura ambiente por 3 min para evaporar el etanol. El ARN obtenido se solubilizó en 50 µL de agua DEPC y se cuantificó la concentración total de ARN mediante el uso de un espectrómetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific). Para comprobar la integridad del ARN se utilizó electroforesis en gel de agarosa al

1.5% en TBE al 0.5X adicionado con bromuro de etidio (0.02 mg en 100 mL), las imágenes se visualizaron mediante el uso de un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y se capturaron las imágenes con una cámara fotográfica.

RT-PCR (Reverse transcription-Polimerase Chain Reaction).

La técnica de RT-PCR permite amplificar una región determinada de ARN mensajero (ARNm) a partir de la síntesis del ADN complementario (ADNc) mediante el uso de oligonucleótidos complementarios a la secuencia de interés, de esta forma se delimita la actividad de una ADN polimerasa termoestable (Saiki *et al.*, 1988).

Las secuencias amplificadas fueron actina, como control de la integridad de los mensajeros y de $\sigma 1R$, como secuencia problema. El diseño de oligonucleótidos se llevó a cabo mediante el programa Vector NTI, se utilizaron las secuencias que se encuentran en la base de datos del NCBI (GenBank AAC33306.1 para *M. musculus*, NP_005857.1 para *H. sapiens*) con las que se generaron los oligonucleótidos referidos en la tabla 1 y que se utilizaron para amplificar la región del exón 1 al exón 3 del ARNm del $\sigma 1R$. Para actina se usaron oligonucleótidos que flanquean entre el exón 3 y 6.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos para RT-PCR.

Dirección de la secuencia	Especie	Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Sentido	Ratón	S-mSigma1	5'-TTCTCTAGAGAAGAAATAGCG CAGC-3'
Sentido	Humano	S-hSigma1	5'-AGCTTCGTCTTCCAGCGCGAA GAGA-3'
Antisentido	Ratón, humano	As-mSigma1	5'-TAGAAGACCTCACTTTTCGTGGTGC- 3'
Sentido	Humano, rata, ratón	S-Actina	5'- AAGATGACCCAGATCATGTT- 3'
Antisentido	Humano, rata, ratón	As-Actina	5'-GAGTACTTGCGCTCAGGAGG -3'

A partir del ARN total obtenido de los sistemas de interés (tejidos donde se expresa de forma endógena TRPV1 y cultivos para la transfección del canal) se realizó la retrotranscripción (RT) mediante la enzima Transcriptasa Reversa SuperScript III (Thermo Fisher) de acuerdo a las instrucciones del proveedor (tabla 2), a partir de las mezclas de reacción al finalizar los ciclos en el termociclador (figura 3) se generaron las secuencias de ADNc

Tabla 2. Mezclas generadas para RT.

Mezcla 1		
Componente	Concentración stock	Concentración final
ARN total	----	5µg (extractos de tejidos) 2.5µg (extractos de cultivo)
Hexámeros	50 ng/µL	100 ng
Deoxinucleótidos trifosfatos	10 mM	0.5 mM
Mezcla 2		
Buffer de reacción 250mM TrisCl, pH 8.3	5X	1X
Ditiotreitol	100 mM	5 mM
Transcriptasa Reversa SuperScript III	200 u/ µL	200 u/reacción

--- La concentración inicial del ARN total varía de acuerdo a la cantidad del material biológico usado para la extracción.

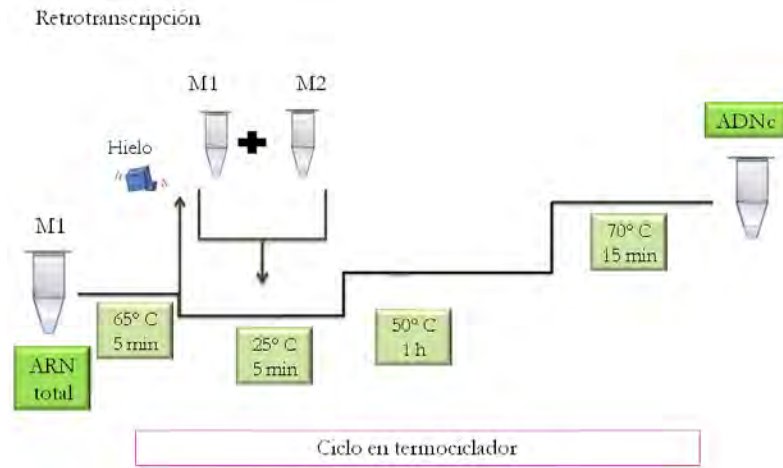


Figura 3. **Diagrama de retrotranscripción.** El ARN total fue sometido a los siguientes pasos: Desnaturalización a 65°C por 5 min, pasado este tiempo se colocó la mezcla 1 en hielo durante 1 min. Se adicionó la mezcla 2 y la mezcla resultante se colocó nuevamente en el termociclador para continuar con los pasos de la RT, que fueron alineamiento a 25°C por 5 min, retrotranscripción a 50°C por 1 h e inactivación a 70°C por 15 min.

Con el ADNc obtenido se realizó la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) en la que se amplifica únicamente la región correspondiente a un segmento del ARNm de las secuencias de interés (figura 4) gracias al uso de los oligonucleótidos previamente mencionados. Se realizaron todas las mezclas (tabla 3) y una mezcla en la cual se usaron los reactivos de PCR sin muestra de ADNc como control negativo para comprobar la especificidad de la señal.

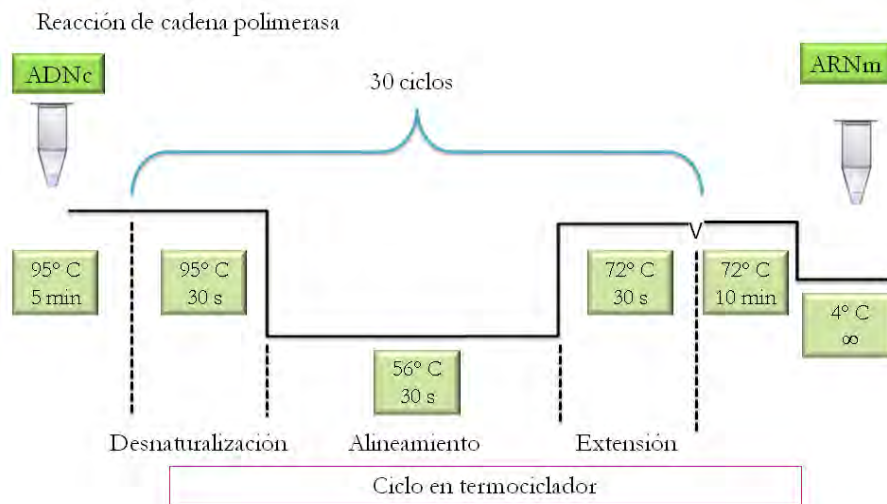


Figura 4. **Esquema de la PCR.** Pasos para la amplificación del segmento de ARNm del $\sigma 1R$; se realizaron 30 ciclos que comprenden la desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 59°C por 30 s (para el $\sigma 1R$) y extensión a 72°C por 30 s. En el caso de la amplificación de actina se desnaturalizó a 95°C por 30 s, el alineamiento fue de 56°C por 30 s y la extensión fue de 72°C por 30 s.

Tabla 3. Mezcla para reacción de PCR.

Componente	Concentración del stock	Concentración final
Buffer PCR	10X	1X
Buffer MgCl ₂	50 mM	1.5 mM
Deoxinucleotidos trifosfatos	10 mM	0.2 mM
Taq Polimerasa	5 u/μL	2.5 u
Oligonucleótido sentido	Actina 25 μM σ1R 30 pmol	Actina 0.5 μM σ1R 15 pmol
Oligonucleótido antisentido	Actina 25 μM σ1R 30 pmol	Actina 0.5 μM σ1R 15 pmol
		Volumen utilizado (μL)
ADNc	----	Actina 1.25 σ1R de tejidos 5 σ1R de cultivos 2.5

Se visualizó el producto de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TBE 0.5 X. Cada pozo se cargó con una mezcla de 5 μL del producto de la PCR con buffer de carga de azul de bromofenol 6X (1X) y agua (5 μL). Se corrieron las muestras a 100 V durante 30 min y se registraron las bandas resultantes en el transiluminador.

Transfección.

La transfección es una técnica rutinaria que permite la introducción de ADN a células eucariontes en cultivo, generalmente mediante el uso de plásmidos o vectores virales. Para introducir el material de interés es necesario abrir poros en la membrana plasmática o bien introducir liposomas que tengan la capacidad de fusionarse con ella (Lodish *et al.*, 2005)

Con el objetivo de asegurar la expresión transitoria del canal TRPV1 en el cultivo celular de HEK293 se realizaron transfecciones con el vector pcDNA3.1rTRPV1 o pcDNA3.1hTRPV1 para la expresión transitoria de TRPV1 de rata (rTRPV1) y TRPV1 de humano (hTRPV1) respectivamente. En la tabla 4 se mencionan los componentes de los complejos de transfección utilizados.

Tabla 4. Complejos para transfección.

Complejo 1			
Compuesto	Tipo de caja para cultivo (mm)	Volumen utilizado	Concentración utilizada
NaCl 150 mM filtrado	35	100 μ L	---
	100	250 μ L	---
ADN en plásmido	35	---	100 ng rTRPV1 200 ng hTRPV1
	100	---	1 μ g rTRPV1 2 μ g hTRPV1
Complejo 2			
Compuesto	Tipo de caja para cultivo (mm)	Volumen utilizado (μ L)	
NaCl 150 mM filtrado	35	100	
	100	245	
JetPEI (Polyplus)	35	3	
	100	5	

Se prepararon los complejos por separado, cada uno se agitó vigorosamente en el vórtex para posteriormente adicionar el complejo 2 en el tubo con el complejo 1, la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente por 30 min al final de los cuales se agregó el complejo de transfección en el cultivo con medio fresco para incubar durante al menos 16 h.

Tratamiento con inhibidores del σ 1R

El estudio del σ 1R se ha beneficiado de la existencia de sustancias de alta especificidad como el antagonista BD1063 (Sigma Aldrich) que evita la disociación del complejo formado entre esta chaperona y BiP (Matsumoto, 2007). A partir de un stock 10 mM de BD1063 en H₂O se realizó el tratamiento en cultivos transfectados para la expresión transitoria de TRPV1 a los que se les agregó medio D10 nuevo con las diferentes concentraciones de BD1063 (1 μ M y 25 μ M,) y se incubó por 24 h. Los controles realizados consistieron en cultivos, de estas mismas características, que fueron

incubados con el volumen del vehículo de BD1063 (agua) correspondiente a la mayor concentración utilizada por ensayo.

Obtención de proteína total.

Para extraer la PT se lisó a las células, es decir se causó disrupción de la membrana celular mediante el uso de un buffer de lisis (Peach *et al.*, 2015).

El material biológico (cultivos y tejidos) se colocó en hielo y se lavó con PBS frío para eliminar restos y medio de cultivo. Se adicionó el buffer de lisis (tabla 5) y se homogenizó mecánicamente, el lisado resultante se centrifugó a 13,200 rpm durante 3 min y el sobrenadante se recuperó ya que contiene la PT.

Tabla 5. Buffer de lisis

Componente	Concentración del stock inicial	Concentración final
TrisCl pH 8	250 mM	50 mM
NaCl	750 mM	150 mM
Tritón	5%	1%
Inhibidores de proteasas*	25X	1X
NaF	100 mM	2.5 mM

* Mezcla de inhibidores de proteasas cOmplete (Roche).

Cuantificación de proteína.

La cuantificación de PT se realizó mediante el método del ácido bicinonónico (BCA). El BCA es una sal sódica estable en agua capaz de formar un complejo con Cu^{1+} que en un ambiente alcalino reacciona con las proteínas presentes con lo que forma Cu^{2+} (reacción de Biuret) lo que genera coloración morada (Smith, *et al.*, 1985). La intensidad del color es estable y depende de la concentración de proteína por lo que es posible comparar muestras de concentración desconocida respecto a una curva estándar de concentración conocida con resultados precisos (Olson y Markwell, 2007). Se utilizó curva estándar de proteína de albumina de suero bovino (BSA) con la que se compararon las muestras de PT obtenidas del material biológico, todas las muestras se cargaron por duplicado en placa de 96 pozos. La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro ELx808 (BioTek) a una longitud de onda de 562 nm. Con los valores obtenidos

de la curva de BSA se realizó la regresión lineal mediante el programa GraphPad Prism para conocer la concentración de PT.

Obtención de tejidos.

Para obtener la PT de los tejidos con expresión endógena de TRPV1 se hizo uso de ratones machos adultos de la cepa C57BL/6J, por tratarse de una cepa endogámica cuyo fenotipo se considera silvestre y en la que se ha estudiado al canal TRPV1 (Huang *et al.*, 2013). Se seleccionaron animales de alrededor de 8-10 semanas de edad que se sacrificaron por decapitación y se disectaron de acuerdo a lo sugerido por Malin y su equipo en 2007. Se extrajeron ganglio trigémino (TG) y ganglios de raíz dorsal (DRG) de la región lumbar por ser regiones de alta expresión de TRPV1 (Zacharová y Palecek, 2009). Para evaluar la expresión del $\sigma 1R$ se extrajo cerebelo ya que representa el sistema de expresión endógeno para esta proteína y constituye por esto un control positivo. Los tejidos obtenidos fueron lavados con PBS frío y homogeneizados mecánicamente de acuerdo a dos posibles objetivos, para la obtención de ARN con TRIZOL o bien para la obtención de PT con buffer de lisis.

Inmunodetección de proteínas en fase sólida (Western blot).

La técnica de Western Blot (WB) es un método analítico que permite detectar proteínas específicas a partir de su separación electroforética de acuerdo a su Peso Molecular, posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana, que puede ser de polifluoruro de vinilideno (PVDF) o de nitrocelulosa, sobre las cuales se incuban los anticuerpos específicos para unirse a las proteínas de interés (anticuerpo primario); a estos pueden unirse otros anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano (anticuerpos secundarios), gracias a los cuales se inmunodetecta a las proteínas ya que generan una señal quimioluminiscente al entrar en contacto con el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que sirve como su sustrato, la señal es captada mediante placas para radiografía con lo que se registra la proteína a la que se unieron los anticuerpos primarios (Kurien y Scofield, 2015; Ni *et al.*, 2016).

Se prepararon geles separadores (10% de poliacrilamida) para detectar a TRPV1 y $\sigma 1R$ (Tabla 6). Se cargaron mezclas con igual concentración de Proteína Total (20 μg) con buffer de carga 1X (tabla 7).

Tabla 6. Preparación de mezclas para geles de poliacrilamida*

Separador (10% de acrilamida)	
Solución stock	Volumen utilizado
30% acrilamida/ 0.8% bis acrilamida	7.5 mL
4X TrisCl/SDS, pH 8.8	5.625 mL
H ₂ O	9.375 mL
10% (w/v) persulfato de amonio	75 µL
TEMED [†]	30 µL
Concentrador (3.9 % de acrilamida)	
Solución stock	Volumen utilizado
30% acrilamida/ 0.8% bis acrilamida	1.3 mL
4X TrisCl/SDS, pH 6.8	2.5 mL
H ₂ O	6.1 mL
10% (w/v) persulfato de amonio	50 µL
TEMED	20 µL

*Mezclas utilizadas para preparar dos geles. [†] Tetrametiletildiamina.

Tabla 7. Composición del buffer de carga 6X[†]

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

[†] Este buffer se utilizó al 1X en cada una de las muestras

Las mezclas fueron colocadas en los geles que se sometieron a electroforesis, en buffer preparado para este fin (tabla 8), con una corriente constante de 20 mA por cada gel a un voltaje máximo durante 2 h.

Tabla 8. Composición del buffer de electroforesis 5X*

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

*Este buffer se utilizó al 1X durante la electroforesis.

Posteriormente se utilizó un sistema semi seco con una cámara TE70XP (Hoefer), misma que requiere de buffer de transferencia (tabla 9) para transferir las proteínas a una membrana de PVDF previamente hidratada con metanol, las condiciones utilizadas fueron una corriente de 220 mA por 2 h.

Tabla 9. Composición del buffer de transferencia

Componente	Concentración final
Glicina	39 mM
Tris base	48 mM
SDS	0.037%
Metanol	20%

Las membranas se bloquearon con leche al 6% en PBS, Tween 0.1% (PBST) por 1 h y posteriormente se incubaron con los anticuerpos de acuerdo a la proteína de interés (tabla 10).

Tabla 10. Condiciones de anticuerpos utilizadas para WB

Anticuerpos primarios					
Proteína	Anticuerpo	Peso (KDa)	Dilución	Condiciones de incubación	Marca
TRPV1	Policlonal en cabra	95	1:1000 en leche 3% en PBST	ON ^o a 4°C	Santa Cruz (P19)
σ 1R	Policlonal en cabra	26	1:1000 en leche 3% en PBST	ON a 4°C	Santa Cruz (S18)
GAPDH*	Policlonal en conejo	36	1:5000 en leche 3% en PBST	ON a 4°C	Cell Signaling (14C10)
Actina	Monoclonal en ratón	42	1:500 en PBST	ON a 4°C	CINVESTAV
Calnexina	Policlonal en conejo	95	1:1000 en leche 3% PBST	ON a 4°C	Santa Cruz (H70)
Na ⁺ K ⁺ ATPasa	Monoclonal en ratón	100	1:500 en PBST	48 h a 4°C	Santa Cruz (H300)

Las membranas fueron bloqueadas por 1 h con leche al 6% en PBST con movimiento constante. Todas las incubaciones se realizaron con agitación constante. ^oON incubación por toda la noche (*over night*). * Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Al final de la incubación las membranas se lavaron con PBST y se adicionó el sustrato para la peroxidasa de rábano (Immobilon-Western) que está asociada al anticuerpo secundario (tabla 11), la señal quimioluminiscente liberada se captó con placa radiográfica. Las placas se digitalizaron y procesaron con el programa ImageJ, mismo con el que se calculó el valor del área de bajo la curva

de cada señal. Finalmente se realizó normalización de la señal de TRPV1 respecto a los niveles de GAPDH, como control de carga.

Tabla 11. Condiciones de anticuerpos secundarios utilizadas para WB

Anticuerpos secundarios				
Tipo de inmunoglobulina que reconoce	Dilución	Buffer de incubación	Condiciones de incubación	Marca
Anti cabra	1:5000	Leche 3% en PBST	1 h a temperatura ambiente	Santa Cruz
Anti conejo	1: 7500	Leche 3% en PBST	1 h a temperatura ambiente	GE Healthcare life Sciences
Anti ratón	1:5000	PBST	1 h a temperatura ambiente	GE Healthcare life Sciences

Todas las incubaciones se realizaron con agitación constante.

Biotinilación.

Para determinar si la disminución en los niveles de proteína de membrana plasmática del canal TRPV1 por efecto de la incubación con el antagonista del $\sigma 1R$, afecta la cantidad de los canales de este tipo que se encuentran en la membrana plasmática (PM), se realizaron ensayos de biotinilación para marcar y purificar las proteínas de superficie celular, mediante el uso de un kit para extracción de proteína de membrana (Mem-PER™ Thermo Scientific) que contiene el reactivo sulfo-NHS-SS-biotina, el cual es capaz de unirse a lisinas accesibles y de localización extracelular, al mismo tiempo este reactivo no atraviesa la membrana plasmática por lo que su marcaje se restringe a las proteínas de superficie celular lo que permite purificarlas.

Se utilizaron cultivos con la expresión transitoria de TRPV1 que fueron incubados en condiciones control y con 25 μM de BD1063 (control y tratamiento). Los cultivos se lavaron con PBS frío y se incubaron con 5 mL de sulfo-NHS-SS-biotina (0.6 mg/mL) durante 30 min a 4°C con agitación constante. Para detener la reacción se incubó por 10 min en solución de Quenching (250 μL por

cada 5 mL de Biotina) a temperatura ambiente, posteriormente se cosecharon las células mecánicamente para recuperar la suspensión en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 2000 rpm durante 8 min a 4°C, finalmente se retiró el sobrenadante con cuidado y se lavó el botón celular con 5 mL de Tris-buffer salino (TBS). La suspensión obtenida fue centrifugada, a 1800 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se homogenizó el botón celular en buffer de lisis (350 µL por P100). Nuevamente se centrifugó a 13,200 rpm durante 3 min para recuperar el sobrenadante, el cual representa la proteína total, por lo que se separaron 50 µL para analizarlos posteriormente por WB (input o Inp). En una columna se cargaron 350 µL de avidina y se lavaron con 500 µL de buffer de lavado (2 veces a 1000 g), luego se cargaron las columnas con el mismo volumen de proteína para cada una de las condiciones a comparar (control y tratamiento) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con movimiento constante. Se centrifugó a 1000 g por 1 min, se retiró el sobrenadante y se lavó la columna con 500 µL de buffer de lavado por 3 veces. Finalmente se adicionó en la columna 200 µL de buffer de elución el cual se compone por 4X TrisCl pH 6.7 (62.5 mM), SDS (1%), Glicerol (10%) y H₂O cbp 1 mL, de esta solución se toman 450 µL que se adicionaron con 50 mM de DTT. Se mantuvo la incubación con el buffer de elución por 1 h, al final de la cual se recuperó el sobrenadante en un tubo mediante centrifugación.

Las proteínas obtenidas y que corresponden solo a las que se encuentran en membrana plasmática fueron sometidas a WB para evaluar la cantidad de proteína de TRPV1 presente en superficie celular.

Inmunoprecipitación.

Para determinar una posible interacción entre TRPV1 y el σ 1R se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Para esto se utilizaron perlas de agarosa (PGA) que inicialmente se pre-equilibraron, con buffer de lavado (tabla 12), 500 µL por cada 100 µL de PGA, se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min y se retiró el sobrenadante, luego de esto se incubó el botón en 1 mL de buffer de pre-equilibrio (tabla 12) por 2 h a 4°C con movimiento constante. Al final de la incubación se realizaron lavados con el buffer de lavado (3 veces a 3000 rpm durante 1 min). Al botón de PGA pre-equilibrada resultante se le adicionó 100 µL de buffer de interacción (tabla 12). Se utilizaron al menos 500 µg de proteína total a la que se adicionó 50 µL de PGA pre-equilibrada, esta se llevó a un volumen final de 1 ml con buffer de interacción, para preclarificar el extracto durante 2 h a 4°C con movimiento constante. Se centrifugó el extracto a 3000 rpm durante 1 min, se recuperó el sobrenadante como extracto preclarificado y se desechó el botón. El extracto preclarificado se separó en dos tubos en volúmenes iguales, con alrededor de 250 µg de proteína total, al primero (IP) se le agregó el anticuerpo inmunoprecipitante (TRPV1 policlonal cabra 1 µg) y al segundo se

le agregó 1 μg de anticuerpo secundario como control (IgG), se ajustó el volumen a 975 μL con buffer de interacción y ambos tubos se incubaron durante 1 h a 4°C con agitación constante. Pasado ese tiempo a cada tubo se le agregó 25 μL de PGA preequilibrada y se incubó ON a 4°C con agitación constante. Cada una de las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 3 min y el sobrenadante resultante (que corresponde a las proteínas que no coprecipitaron) fue retirado y posteriormente se lavó el complejo inmunoprecipitado con buffer de lavado (3 veces a 3000 rpm durante 1 min), entre cada centrifugación el tubo con el botón se incubo en cama de hielo durante 5 min con agitación constante, el último de estos lavados se realizó con PBS. El botón obtenido se homogenizo en buffer de carga 1X y se calentó a 95°C por 5 min, finalmente se agitó vigorosamente en el vórtex y se centrifugó una vez más a 3000 rpm durante 1 min para después de esto tomar 40 μL del sobrenadante y cargarlo en gel para WB, se realizó la inmunodetección primero para TRPV1 y luego para el $\sigma 1\text{R}$.

Tabla 12. Composición de soluciones buffer para inmunoprecipitación

Tipo de buffer	Componente	Concentración final
Buffer de lavado	TrisCl pH 8	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tritón	1%
Buffer de preequilibrio	TrisCl pH 8	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tritón	1%
	BSA deslipidado	3%
Buffer de interacción	TrisCl pH 8	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tritón	1%
	Inhibidores de proteasas*	1 X

* Mezcla de inhibidores de proteasas cOmplete (Roche).

Inmunocitoquímica.

Las técnicas de inmunofluorescencia se basan en la adición de moléculas fluorescentes, es decir, con la capacidad de emitir luz cuando son excitadas mediante un haz de luz, generalmente un láser de longitud de onda específica (Coico y Sunshine, 2015). De esta forma es posible fusionar proteínas que presentan fluorescencia con aquellas que no la tienen, por ejemplo la citrina, una proteína derivada de la familia YFP (*Yellow fluorescent protein*) que es capaz de emitir fluorescencia máxima a 516 y 529 nm (coloración verde) y puede fusionarse con otras proteínas para concederles esta coloración (Haas *et al.*, 2010). Por otra parte al dirigir anticuerpos específicos y marcarlos posteriormente con moléculas fluorescentes se puede identificar la ubicación de proteínas específicas a nivel celular, al añadir, por ejemplo, el marcaje fluorescente de organelos como el del ADN del núcleo evidenciado por el DAPI (Cover y Allan, 1999). Para detectar una posible colocalización de TRPV1 y el σ 1R, lo que indicaría una interacción directa entre estas proteínas, se realizó un cultivo de HEK293 transfectadas para la expresión de rTRPV1 fusionado con citrina (200 ng). El cultivo se realizó sobre cubreobjetos recubiertos de poli D-lisina (0.5 mg/mL), un compuesto sintético que favorece la adhesión celular. Estos cultivos se incubaron con D10 adicionado con BD1063 (25 μ M) durante 24 h y se realizó su control adicionando al D10 el vehículo de BD.

Al finalizar la incubación se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS por 15 min a temperatura ambiente, seguido de la permeabilización con solución de tritón al 0.2% en PBS por 2 min. Luego de esto se realizaron lavados con PBS y posteriormente se bloqueó con solución 1% de gelatina, 2.5% de FBS en PBS por 30 min y se incubó con anticuerpo primario y secundario (tabla 13).

Tabla 13. Condiciones de anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia

Proteína	Tipo de anticuerpo	Anticuerpo	Dilución	Condiciones de incubación
σ 1R	Primario	Policlonal en cabra	1:100 en BSA al 3% en PBS	ON a 4°C dentro de una cámara húmeda en ausencia de la luz
	Secundario	Cy5 anti cabra	1:100 en BSA al 3% en PBS	1 h a 4°C en ausencia de la luz

Se adicionó en portaobjetos limpios 10 μ L de medio de montaje *Vectashield*, el cual contiene DAPI. Finalmente se visualizó el resultado en un microscopio confocal FV1000, de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología celular, se utilizaron las longitudes de onda para excitar la fluorescencia a 519 nm, 647 nm y 358 nm para citrina, Cy5 y DAPI respectivamente que emiten fluorescencia en color verde (529 nm) rojo profundo (670 nm) y azul (460 nm) respectivamente.

Evaluación de la corrección de la fluorescencia celular total (CTCF).

Al obtener la señal fluorescente de proteínas es posible realizar comparaciones entre la intensidad de la señal emitida de acuerdo a los tratamientos a los que se somete a los cultivos, sin embargo para que esta evaluación no sea subjetiva se ha desarrollado la siguiente fórmula:

$$CTCF = DI - (ACS * MFBG)$$

Donde CTCF es la corrección de la fluorescencia total, DI la densidad integral, ACS es el área celular seleccionada y MFBG es la media de la fluorescencia leída como fondo, con estos valores se puede comparar la fluorescencia entre cultivos controles y tratamientos (Bankhead, 2014).

Se seleccionó una imagen tomada por microscopía confocal que fuese representativa de cada cultivo transfectado para la expresión transitoria del canal rTRPV1 fusionado con citrina y que se incubó por 24 h con BD1063 (25 μ M). Esta imagen se analizó mediante el programa ImageJ y se evaluaron los parámetros mencionados en la fórmula de acuerdo a lo indicado por Gavet y Pines, para finalmente graficar y comparar los valores de CTCF de las células tratadas con BD respecto a un cultivo control.

Tratamientos con inhibidores de las vías de degradación de proteínas

Para determinar la posible vía de degradación se inhibieron las dos principales vías de degradación proteínica: proteosomal y lisosomal. Estas vías de degradación pueden ser detenidas mediante la adición de compuestos como el MG132 que se adhiere a la subunidad 26S del proteosoma e inhibe su actividad (Goldberg, 2012). Por otra parte la adición de cloroquina ocasiona el incremento del pH lisosomal con lo que se detiene a esta vía de degradación (Slater, 1993).

Se colocaron cultivos con expresión transitoria de TRPV1 en incubación con BD1063 (25 μ M) en D10 por 24 h. A las 18 h de incubación se cambió el D10 por medio fresco adicionado con los cotratamientos de BD1063 con MG132 a una concentración de 25 μ M (en adelante referido como MG) o cloroquina a una concentración de 200 μ g (en adelante referido como CQ). Se colocaron además controles con los vehículos para ambos reactivos en el mismo volumen correspondiente a los tratamientos (figura 5). Al finalizar las 24 h de incubación se recuperaron las células en suspensión para la extracción de PT.

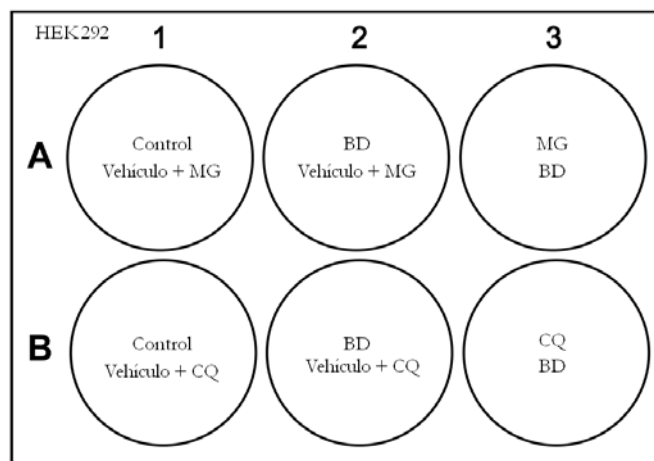


Figura 5. **Tratamiento con inhibidores de degradación.** Se aplicaron los siguientes tratamientos:

A) Control MG (D10+0.25% H₂O+ 0.25% DMSO); BD (D10+25 μ M de BD+0.25% DMSO); MG (D10+25 μ M de BD + 25 μ M MG).

B) Control CQ (D10+0.95% H₂O); BD (D10+25 μ M de BD+0.66% H₂O); CQ (D10 + 25 μ M de BD + 200 μ g de CQ).

Conducta.

Los ensayos de dolor agudo se basan en conductas que van desde el cambio de postura hasta el lamido persistente (Berge 2011), en este caso se utilizó el modelo de lamido, en el que se inyectó intradérmicamente el agente nocivo (capsaicina) en la extremidad delantera de los ratones y se evaluó el tiempo que pasaron lamiéndose la zona afectada.

Para comprobar el efecto fisiológico de la inhibición del σ 1R sobre el dolor inducido por la activación de TRPV1 se utilizaron ratones machos adultos de la cepa C57BL/6J por ser usualmente utilizados en ensayos de dolor (Mogil, *et al.*, 1999). Estos animales se seleccionaron con alrededor de 8-10 semanas de edad, se mantuvieron *ad libitum* en fotoperiodo 12:12 (h luz: oscuridad) y se les aclimató al menos por 1 h previa a cada ensayo. Se realizó el registro en un cuarto con contaminación auditiva atenuada y en todos los casos se consideró el tiempo de lamido durante 10 min luego de inyectar la pata con capsaicina, como una respuesta al dolor inducido por la activación de TRPV1.

Pretratamiento de 24 h.

Los animales fueron pesados e inyectados subcutáneamente en la zona escapular con BD1063 de acuerdo a lo reportado previamente (Nieto *et al.*, 2014), 32 mg de BD1063 por Kg de peso del animal (32 mg/Kg); posterior a 24 h de esta inyección, se realizó el ensayo de dolor agudo, mediante la inyección intradérmica en el cojinete de la extremidad delantera de animal, de 10 μ L de una solución con capsaicina en solución salina (0.28 μ g/ μ L) y se evaluó la conducta. Para estos ensayos se realizaron los experimentos en tres grupos: grupo 1 (control, C), inyectado subcutáneamente e intradérmicamente con soluciones que contiene los vehículos de BD y capsaicina (agua y etanol, respectivamente); grupo 2 (vehículo, Vh) cuyos animales fueron inyectados subcutáneamente con el vehículo de BD (agua) pero inyectado intradérmicamente con capsaicina; finalmente el grupo 3 recibió la inyección subcutánea de BD y la inyección intradérmica de capsaicina.

Proceso de datos.

Todos los resultados obtenidos del WB fueron digitalizados mediante el programa ImageJ, estos datos se normalizaron en Excel, se analizaron y graficaron mediante el programa GraphPad Prism. Del análisis se obtuvo la estadística descriptiva de cada grupo (media, desviación estándar y error estándar). Las medias de los controles y tratamientos se compararon mediante una prueba de *t-student* con lo que se determinó si la diferencia es estadísticamente significativa.

Las imágenes obtenidas de la microcopia confocal fueron analizadas mediante el software para el equipo FluoView 1000 (Olympus). Se procesaron los datos de fluorescencia en Excel y se graficaron en GraphPad Prism.

Los datos obtenidos de los ensayos de conducta fueron analizados y graficados mediante el programa GraphPad Prism. Se realizó la comparación de la media del grupo control contra los tratamientos por separado mediante una prueba de *t-student* y se determinó si la diferencia es estadísticamente significativa.

5. Resultados.

5.1. *Expresión del Receptor Sigma 1 (σ 1R) en Sistema de expresión endógeno y transitorio del canal TRPV1.*

Para determinar si existe relación entre TRPV1 y el σ 1R se evaluó si el σ 1R se encuentra en los sistemas de expresión usados en este estudio, inicialmente se exploró la expresión del σ 1R a nivel de ARN mensajero (ARNm) en tejidos de ratón en donde de forma endógena se expresa el canal TRPV1 (ganglios de la raíz dorsal, DRG y ganglios del trigémino, TG) y en el sistema de expresión transitoria para este canal (línea celular HEK293 y F11).

Mediante la técnica de RT-PCR se amplificó un fragmento del ARNm del σ 1R, de los tejidos y líneas celulares antes mencionados, se utilizó como control positivo de expresión ARN total de cerebelo, donde ya se ha identificado la expresión del σ 1R; a la par se amplificó un fragmento del ARNm de actina como control de expresión endógena de todos los sistemas antes mencionados. El producto resultante se visualizó en gel de agarosa adicionado con bromuro de etidio bajo luz UV de lo que se obtuvieron bandas de acuerdo al peso de ambas secuencias, el σ 1R con 332 pb y actina con 700 pb (Fig. 6).

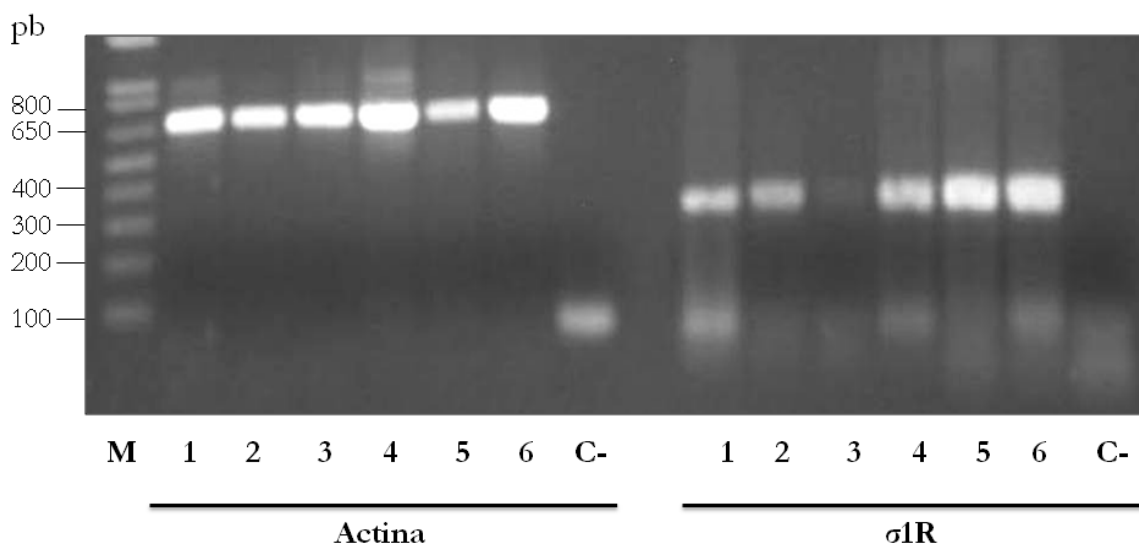


Fig. 6. *Detección del ARNm del σ 1R y actina.* Productos de amplificación obtenidos por RT-PCR para un segmento del ARNm de actina y del σ 1R en: (1) cerebelo (control positivo de expresión para el σ 1R), (2) DRG, (3) TG, (4) HEK293 Adherentes, (5) HEK293T, (6) células F11, (C-) Control Negativo de PCR.

Los resultados muestran al ARNm correspondiente al σ 1R en todos los sistemas evaluados (fig. 6), lo que indica la posibilidad de encontrar la expresión del σ 1R a nivel de proteína.

Para comprobar la expresión del σ 1R a nivel de proteína se obtuvieron extractos de proteína total solubilizada (PT) de los tejidos y líneas celulares antes mencionados y fueron evaluados por ensayos de WB. Se utilizó para esto un anticuerpo específico para la inmunodetección del σ 1R, el cual reconoce un epítoto localizado en una región interna de esta proteína, se detectaron bandas específicas para el σ 1R en todos los sistemas de interés (fig. 7); como control de carga se realizó la inmunodetección de la proteína de expresión endógena Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

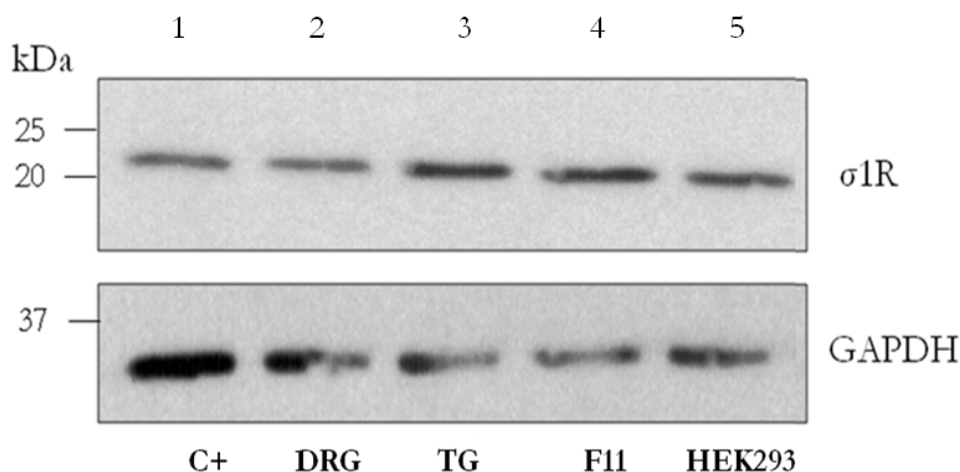


Fig. 7. **Detección de la expresión del σ 1R a nivel de proteína.** A partir de la técnica de WB se realizó la inmunodetección de la proteína del σ 1R en todos los sistemas de interés, (1) Cerebelo (control positivo de expresión del σ 1R), (2) DRG, (3) TG, (4) F11 y (5) HEK293 Adherentes. En el panel inferior se muestra la inmunodetección de GAPDH como control de carga.

Una vez que se confirmó que el σ 1R se encuentra a nivel de proteína en los tejidos donde se expresa de forma endógena TRPV1 y en las líneas celulares en las cuales se expresa transitoriamente a este canal, es posible determinar si al afectar la actividad del σ 1R existe alguna repercusión sobre el canal TRPV1.

5.2. **Inhibición de σ 1R y su efecto sobre el canal TRPV1.**

Para determinar si existe relación entre el σ 1R y el canal TRPV1, se decidió hacer uso de un compuesto antagonista del σ 1R, el BD1063 (referido de ahora en adelante como BD), este antagonista interacciona directamente con el σ 1R con lo que evita que esta proteína se disocie del complejo proteínico que forma con la chaperona BiP en el RE y por lo tanto evita que pueda interactuar con el IP3R (para así modular los niveles de Ca^{+2} intracelular) (Tsai *et al.*, 2009). Se decidió determinar si en los cultivos la incubación por 24 h del antagonista para el σ 1R afectaba

los niveles de proteína total del canal TRPV1 de origen de rata (rTRPV1). Para esto, las células con expresión transitoria de rTRPV1 fueron incubadas con dos concentraciones de BD (1 μ M, 25 μ M) durante 24 h, de estos cultivos se obtuvo la proteína total y se evaluaron los niveles de rTRPV1 por medio de WB. La señal observada fue específica para el canal rTRPV1 y se normalizó de acuerdo a la señal obtenida con el control de carga (inmunodetección de GAPDH). Para realizar las comparaciones de los niveles de proteína se realizó el análisis de las densitometrías de cada una de las bandas mediante el programa ImageJ, determinándose el área bajo la curva de la señal correspondiente a TRPV1 de cultivos control (extractos proteínicos de cultivos incubados con el 0.25% de agua que corresponde al vehículo de BD), normalizándola con respecto al control de carga (GAPDH) y considerándola como el 100% de niveles de proteína total de rTRPV1. Los valores obtenidos de las muestras sometidas a cada tratamiento fueron comparados con respecto al 100% asignado a la muestra control (% de proteína total relativos a los niveles del control). Con este análisis se encontró que las células tratadas con BD presentan disminución de sus niveles de proteína total del canal rTRPV1 en un $30\% \pm 10.57$ con el tratamiento de 1 μ M y del $40\% \pm 8.86$ en los cultivos tratados con 25 μ M de BD con respecto al control (fig. 8), al realizar el análisis estadístico con la prueba de *t-student*, estas diferencias resultaron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.01$.

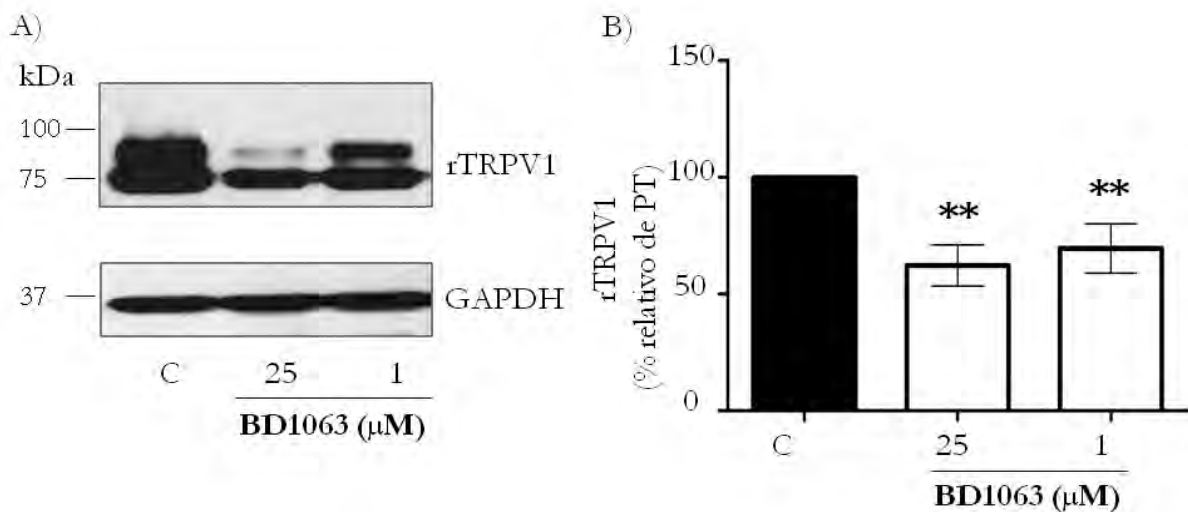


Fig. 8. **Disminución de los niveles de proteína total de rTRPV1 por antagonismo del $\sigma 1R$ durante 24 h.** A) WB que muestra el efecto de la incubación por 24 h con BD sobre los niveles de proteína total del canal TRPV1. B) La gráfica muestra la disminución de los niveles de proteína total del canal rTRPV1 respecto al control (c), la cual es de alrededor del $40\% \pm 8.86$ (25 μ M) y del $30\% \pm 10.57$ (1 μ M). Se realizó prueba de *t-student* con una $**p < 0.01$ en una n de 6.

Los resultados indican que la incubación con un antagonista específico del σ 1R (BD1063) durante 24 h disminuye los niveles de proteína total de TRPV1 respecto al control; además los resultados sugieren la existencia de una estrecha relación entre el σ 1R y el canal TRPV1 de origen de rata, de tal modo, que al bloquear al σ 1R resulta clara la disminución de los niveles de proteína de rTRPV1. En este punto resultó importante determinar si este efecto se conserva entre especies, es decir, si al bloquear al σ 1R se afectaba también los niveles de proteína total de TRPV1 de origen de humano (hTRPV1). Para ello se realizó la expresión transitoria del canal hTRPV1 en las células HEK293 y se procedió a darles el mismo tratamiento con BD por 24 h (1 μ M, 25 μ M), se obtuvieron los extractos de PT y se detectaron los niveles de hTRPV1. El resultado obtenido muestra disminución en la señal correspondiente al canal hTRPV1 en las células tratadas con las dos concentraciones de BD con respecto al control. Al realizar el análisis de las densitometrías y las normalizaciones con el control de carga se comprobó que existe diferencia significativa entre los niveles de proteína de hTRPV1 entre el control y los tratamientos en los que la señal del canal disminuye alrededor del 40% (1 μ M 40% \pm 12.37 y 25 μ M 40% \pm 6.89) en las células tratadas con ambas concentraciones de BD, esto en comparación del control, $p < 0.01$ (fig. 9).

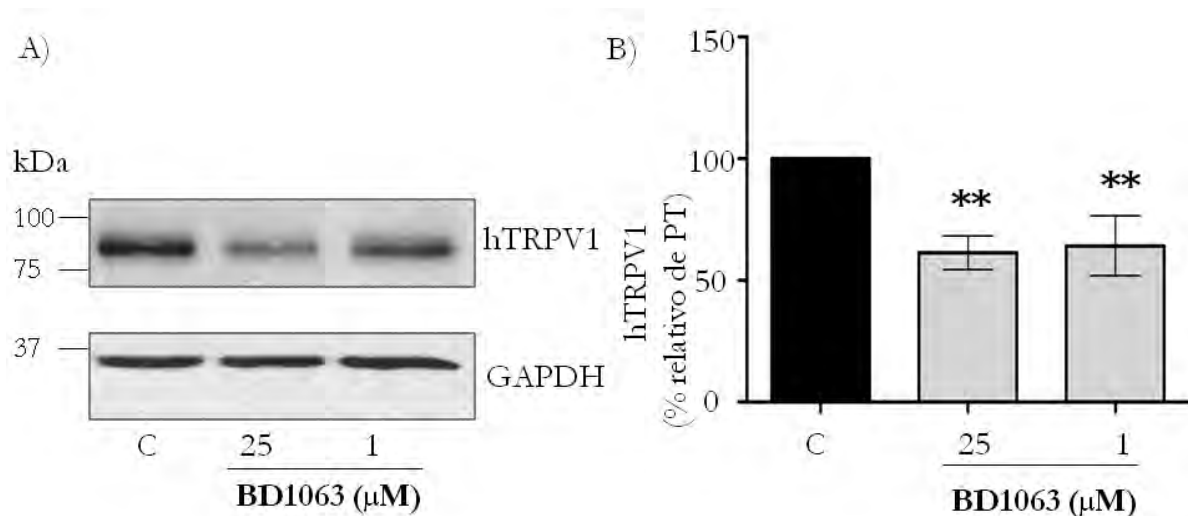


Fig. 9. **Disminución de los niveles de proteína total de hTRPV1 por inhibición del σ 1R durante 24 h.** A) WB que muestra el efecto sobre hTRPV1 de la incubación por 24 h con BD. B) Gráfica que muestra la disminución de los niveles de proteína total del canal hTRPV1 respecto al control (c), la cual es igual para ambas concentraciones (1 μ M 40% \pm 12.37 y 25 μ M 40% \pm 6.89). Se realizó prueba de *t-student* con un valor de $**p < 0.01$ en una n de 6.

5.3. El antagonismo del σ 1R altera los niveles de TRPV1 en membrana plasmática

Para determinar si la disminución en los niveles de proteína total del canal TRPV1 por efecto de la inhibición del σ 1R repercute directamente en la cantidad de estos canales que se encuentran en la

membrana plasmática, localización celular donde el canal TRPV1 ejerce principalmente su función, se realizaron ensayos para el aislamiento de proteínas de superficie celular. Para ello se utilizó un reactivo de biotilación (sulfo-NHS-SS-biotina) el cual no permea al interior de las células y se une a las lisinas accesibles y de exposición extracelular de las proteínas de membrana plasmática con lo que permite aislarlas.

Se utilizaron cultivos con la expresión transitoria de rTRPV1 ó de hTRPV1 que se incubaron con 25 μ M de BD y con el vehículo de BD (C) durante 24 h. Se incubó con una solución de marcaje con biotina para posteriormente separar solo a las proteínas biotiladas mediante el uso de perlas de agarosa acopladas a estreptavidina. Finalmente las proteínas purificadas fueron analizadas por medio de WB para la identificación de las bandas correspondientes al canal TRPV1 de superficie celular, usando como control de carga la identificación de la proteína de membrana plasmática la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ y como control de pureza se consideró la ausencia de la proteína de retículo endoplasmático calnexina (fig. 10).

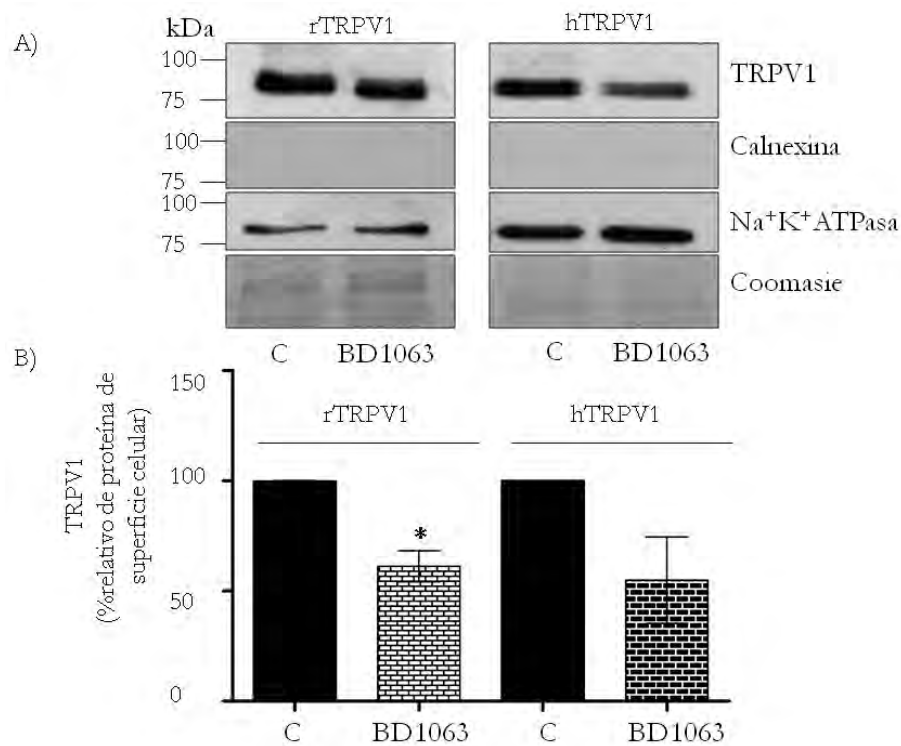


Fig. 10. **Determinación de los niveles del canal TRPV1 en membrana plasmática por efecto del antagonista del $\sigma 1R$.** El bloqueo del $\sigma 1R$ resultó en la disminución en la cantidad de canales TRPV1 en membrana plasmática. A) La detección por WB de: $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ (control de carga), Calnexina (como control de pureza que demuestra que las proteínas de membrana plasmática están libres de proteína de retículo endoplasmático). B) Gráficas del análisis de las densitometrías de la señal para el canal TRPV1 que se normalizó con respecto al control de carga (ATPasa para PM) y muestra control (C) contra el tratamiento (BD1063). Se realizó prueba de *t-student* con un valor de $*P < 0.05$ en una n de 3 para rTRPV1, se realizó n de 2 para hTRPV1.

Estos resultados mostraron que al inhibir a σ 1R no tan solo disminuyen los niveles de proteína total del canal TRPV1, más aún disminuye la cantidad de canales TRPV1 de origen de humano (54.86 ± 19.6) y de rata (61.22 ± 6.9) presentes en la superficie celular, sitio en el cual este canal ejerce su función principal como canal iónico.

5.4. Evaluación de la posible interacción entre el canal TRPV1 y el σ 1R.

Con el fin de determinar si existe interacción entre el canal TRPV1 y el σ 1R, se realizaron ensayos en los cuales se inmunoprecipitó el canal TRPV1 y se evaluó por WB si había coimmunoprecipitación de estas proteínas. Se utilizaron extractos de PT de células HEK293 con expresión transitoria del canal rTRPV1. Los resultados de WB mostraron inmunoprecipitación del canal TRPV1, sin embargo no se observó que la proteína σ 1R co-inmunoprecipitara con el canal (fig. 11).

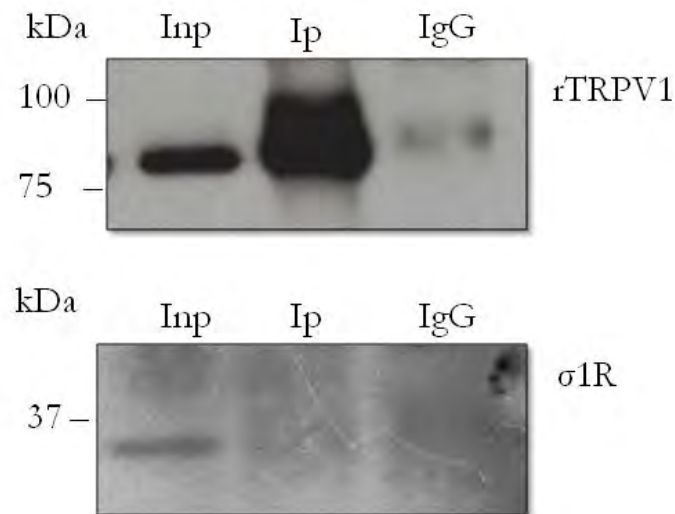


Fig. 11. **Immunoprecipitación de TRPV1 y el σ 1R.** Los ensayos no aportan evidencia de interacción física entre ambas proteínas ya que si se observa señal para TRPV1 (panel superior) pero no para el σ 1R (panel inferior). Inp: input. Ip. Inmunoprecipitado. IgG: anticuerpo irrelevante.

Estos resultados indican claramente, que en condiciones basales no existe interacción física entre ambas proteínas (canal rTRPV1 y el σ 1R), sin embargo, nos preguntamos si estas proteínas tenían localización celular cercana. Es por ello que se realizaron inmunocitoquímicas para colocalizar el canal rTRPV1 y al σ 1R. Para la detección por fluorescencia del canal TRPV1 se realizaron transfecciones transitorias de las células HEK293 con una proteína de fusión del canal rTRPV1

con una variante de la proteína amarilla fluorescente (citrina). Para la detección del $\sigma 1R$ se usó el anticuerpo primario anti $\sigma 1R$ y el anticuerpo secundario acoplado al fluoroforo Cy5. Los resultados muestran nula colocalización entre ambas proteínas (fig. 12).

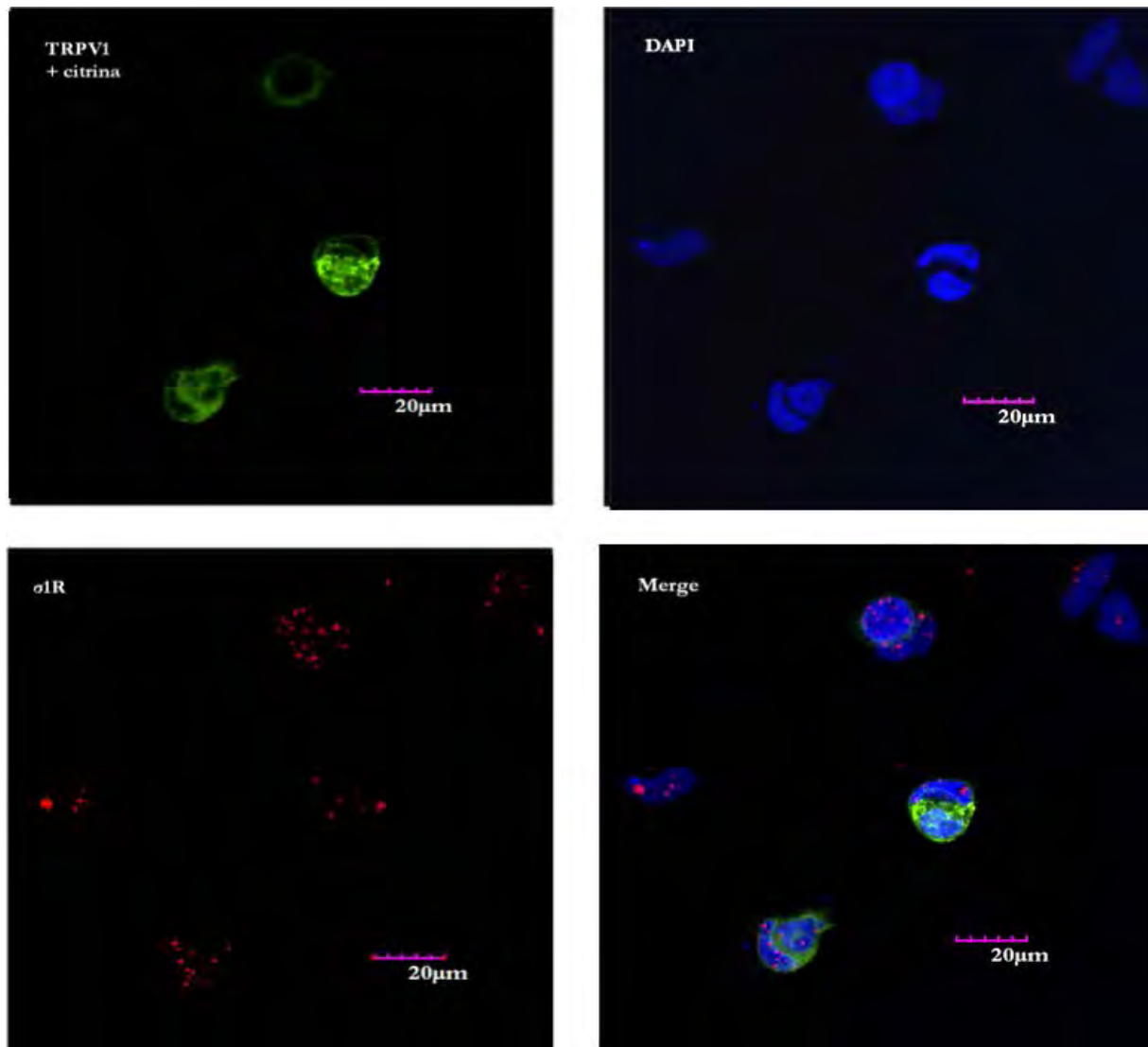


Fig. 12. *Inmunocitoquímica para la localización del $\sigma 1R$* . Imágenes obtenidas mediante microscopia confocal en las que se muestra la detección del canal rTRPV1 fusionado con citrina (verde), de los núcleos mediante DAPI (azul), del $\sigma 1R$ acoplado a Cy5 (rojo) y el *merge*, en ese orden.

Por medio de estos ensayos de fluorescencia se pudo observar también la disminución de la señal para la proteína TRPV1 por efecto del tratamiento con 25 μM del antagonista del $\sigma 1R$ durante 24 h (fig. 13).

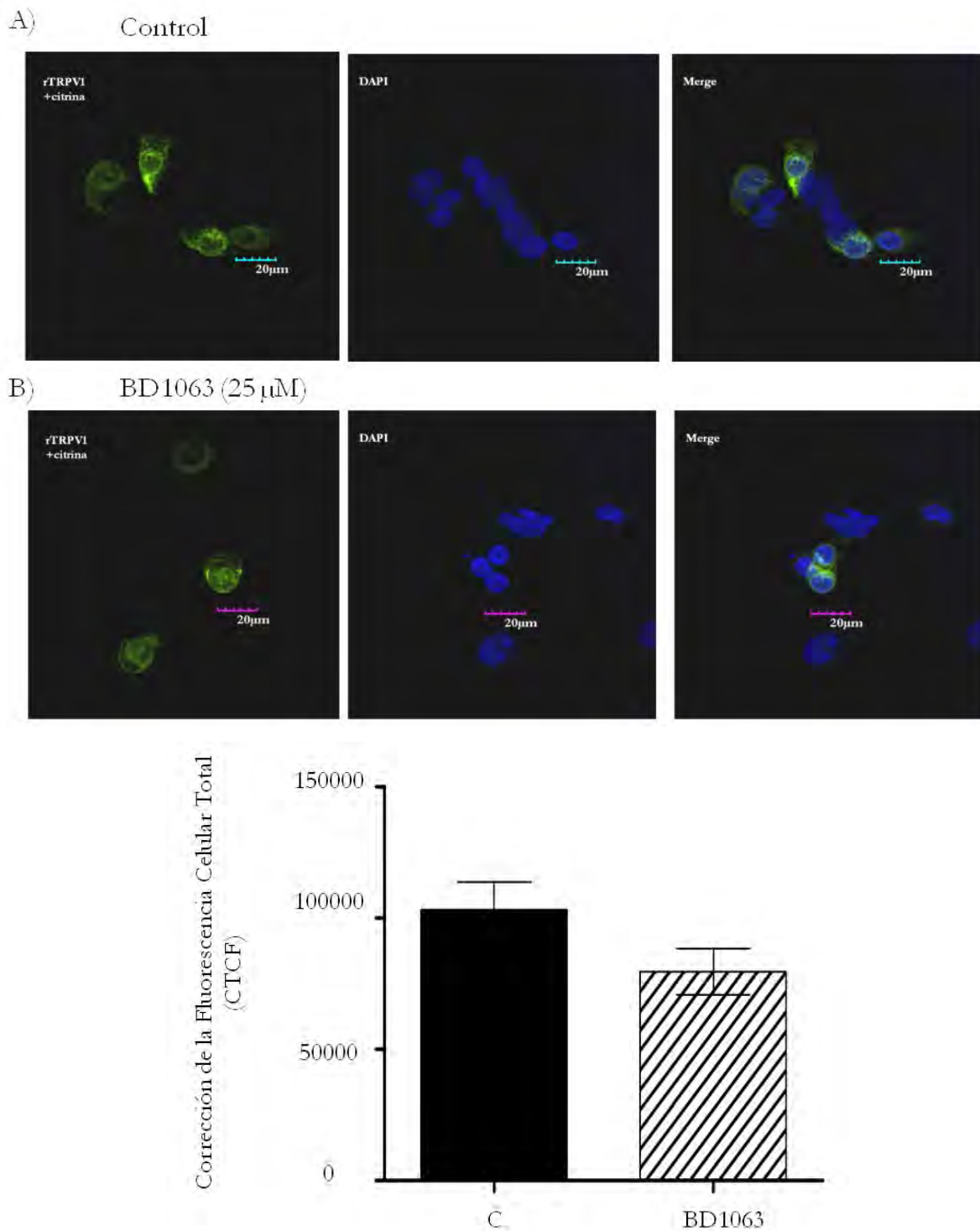


Fig. 13. **Detección de la tendencia de disminución de los niveles proteínicos del canal rTRPV1-citrina por incubación con el antagonista del $\sigma 1R$.** A) Las células transfectadas con rTRPV1 fusionado con citrina control tienen mayor fluorescencia que B) células de iguales características que fueron incubadas con el antagonista del $\sigma 1R$ por 24 h. C) Este efecto se comprueba al comparar la fluorescencia total celular o CTCF (Control 113213 \pm 10626 Vs tratamiento con 87723 \pm 8802) n de 3 campos por tratamiento.

5.5. El antagonismo del σ 1R promueve la degradación del canal TRPV1

Los resultados obtenidos muestran claramente la disminución de los niveles proteínicos del canal TRPV1 por efecto de la inhibición del σ 1R (figura 8, 9 y 10). Debido a que el sistema de expresión del canal TRPV1 utilizado en las células HEK293 consiste en la construcción de ADN que sólo contiene la secuencia codificante del canal TRPV1 y cuya expresión es dirigida por el promotor CMV, se excluye la posibilidad de que el efecto observado sea a nivel transcripcional, es por ello que se decidió evaluar si el bloqueo al σ 1R está promoviendo la degradación proteínica del canal TRPV1. Para ello se exploró si alguna de las vías de degradación proteica como la del proteosoma o la del lisosoma eran las involucradas en la disminución de la proteína TRPV1. Para ello las vías fueron inhibidas mediante el tratamiento con los compuestos MG132 y cloroquina (inhibición del proteosoma y del lisosoma respectivamente). Para estos experimentos se utilizaron células con la expresión transitoria de rTRPV1 en los cuales se dio tratamiento con 25 μ M de BD1063 por 24 h, de las cuales las ultimas 6 h se incubaron conjuntamente con MG132 (25 μ M) o Cloroquina (200 μ g). Las muestras fueron evaluadas por medio de WB, observándose que el tratamiento con BD disminuye en un $30\% \pm 6.05$ con respecto al control y que el tratamiento con el inhibidor del proteosoma (MG132) revierte el efecto del tratamiento con el antagonista del σ 1R (señal de alrededor del $98.03\% \pm 14.88$ respecto al control), es decir se recuperan los niveles de proteína total del canal TRPV1 (fig. 14).

En el caso del tratamiento con cloroquina, se observó la disminución de la proteína total del canal TRPV1 por efecto del tratamiento con BD ($30\% \pm 5.76$ con respecto al control), pero no se observó recuperación de la proteína TRPV1, por el contrario se observó que el tratamiento disminuyó aún más los niveles de proteína del canal TRPV1 (24.61 ± 1.02).

Los resultados obtenidos sugieren que la incubación por 24 h con el antagonista del σ 1R lleva a la degradación de TRPV1 por la vía del proteosoma.

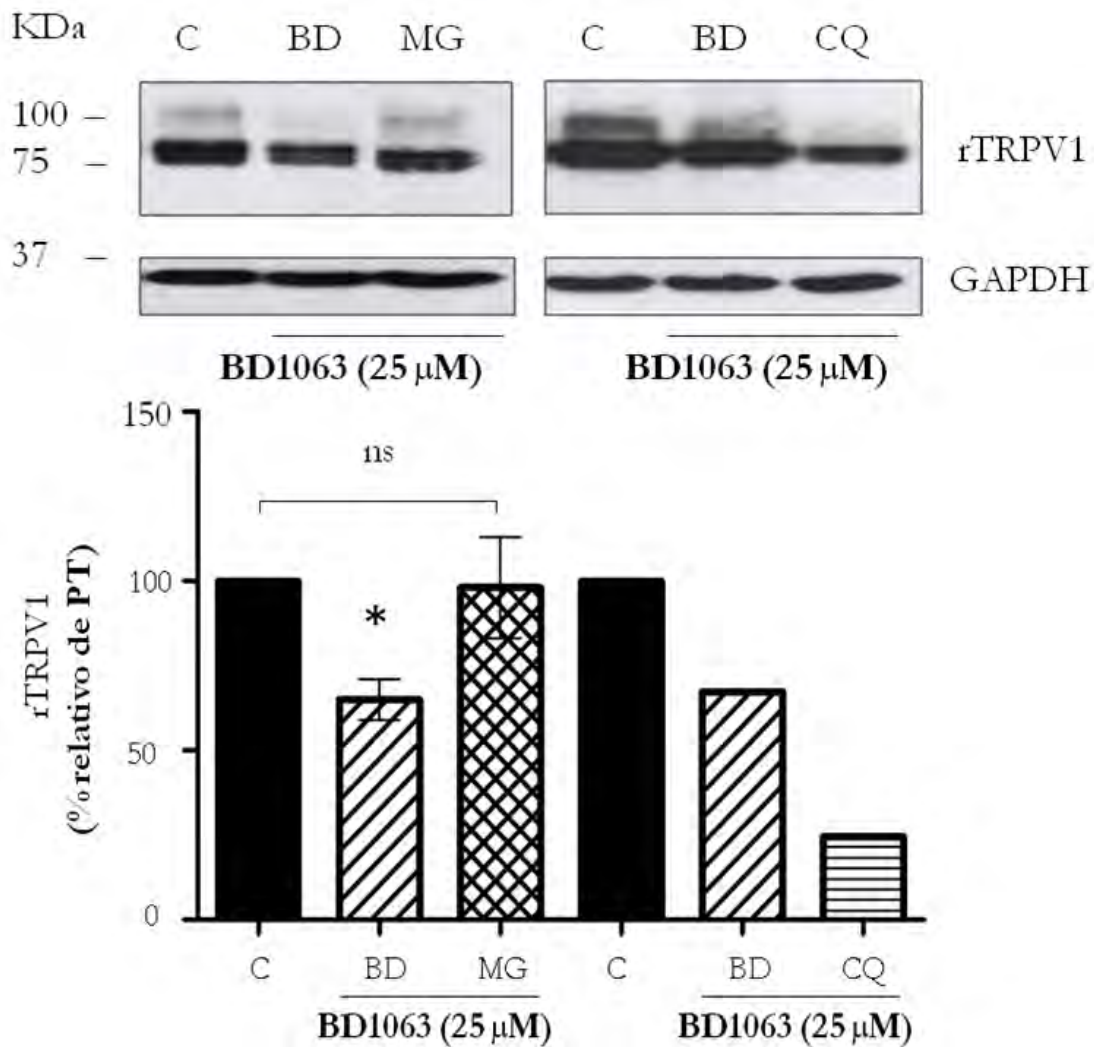


Fig. 14. **Rescate de los niveles de proteína total de rTRPV1 con inhibidores de degradación.**
 A) Los niveles de proteína total del canal disminuyen con la exposición a BD en un $30\% \pm 6.05$ y al aplicar el inhibidor del proteosoma se recupera la expresión obteniendo señal similar al control ($98.03\% \pm 14.88$), mientras que al adicionar CQ se acentúa la pérdida de proteína. B) Al comparar el área de las bandas se comprueba esta recuperación al adicionar MG. Se realizó prueba de *t-student* con una $*p < 0.05$ respecto al control con n de 3 para el tratamiento con MG y n de 2 para CQ.

5.6. *El antagonismo del $\sigma 1R$ en el sistema de expresión endógeno afecta la nocicepción mediada por el canal TRPV1.*

Los datos obtenidos hasta este punto sugieren claramente efecto del antagonismo de $\sigma 1R$ en los niveles de proteína del canal TRPV1 ya sea de origen de rata o de humano. La siguiente pregunta a responder, fue si este efecto se observaba en ratones C57BL/6J tratados a nivel sistémico con el inhibidor del $\sigma 1R$.

Para este fin se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6J que fueron inyectados subcutáneamente en la zona de las escápulas con BD (32 mg/Kg), pasadas 24 h los animales fueron

sacrificados para la obtención de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de la región lumbar. Se obtuvieron los extractos de proteína total para evaluar por WB el efecto sobre los niveles de proteína del canal TRPV1 (fig. 15). El resultado muestra que también en el sistema de expresión endógeno del canal (DRG) se observa disminución del $30\% \pm 6.15$ en la proteína total del canal TRPV1 ante el tratamiento con el inhibidor del $\sigma 1R$ (fig. 16).

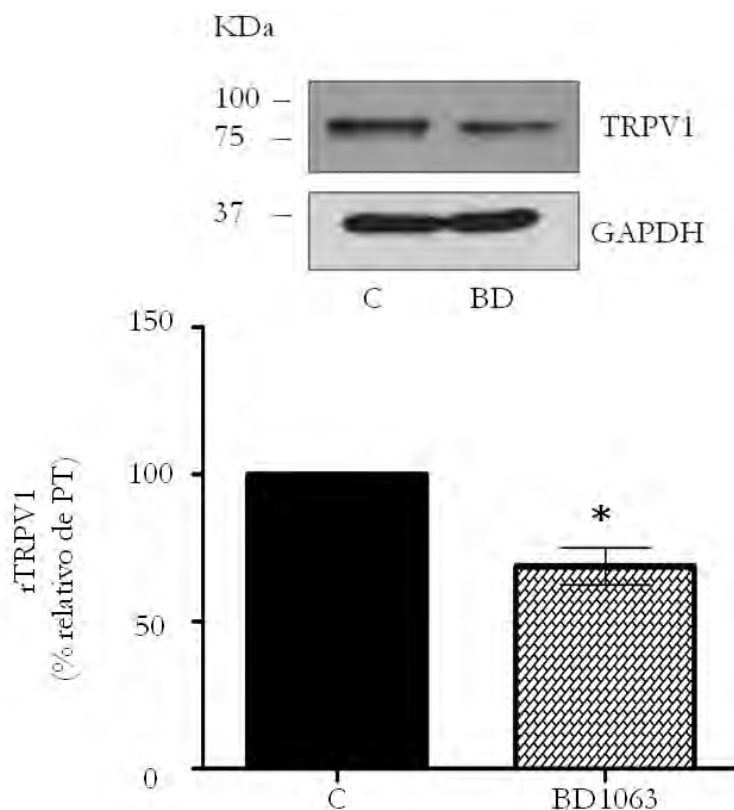


Fig. 15. **Niveles de proteína total de TRPV1 en DRG lumbar de ratón tratado con BD por 24 h.** En el panel superior las bandas de TRPV1 obtenidas de las DRG extraídas de ratón disminuyen al tratar con el antagonista del $\sigma 1R$ a los animales por 24 h. En el panel inferior se muestran graficados los niveles de proteína del canal luego del tratamiento, que resulta ser $30\% \pm 6.15$ menor respecto al control. Se realizó prueba de *t-student* con una $*p < 0.05$ respecto al control en una n de 3 por grupo.

Una vez comprobado el efecto del bloqueo del $\sigma 1R$ sobre los niveles proteínicos de TRPV1 a nivel sistémico en los ratones, se planteó la posibilidad de observar un efecto fisiológico. Para evaluar el efecto en la conducta de dolor se utilizaron ratones machos adultos (8-10 semanas) que fueron primero inyectados subcutáneamente en la zona de las escápulas con BD (32 mg/Kg) o con el vehículo de BD (agua, Vh) y pasadas 24 h del tratamiento fueron sometidos a ensayos de lamido de la pata para la evaluación del dolor agudo ocasionado por la administración intradérmica de capsaicina (2.8 μg en solución salina) o el vehículo de la capsaicina (1.4% etanol en solución salina, EtOH) en el cojinete de la extremidad anterior (inyección intraplantar). Estos animales se

observaron durante los 10 min siguientes a la inyección con capsaicina o de etanol (vehículo de capsaicina) para registrar el tiempo de lamido de la extremidad, como clara evidencia de dolor.

El primer grupo evaluado consistió en el grupo control, en el cual los animales fueron pre inyectados subcutáneamente con el vehículo del BD y posterior a 24 h se les inyectó intradérmicamente 1.4% de etanol en el cojinete de la extremidad delantera, en este grupo se observó muy poca respuesta de dolor (15 ± 2.02 s), indicando que ninguna de las inyecciones de los vehículos altera la respuesta de dolor. Posteriormente, se evaluó la respuesta de dolor en el segundo grupo de animales pre inyectados subcutáneamente con el vehículo de BD (agua) y 24 h después se realizó la inyección intradérmica de capsaicina, observándose una clara respuesta de dolor agudo (47.57 ± 5.17 s). Finalmente, el tercer grupo evaluado consistió en animales pre inyectados subcutáneamente con 32 mg/Kg de BD y 24 h después se realizó la inyección intradérmica de capsaicina, observándose disminución del tiempo de lamido con respecto al grupo 2 (grupo 2: 47.57 ± 5.17 s vs grupo 3: 22.77 ± 3.53 s) la cual resultado ser estadísticamente significativa (fig. 16).

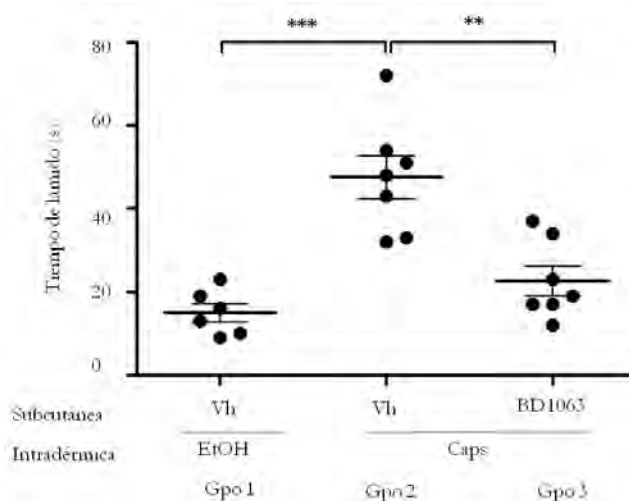


Fig. 16. **Conducta de dolor en animales tratados con BD 24 h previas.** Se muestra en la gráfica a cada animal usado para ensayo de conducta representado por un punto, se muestra la media de cada grupo y su error estándar. Se registró menor dolor (15 ± 2.20 s) en los animales del grupo 1, inyectados únicamente con los vehículos (Vh). El grupo 2 que fue inyectado subcutáneamente con vehículo e intradérmicamente con capsaicina presentó mayor dolor (47.57 ± 5.17 s) que todos los grupos mientras que el grupo 3, que recibió la inyección subcutánea con BD (32 mg/Kg) 24 h antes de la intradérmica presentó poco dolor (22.77 ± 3.53 s). Se utilizó n de 6 o 7 animales por grupo y se realizó prueba de *t-student* con un valor de $***p < 0.005$.

Los resultados muestran la disminución de dolor en los animales que fueron tratados con el antagonista de $\sigma 1R$ en comparación con aquellos que solo recibieron el vehículo.

6. Discusión.

Las neuronas sensoriales transmiten señales para la detección de las condiciones del ambiente que pueden ser nocivas (Hille, 2001), esto es fundamental para la sobrevivencia de los organismos, como sucede por ejemplo con los estímulos detectados por el canal TRPV1, un miembro de la subfamilia vaniloide que forma parte de la gran familia de canales TRP (Caterina *et al.*, 1997) que se caracteriza por su carácter polimodal y su capacidad de sensibilizarse disminuyendo el umbral de activación (Rosenbaum y Simon, 2007), hecho que resulta de gran importancia en la generación de dolor en neuropatías tales como la neuropatía diabética, la irritación intestinal, la artritis y el cáncer (Nilius y Flockerzi, 2014). Por las implicaciones de TRPV1 en la salud humana se le considera un blanco de estudio sobre el cual se ha planteado generar nuevas estrategias que detengan los efectos producidos por este portal del dolor (Caterina *et al.*, 1997; Su *et al.*, 2010; Morales-Lázaro *et al.*, 2013).

Recientemente se ha incrementado el interés en las proteínas intracelulares implicadas en la activación o la localización del canal TRPV1, una de ellas es la chaperona llamada receptor sigma 1 ($\sigma 1R$); la cual presenta propiedades especiales ya que es la única chaperona que puede ser modulada por diversos ligandos (Hayashi y Su, 2007) y participa de manera importante en la nocicepción (Bangaru *et al.*, 2013; Bae *et al.*, 2009; Entrena *et al.*, 2009); justamente en el campo de la analgesia esta chaperona ha sido considerada un blanco terapéutico (Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013) ya que sus antagonistas disminuyen el dolor y acentúan la analgesia de otras drogas (Kwon *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2012) mientras, que sus agonistas atenúan la analgesia e incluso pueden generar dolor espontáneo (Xiao-Fei *et al.*, 2012; Zamanillo *et al.*, 2013). En animales KO- $\sigma 1R$ la sensibilización con capsaicina genera menos dolor que en animales silvestres (Entrena *et al.*, 2009), del mismo modo la administración de antagonistas para el $\sigma 1R$ pueden atenuar el dolor de ratas administradas con capsaicina en un modelo de inducción de migraña (Bae *et al.*, 2009), la capsaicina activa de forma específica al canal TRPV1 por lo que estos estudios aportan evidencia sobre el papel del $\sigma 1R$ en la nocicepción mediante la actividad del canal TRPV1, sin embargo actualmente no existen estudios que expliquen los mecanismos moleculares de esta conducta, de allí la importancia del presente trabajo el cual busca aproximarse a dicho problema. Para determinar la naturaleza de la relación entre TRPV1 y el $\sigma 1R$, en primer lugar se ubicó la expresión de ambas proteínas en los mismos sitios, identificando al $\sigma 1R$ a nivel de ARNm y

proteína en tejidos de ratón que de forma endógena expresan al canal TRPV1 (fig. 6 y 7), los ganglios trigeminales y los ganglios de la raíz dorsal, este último tejido al encontrar una mejor señal fue seleccionado para ensayos posteriores. Se detectó también en las líneas celulares donde habitualmente el canal TRPV1 es expresado de manera transitoria para su estudio, células HEK293 y F11 (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998). Tal como lo describe la literatura el σ 1R se expresa de forma ubicua (Cobos *et al.*, 2008; Crottès *et al.*, 2013) pero además su detección en las líneas HEK293 y F11 aporta dos modelos útiles para estudios posteriores de la relación de esta proteína con el canal TRPV1.

Una vez determinado que el σ 1R se expresa a nivel de proteína en células HEK293 se utilizó esta línea como sistema de expresión transitoria para el canal TRPV1, para explorar la relación entre estas proteínas se hizo uso de un antagonista selectivo para el σ 1R conocido como BD1063. Este antagonista se une al σ 1R con lo que evita su disociación de BiP (Tsai *et al.*, 2009).

Como resultado de las incubaciones de 24 h con el antagonista del σ 1R se detectó que los niveles de proteína del canal rTRPV1 disminuyen (fig. 8).

La disminución de los niveles de proteína de TRPV1 no solo se observó en el canal de origen de rata, igualmente se detectó en el de origen humano (Fig. 9), lo que indica que el mecanismo que se desencadena por la incubación con el antagonista afecta al canal TRPV1 independientemente de la especie. Adicionalmente se observó tendencia a la dosis dependencia del BD para ejercer su efecto sobre la abundancia del canal TRPV1.

Un aspecto importante para la función del canal TRPV1 como nociceptor es su localización en membrana plasmática. Por ello, se decidió evaluar si la disminución en los niveles de proteína total por el tratamiento con el BD tenían una repercusión en la cantidad de canales en superficie celular y mediante el marcaje con biotina de las proteínas de membrana plasmática se pudo observar que el tratamiento con el inhibidor reduce de manera considerable la cantidad de canales rTRPV1 y hTRPV1 (Fig. 10), sugiriendo el posible impacto de esta disminución en la capacidad nociceptiva. Ya que el σ 1R actúa como chaperona molecular que participa del adecuado plegamiento de proteínas se buscó determinar si su efecto sobre el canal TRPV1, se debe a la interrupción de una interacción física, dado que el σ 1R participa de numerosas asociaciones (Su *et al.*, 2016) sin embargo, los ensayos de inmunoprecipitación en células sin tratamiento, no aportaron evidencia de que esto suceda con TRPV1 y el σ 1R en condiciones basales (Fig. 11). Del mismo modo los ensayos de inmunocitoquímicas no mostraron evidencia de que la localización celular de TRPV1 y el σ 1R fuese cercana (Fig. 12). Sin embargo, este efecto puede deberse a la baja señal del σ 1R ya que al modificar cada una de las imágenes (por ejemplo incrementando el brillo de cada señal fluorescente) se detectaron indicios de colocalización, por lo que es necesario profundizar al

respecto en estudios posteriores. Por otra parte gracias a esta técnica se obtuvo evidencia adicional de la disminución del canal TRPV1 por el antagonismo del σ 1R, ya que la fluorescencia emitida por la citrina, con la que esta fusionada el canal, tiende a ser menor en los cultivos incubados por 24 h con BD respecto a los controles (Fig. 13). A pesar de que en condiciones basales no se encontró una interacción entre el canal TRPV1 y el σ 1R, la disminución de los niveles proteínicos de TRPV1 por la incubación con BD apoya la relación que tiene con el σ 1R y sugiere al mismo tiempo la posibilidad de que se desencadenen procesos de degradación como consecuencia del tratamiento. En este sentido se determinó que la degradación ocurre por la vía del proteosoma (Fig. 14) ya que la adición del inhibidor de esta vía, el MG132, es capaz de recuperar los niveles de proteína total del canal TRPV1, inclusive este tratamiento y el control no presentan diferencia significativa. Lo que coincide con los numerosos reportes sobre las propiedades protectoras del σ 1R (Hayashi, 2015; Ruscher y Wieloch, 2015; Nguyen *et al.*, 2015) y con el hecho de que su sobreexpresión disminuye la actividad del proteosoma (Miki, *et al.*, 2015). En el caso del tratamiento con cloroquina por el contrario se observó una mayor disminución de los niveles de proteína del canal TRPV1, pese a que se ha reportado a la cloroquina como un posible agonista para el σ 1R sin embargo, también se registró que esta sustancia puede inducir la muerte celular (Hirata *et al.*, 2011).

La disminución de la cantidad de proteína TRPV1 sugiere la posibilidad de observar una respuesta fisiológica en un organismo completo y sobre todo complejo, es decir en el sistema de expresión endógeno; esto se confirmó mediante la extracción de ganglios de la raíz dorsal de ratones, tratados 24 h antes con BD, sistema biológico en el que se encontró disminución de la cantidad de proteína TRPV1 (fig. 15), evidencia que confirma que el efecto es independiente de la especie (TRPV1 de rata, ratón y humano se ven afectados por el tratamiento con BD), pero sobre todo demuestran que a nivel sistémico es posible usar al antagonista del σ 1R para disminuir la cantidad de canales TRPV1, por lo tanto atenuar la transducción de señales nocivas originadas por la activación de este canal. Los cambios en la abundancia del canal, nos indicó la posibilidad de ver un efecto de atenuación de la conducta de dolor.

La administración de BD subcutáneamente en la zona de las escapulas de los animales, 24 h previas a los ensayos de dolor agudo demostraron que el tratamiento disminuye el dolor evocado por capsaicina (Fig.16). Este hecho es parecido al efecto de otros antagonistas de σ 1R como el BD1047 y NE100, que también son capaces de atenuar el dolor en tiempos cortos, en los que su administración subcutánea disminuye el dolor luego de la aplicación (Entrena *et al.*, 2009) lo que puede estar relacionado con modificaciones del canal que lleven a disminuir su sensibilidad; de forma semejante la administración de agonistas selectivos para el σ 1R, por ejemplo PRE-084 pueden inducir la fosforilación de una de las subunidades del receptor N-metil-D-aspartato

(NMDA) por la activación de PKC y PKA ocasionando incrementó de las corrientes de Ca^{2+} y generando dolor espontáneo en los animales tratados (Kim *et al.*, 2008). De forma contraria procesos como la desfosforilación mediante la actividad de fosfatasas dependientes de calcio como la calcineurina disminuyen la respuesta ante estímulos dolorosos (Jung *et al.*, 2004; Szallasi y Blumberg, 2007).

Atribuir la disminución del canal TRPV1 a la interrupción de un papel específico del $\sigma 1\text{R}$ como consecuencia de la administración del BD es complejo, ya que esta chaperona participa en numerosas funciones. Algunos de los procesos que pueden ser responsables de este resultado son la acumulación de productos como las especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocasionen daños al canal (Schwartz *et al.*, 2008; Hayashi, 2015), el cambio en la regulación de la osmosis de Ca^{2+} que ocasione la degradación (Görlach *et al.*, 2015), la regulación del tráfico de proteínas de membrana (Phan *et al.*, 2003; Hayashi y Su, 2007; Matsumoto, 2007; Maurice *et al.*, 2001; Mavlyutov *et al.*, 2015), la interrupción de la asociación de ambas proteínas en la membrana plasmática (Aydar *et al.*, 2002; Lupardus *et al.*, 2000; Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016) o bien como consecuencia del mal plegamiento de TRPV1 al no estar activo el $\sigma 1\text{R}$ (Hayashi, 2015).

A pesar de que presumiblemente el $\sigma 1\text{R}$ no presenta actividad en condiciones basales por encontrarse asociada a BIP, de la cual solo se disocia en condiciones de estrés (Fujimoto y Hayashi, 2011) todavía se discute mucho al respecto ya que no se conoce con detalle el funcionamiento del $\sigma 1\text{R}$. Algunos datos respecto a su actividad son incluso contradictorios, por ejemplo al unirse a IP3R lo estabiliza y permite que se incremente el flujo de Ca^{2+} del RE al citosol (Tsai *et al.*, 2009) con lo que se genera una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (Clapham, 2003), sin embargo, está reportado que la actividad del $\sigma 1\text{R}$ disminuye indirectamente los niveles de ROS en el citosol (Schwartz *et al.*, 2008; Hayashi, 2015). Por este motivo aun no queda del todo clara la influencia del $\sigma 1\text{R}$ en el control del Ca^{2+} del RE, y es posible que la adición de un antagonista al interactuar directamente con el $\sigma 1\text{R}$ lleve a la liberación de Ca^{2+} desde el RE, flujos que pueden mimetizar la entrada del ión por el canal TRPV1 llegando así a desensibilizarlo y eventualmente a propiciar su degradación (Jung *et al.*, 2004; Szallasi y Blumberg, 2007).

Por otra parte la regulación del tráfico de TRPV1 a membrana plasmática así como la influencia en su correcto plegamiento por actividad del $\sigma 1\text{R}$ implican la posibilidad de encontrar a ambas proteínas asociadas, de forma semejante a lo que ocurre con $\text{Kv}\beta 2$, una subunidad de los canales de K^+ que puede inducir el incremento de la expresión del canal (Bavassano *et al.*, 2013). A pesar de que no se encontró evidencia de la asociación física entre el $\sigma 1\text{R}$ y TRPV1 por inmunoprecipitación o por inmunocitoquímica no puede descartarse esta posibilidad ya que son

numerosas las proteínas con las que se encuentra asociado a el σ 1R (Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013), en este aspecto algunas interacciones como las que forma con canales de K^+ permiten su adecuado plegamiento (Hayashi, 2015). A pesar de que existe la posibilidad de una asociación directa también es cierto que una publicación reciente del equipo de Su Tsung Ping (2016) presenta una amplia lista de las proteínas reportadas como asociadas a el σ 1R, o bien aquellas que por sus características podrían estarlo, lista en la que no se encuentra a TRPV1.

A pesar de los indicios que se tienen sobre la relación molecular que hay entre el σ 1R y TRPV1 es necesario ahondar en este tema antes de presentar un esquema sobre esta interacción ya que a casi 50 años desde que se propuso la existencia del σ 1R inicialmente como un receptor opioide (Martin *et al.*, 1976), para después considerarse como no opioide (Su, 1982) y con 20 años desde que se aisló y clonó por primera vez en mamíferos (Hanner *et al.*, 1996) el σ 1R es todavía una proteína de la que se sabe muy poco, justamente fue hasta este año que se publicó su cristalografía que llevó a cambiar la concepción general de esta proteína (Schmidt *et al.*, 2016). Fue también hasta este año que se le reconoció como un “modulador pluripotente en sistemas vivos” por sus características como la sorprendente cantidad de interacciones que presenta o para las que tiene potencial (Su *et al.*, 2016) y su participación de la regulación de diversos procesos, entre los que destaca la nocicepción al tratarse de aspecto crucial para la sobrevivencia de los seres vivos y que ofrece respecto a TRPV1 un campo de investigación que apenas comienza a dilucidarse.

7. Conclusiones.

- A partir del presente estudio se determinó que se encuentra expresión del σ 1R a nivel de ARNm y de proteína en los mismos sistemas en los que se encuentra a TRPV1.
- Como evidencia de la relación entre TRPV1 y el σ 1R se encontró que la inhibición de esta chaperona ocasiona la disminución de los niveles de proteína de TRPV1 independientemente de la especie de origen del canal (rata, humano y ratón).
- El antagonismo del σ 1R provoca disminución de los niveles del canal TRPV1 en la proteína total y de membrana mediante la vía de degradación del proteosoma.
- En condiciones basales no se encontró evidencia de interacción y ni colocalización entre TRPV1 y el σ 1R.
- La disminución de los niveles de proteína del canal TRPV1 por efecto del antagonismo del σ 1R puede observarse en el sistema de expresión endógeno (DRG) y disminuye la conducta de dolor por administración de capsaicina.

8. Perspectivas del proyecto.

El presente trabajo constituye una aproximación inicial al estudio de la relación entre el canal TRPV1 y el σ 1R, ya que aún quedan diversas incógnitas al respecto.

Todos los experimentos aquí presentados prueban el efecto de la inhibición del σ 1R durante 24 h por lo tanto es necesario determinar el resultado en tiempos menores de incubación.

Una de las características más interesantes del canal TRPV1 es que puede regularse su expresión en la membrana plasmática, de esta forma diversos factores pueden incrementar su tráfico hacia este punto pero al mismo tiempo otros pueden generar internalización del canal, bajo este marco es necesario indagar si los efectos de los agonistas y antagonistas del σ 1R influyen en estos procesos.

A pesar de que no se encontró interacción o colocalización de ambas proteínas es necesario notar que el sistema utilizado presenta expresión basal del σ 1R, por lo que resulta importante evaluar la interacción en un sistema en el que se beneficie la actividad del σ 1R (mediante agonistas) o bien en el que se sobreexpresa (mediante transfección).

Uno de los aspectos más destacables de este trabajo es el efecto observado en el sistema de expresión endógeno (DRG), por el potencial farmacéutico que representa, es por lo tanto necesario realizar ensayos con animales *knock out* para el σ 1R, en los que se aplique el agonista específico para activar al canal TRPV1, estos mismos no solo encaminados a conocer el efecto de la hiperalgesia mecánica, misma que ya está reportada, más aún a conocer respuestas específicas del dolor. En este contexto son importantes además los ensayos con animales de fenotipo silvestre en los que la administración del antagonista de σ 1R sea realizada en menor tiempo respecto a la prueba de dolor agudo. Como consecuencia de esto es necesario determinar no solo en cultivos celulares el efecto de la inhibición del σ 1R sobre el canal TRPV1, más aun es necesario evaluar el efecto en el sistema de expresión endógeno del canal en un tiempo menor de tratamiento. De encontrar un efecto en estos sistemas es importante determinar el mecanismo al que corresponden.

Es importante también recordar que muchas de las relaciones del σ 1R no están entendidas del todo, así es como muchos ligandos pueden actuar como agonistas/antagonistas y es necesario ahondar en sus efectos. Finalmente, el σ 1R interactúa con diversas proteínas que pueden afectar al canal TRPV1 indirectamente, mediante vías de señalización, o bien directamente, por ejemplo, BiP (solo por mencionar una, pero el σ 1R se une a numerosas proteínas), ya que al encontrarse en estado

silente en el complejo con el $\sigma 1R$ podría no ejercer su función de chaperona molecular y con esto causar mal plegamiento.

9. Bibliografía.

1. Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, Jackson MB, 2002. The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron*. Vol.34 P. 399–410.
2. Young BK, Young CJ, Jung KK, Ji SS & Kee WK, 2009. The Antinociceptive Effect of Sigma-1 Receptor Antagonist, BD1047, in a Capsaicin Induced Headache Model in Rats. *Korean J Physiol Pharmacology*. P.425-29
3. Balasuriya D, Stewart AP, Crottès D, Borgese F, Soriani O, Edwardson JM, 2012. The Sigma-1 Receptor Binds to the Nav1.5 Voltage-gated Na⁺ Channel with 4-Fold Symmetry. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 287 P. 37021-37029.
4. Bangaru ML, Weihrauch D, Tang QB, Zoga V, Hogan Q, Wu HE, 2013. Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury. *Mol Pain*. Vol. 10 P.47
5. Bankhead P, 2014. Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ. Heidelberg University. Disponible en: http://blogs.qub.ac.uk/ccbg/files/2014/05/2014-05_Analyzing_fluorescence_microscopy_images.pdf
6. Bavassano C, Marvaldi L, Langeslag M, Sarg B, Lindner H, Klimaschewski L, Kress M, Ferrer-Montiel A & Hans-Günther K, 2013. Identification of voltage-gated K⁺ channel beta 2 (Kv β 2) subunit as a novel interaction partner of the pain transducer Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel (TRPV1). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Vol. 1833, P.3166–3175.
7. Beltrán D, Cavas M & Navarro JF, 2004. Perfil farmacológico de los receptores sigma. *Psic Biol*. Vol.2 P.41-57
8. Berge OG, 2011. Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *Br J Pharmacol*. Vol. 4 P. 1195-206.
9. Btsh J, Fischer MJ, Stott K, McNaughton PA, 2015. Mapping the Binding Site of TRPV1 on AKAP79: Implications for Inflammatory Hyperalgesia. *J Neurosci*. Vol. 35 P.8377.
10. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD & Julius D, 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. Vol.389 P. 816-824

11. Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Montoliu L & Baeyens JM, 2005. Formalin-induced pain is reduced in σ 1 receptor knockout mice. *European Journal of Pharmacology*. Vol.511 P.73–74.
12. Chomczynski P, 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. Vol.3 P.532-4.
13. Christensen AP & Corey DP, 2007. TRP channels in mechanosensation: direct o indirect activation. *Nat. Rev. Neurosci*. Vol. 7 P. 510-21.
14. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, & Del Pozo E, 2008. Pharmacology and therapeutic potential of sigma (1) receptor ligands. *Curr Neuropharmacol*. Vol. 4 P.344-66.
15. Cooper GM, 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
16. Clapham, DE, 2003. TRP channels as celular sensors. *Nature*. Vol. 426 P.517-24.
17. Coico R & Sunshine G, 2015. *Immunology: A Short Course*. Septima edición. Edit. John Wiley & Sons. P. 76
18. Cover & Allan, 1999. *Protein Localization by Fluorescence Microscopy: A Practical Approach*. Edit. OUP Oxford, Nov 18, 1999 - 256 pages
19. Crottès D, Guizouarn H, Martin P, Borgese F, & Soriani O, 2013. The sigma-1 receptor: a regulator of cancer cell electrical plasticity? *Frontiers in physiology*. Vol. 4 P. 1-10.
20. Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M & Patapoutian A, 2009. TRPV1 senses both acidic and basic pH. *J Neurosci*. P. 153–158.
21. Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendán CM, Gris G, Del Pozo E, Zamanillo D, Baeyens JM., 2009. Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: Studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *PAIN*. Vol.143 P.252-261.
22. Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf CJ, Devesa I, & Ferrer-Montiel A, 2014. Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes*. Vol. 4 P. 525-564.
23. Fujimoto M & Hayashi T, 2011. New Insights into the Role of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane. *Int Rev Cell Mol Biol*. Vol.292 P.73-117.
24. Gavet O & Pines J, 2010. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell* 18: 533-543.
25. Glickman, M. H., & Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews*,82(2), 373-428.
26. Goldberg, A. L., 2012. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *The Journal of cell biology*, 199(4), 583-588.

27. Green, W. N., & Millar, N. S., 1995. Ion-channel assembly. *Trends in neurosciences*, 18(6), 280-287.
28. Goswami, C., Rademacher, N., Smalla, K. H., Kalscheuer, V., Ropers, H. H., Gundelfinger, E. D., & Hucho, T., 2010. TRPV1 acts as a synaptic protein and regulates vesicle recycling. *J Cell Sci*, 123(12), 2045-2057.
29. Goswami, C., 2012. TRPV1-tubulin complex: involvement of membrane tubulin in the regulation of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Journal of neurochemistry*, 123(1), 1-13.
30. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O., 2015. Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox biology*, 6, 260-271.
31. Gris, G., Merlos, M., Vela, J. M., Zamanillo, D., & Portillo-Salido, E., 2014. S1RA, a selective sigma-1 receptor antagonist, inhibits inflammatory pain in the carrageenan and complete Freund's adjuvant models in mice. *Behavioural pharmacology*, 25(3), 226-235.
32. Hanner, M., Moebius, F. F., Flandorfer, A., Knaus, H. G., Striessnig, J., Kempner, E., & Glossmann, H., 1996. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 8072-8077.
33. Haas, A. K., von Schwerin, C., Matscheko, D., & Brinkmann, U., 2010, November. Fluorescent Citrine-IgG fusion proteins produced in mammalian cells. In *MAbs* (Vol. 2, No. 6, pp. 648-661). Taylor & Francis.
34. Huang, W., Yu, F., He, X., & Peng, B., 2013. Developmental changes of TRPV1 expression in C57BL/6 mice brain. In *Proceedings of The Physiological Society*. The Physiological Society.
35. Hayashi, T., & Fujimoto, M., 2010. Detergent-resistant microdomains determine the localization of σ -1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Molecular pharmacology*, 77(4), 517-528.
36. Hayashi, T., & Su, T. P., 2007. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell*, 131(3), 596-610.
37. Hayashi, T., Tsai, S. Y., Mori, T., Fujimoto, M., & Su, T. P., 2011. Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert opinion on therapeutic targets*, 15(5), 557-577.
38. Hayashi, T., 2015. Conversion of psychological stress into cellular stress response: Roles of the sigma-1 receptor in the process. *Psychiatry and clinical neurosciences*, 69(4), 179-191.
39. Hille, B., 2001. *Ion channels of excitable membranes* (Vol. 507). Sunderland, MA: Sinauer.
40. Hirata, Y., Yamamoto, H., Atta, M. S. M., Mahmoud, S., Oh-hashii, K., & Kiuchi, K., 2011. Chloroquine inhibits glutamate-induced death of a neuronal cell line by reducing reactive oxygen species through sigma-1 receptor. *Journal of neurochemistry*, 119(4), 839-847.

41. Hofherr, A., Wagner, C., Fedeles, S., Somlo, S., & Köttgen, M., 2014. N-glycosylation determines the abundance of the transient receptor potential channel TRPP2. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), 14854-14867.
42. Hwang, S. J., Oh, J. M., & Valtschanoff, J. G., 2005. Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. *Brain research*, 1047(2), 261-266.
43. Jancsó-Gábor, A., Szolcsanyi, J., & Jancso, N., 1970. Irreversible impairment of thermoregulation induced by capsaicin and similar pungent substances in rats and guinea-pigs. *The Journal of physiology*, 206(3), 495-507.
44. Jansson, E. T., Trkulja, C. L., Ahemaiti, A., Millingen, M., Jeffries, D. G., Jardemark, K., & Orwar, O., 2013. Effect of cholesterol depletion on the pore dilation of TRPV1. *Molecular pain*, 9(1), 1.
45. Jung, J., Shin, J. S., Lee, S. Y., Hwang, S. W., Koo, J., Cho, H., & Oh, U. (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7048-7054.
46. Kavaliers, M., 1989. Evolutionary aspects of the neuromodulation of nociceptive behaviors. *American Zoologist*, 29(4), 1345-1353.
47. Kim, H. W., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Seo, H. S., Kwon, Y. B., Han, H. J Kim, K. W., & Lee, J. H., 2008. Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC-and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *British journal of pharmacology*, 154(5), 1125-1134.
48. Koplas, P. A., Rosenberg, R. L., & Oxford, G. S., 1997. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience*, 17(10), 3525-3537.
49. Kurien y Scofield, 2015. *Western Blotting: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 1312. Springer Science+Business Media New York.
50. Kwon, Y. B., Jeong, Y. C., Kwon, J. K., Son, J. S., & Kim, K. W., 2009. The antinociceptive effect of sigma-1 receptor antagonist, BD1047, in a capsaicin induced headache model in rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 13(6), 425-429.
51. Lecker, S. H., Goldberg, A. L., & Mitch, W. E., 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(7), 1807-1819.
52. Liu J., Du J., Yang Y., y Wang Y., 2015. Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia. *Exp Neurol*. Vol. 273. P. 253-62.

53. Liedtke, W., & Kim, C., 2005. Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon!. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(24), 2985-3001.
54. Llorente, 2007. Activación del canal iónico TRPV1 expresado en células de riñón de embrión humano por agentes irritantes que modifican cisteínas (tesis de licenciatura). UNAM.
55. Lodish H., Matsudaira A., Krieger C., Scott M., Zipursky A., y Darnell M., 2005. Biología molecular y celular. Edit. Médica Panamericana.
56. Lupardus, P. J., Wilke, R. A., Aydar, E., Palmer, C. P., Chen, Y., Ruoho, A. E., & Jackson, M. B., 2000. Membrane-delimited coupling between sigma receptors and K⁺ channels in rat neurohypophysial terminals requires neither G-protein nor ATP. *The Journal of physiology*, 526(3), 527-539.
57. Malin, S. A., Davis, B. M., & Molliver, D. C., 2007. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nature protocols*, 2(1), 152-160.
58. Martin, W., Eades, C. G., Thompson, J., Huppler, R. E., & Gilbert, P. E., 1976. The effects of morphine-and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 197(3), 517-532.
59. Matsumoto, R. R., 2007. σ Receptors: historical perspective and background. In *Sigma Receptors* (pp. 1-23). Springer US.
60. Maurice, T., Urani, A., Phan, V. L., & Romieu, P., 2001. The interaction between neuroactive steroids and the σ 1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain research reviews*, 37(1), 116-132.
61. Maurice, T., & Su, T. P., 2009. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 124(2), 195-206.
62. Mavlyutov, T. A., Epstein, M., & Guo, L. W., 2015. Subcellular Localization of the Sigma-1 Receptor in Retinal Neurons—an Electron Microscopy Study. *Scientific reports*, 5.
63. Mei, J., & Pasternak, G. W., 2001. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma 1 receptor. *Biochemical pharmacology*, 62(3), 349-355.
64. Miki, Y., Tanji, K., Mori, F., & Wakabayashi, K., 2015. Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, 74, 25-31.
65. Minke, 1977. Drosophila Mutant with a Transducer Defect. *Biophys. Struct. Mechanism*. P.59-64.
66. Moebius, F. F., Bermoser, K., Reiter, R. J., Hanner, M., & Glossmann, H., 1996. Yeast sterol C8-C7 isomerase: identification and characterization of a high-affinity binding site for enzyme inhibitors. *Biochemistry*, 35(51), 16871-16878.

67. Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bon, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Hubert L., Elmer, G. I., Chung J. M., & Devor M., 1999. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*, 80(1), 67-82.
68. Morales-Lázaro, S. L., Simon, S. A., & Rosenbaum, T., 2013. The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *The Journal of physiology*, 591(13), 3109-3121.
69. Morales-Lázaro, S. L., & Rosenbaum, T., 2015. A painful link between the TRPV1 channel and lysophosphatidic acid. *Life sciences*, 125, 15-24.
70. Morales-Lázaro, S. L., Llorente, I., Sierra-Ramírez F., López-Romero, A., Ortiz-Rentería, M., Serrano-Flores, B., Simon, S., Islas, L., & Rosenbaum, T., 2016. Inhibition of TRPV1 channels by a naturally occurring omega-9 fatty acid reduces pain and itch. *Nature Communications*.
71. Moran, M. M., Xu, H., & Clapham, D. E., 2004. TRP ion channels in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 14(3), 362-369.
72. Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., García-Sanz, N., & Ferrer-Montiel, A., 2004. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25665-25672.
73. Moriguchi, S., Yamamoto, Y., Ikuno, T., & Fukunaga, K., 2011. Sigma-1 receptor stimulation by dehydroepiandrosterone ameliorates cognitive impairment through activation of CaM kinase II, protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase in olfactory bulbectomized mice. *Journal of neurochemistry*, 117(5), 879-891.
74. Muñiz, Velasco, Correa, Morales, Jiménez, Lauría, Albarracín, De Juana, Lunar y Rodriguez. 1996. Biología. Edit. McGrawHill.
75. Ni, D., Xu, P., & Gallagher, S., 2016. Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology*, 10-8.
76. Nieto-Posadas, A., Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L.D. & Rosenbaum, T., 2012. Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature chemical biology*, 8(1), 78-85.
77. Nieto, F. R., Cendán, C. M., Cañizares, F. J., Cubero, M. A., Vela, J. M., Fernández-Segura, E., & Baeyens, J. M., 2014. Genetic inactivation and pharmacological blockade of sigma-1 receptors prevent paclitaxel-induced sensory-nerve mitochondrial abnormalities and neuropathic pain in mice. *Molecular pain*, 10(1), 1.
78. Nguyen, L., Lucke-Wold, B. P., Mookerjee, S. A., Cavendish, J. Z., Robson, M. J., Scandinaro, A. L., & Matsumoto, R. R., 2015. Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *Journal of pharmacological sciences*, 127(1), 17-29.

79. Nilius y Flockerzi, 2014. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) cation channels. Edit. Springer.
80. Offermanns, S. (Ed.), 2008. Encyclopedia of molecular pharmacology (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
81. Olson, B. J., & Markwell, J., 2007. Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in protein science*, 3-4.
82. Ortega-Roldan, J. L., Ossa, F., & Schnell, J. R., 2013. Characterization of the human sigma-1 receptor chaperone domain structure and binding immunoglobulin protein (BiP) interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21448-21457.
83. Pabba, M., Wong, A. Y., Ahlskog, N., Hristova, E., Biscaro, D., Nassrallah, W., ... & Bergeron, R., 2014. NMDA receptors are upregulated and trafficked to the plasma membrane after sigma-1 receptor activation in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 34(34), 11325-11338.
84. Peach, M., Marsh, N., Miskiewicz, E. I., & MacPhee, D. J., 2015. Solubilization of Proteins: The Importance of Lysis Buffer Choice. *Western Blotting: Methods and Protocols*, 49-60.
85. Phan, V. L., Urani, A., Sandillon, F., Privat, A., & Maurice, T., 2003. Preserved sigma 1 (σ 1) receptor expression and behavioral efficacy in the aged C57BL/6 mouse. *Neurobiology of aging*, 24(6), 865-881.
86. Picazo-Juarez, G., Romero-Suarez, S., Nieto-Posadas, A., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Briggs, M., ... & Rosenbaum, T., 2011. Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 24966-24976.
87. Planells-Cases, R., García-Sanz, N., Morenilla-Palao, C., & Ferrer-Montiel, A., 2005. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflügers Archiv*, 451(1), 151-159.
88. Planells-Cases, R., & Ferrer-Montiel, A., 2007. TRP channel trafficking. In: Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 23. *Frontiers in Neuroscience*.
89. Puente, B., Nadal, X., Portillo-Salido, E., Sánchez-Arroyos, R., Ovalle, S., Palacios, G., ... & López-García, J. A., 2009. Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Pain*, 145(3), 294-303.
90. Puntambekar, P., Van Buren, J., Raisinghani, M., Premkumar, L. S., & Ramkumar, V., 2004. Direct interaction of adenosine with the TRPV1 channel protein. *The Journal of neuroscience*, 24(14), 3663-3671.
91. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, *et al.*, editors. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Nerve Cells. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11103/>.

92. Qiao, H., Gao, Y., Zhang, C., & Zhou, H., 2015. Increased expression of TRPV1 in the trigeminal ganglion is involved in orofacial pain during experimental tooth movement in rats. *European journal of oral sciences*, 123(1), 17-23.
93. Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E., 2006. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 619-647.
94. Romero, L., Zamanillo, D., Nadal, X., Sánchez-Arroyos, R., Rivera-Arconada, I., Dordal, A., ... & Laloya, M., 2012. Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization. *British journal of pharmacology*, 166(8), 2289-2306.
95. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., & Gordon, S. E., 2004. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *The Journal of general physiology*, 123(1), 53-62.
96. Rosenbaum T, Simon SA. TRPV1 Receptors and Signal Transduction. En: Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor y Francis; 2007. Capítulo 5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5260/>
97. Ruoho, A., Chu, U., Ramachandran, S., Fontanilla, D., Mavlyutov, T., & Hajipour, A., 2012. The ligand binding region of the sigma-1 receptor: studies utilizing photoaffinity probes, sphingosine and N-alkylamines. *Current pharmaceutical design*, 18(7), 920-929.
98. Ruscher, K., & Wieloch, T., 2015. The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *Journal of pharmacological sciences*, 127(1), 30-35.
99. Ryskamp, D. A., Redmon, S., Jo, A. O., & Križaj, D., 2014. TRPV1 and endocannabinoids: emerging molecular signals that modulate mammalian vision. *Cells*, 3(3), 914-938.
100. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. T., Higuchi, R., Horn, G. T., ... & Ehrlich, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA. *Science*, 239, 487-491.
101. Samelson, B. K., Gore, B. B., Whiting, J. L., Nygren, P. J., Purkey, A. M., Colledge, M., ... & Scott, J. D., 2015. A-kinase anchoring protein 79/150 recruits protein kinase C to phosphorylate roundabout receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 14107-14119.
102. Sanz-Salvador, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., & Planells-Cases, R., 2012. Agonist-and Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19462-19471.
103. Saucedo-García, M., González-Solís, A., Rodríguez-Mejía, P., Olivera-Flores, T. D. J., Vázquez-Santana, S., Cahoon, E. B., & Gavilanes-Ruiz, M., 2011. Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway. *Plant signaling & behavior*, 6(10), 1616-1619.
104. Schmidt, H. R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., & Kruse, A. C., 2016. Crystal structure of the human σ 1 receptor. *Nature*, 532(7600), 527-530.

105. Schwartz, E. S., Lee, I., Chung, K., & Chung, J. M., 2008. Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain*, 138(3), 514-524.
106. Slater, AF, 1993. Chloroquine: Mechanism of drug action and resistance in plasmodium falciparum. *Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 57 P. 203-235
107. Smith, P., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
108. Srinivasan, R., Wolfe, D., Goss, J., Watkins, S., De Groat, W. C., Sculptoreanu, A., & Glorioso, J. C., 2008. Protein kinase C epsilon contributes to basal and sensitizing responses of TRPV1 to capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Neuroscience*, 28(7), 1241-1254.
109. Studer, M., & McNaughton, P. A., 2010. Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *The Journal of physiology*, 588(19), 3743-3756.
110. Su, TP., 1982. Evidence for Sigma Opioid Receptor: Binding of [3H] SKF-10047 to Etorphine-Inaccessible Sites in Guinea-Pig Brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol.223 P.284-290
111. Su, T. P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., & Ruoho, A. E., 2010. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in pharmacological sciences*, 31(12), 557-566.
112. Su, T. P., Su, T. C., Nakamura, Y., & Tsai, S. Y., 2016. The Sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends in pharmacological sciences*, 37(4), 262-278.
113. Szallasi, A., & Blumberg, P. M., 1989. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience*, 30(2), 515-520.
114. Szallasi, A., & Blumberg, P.M. 2007. Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. En: Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor y Francis; 2007. Chapter 6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5246/>
115. Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., & Eid, S. R., 2007. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature reviews drug discovery*, 6(5), 357-372.
116. Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., ... & Julius, D., 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3), 531-543.

117. Tóth, A., Boczán, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., ... & Blumberg, P. M., 2005. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Molecular Brain Research*, 135(1), 162-168.
118. Tsai, S. Y., Hayashi, T., Mori, T., & Su, T. P., 2009. Sigma-1 receptor chaperones and diseases. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 9(3), 184-189.
119. Veldhuis, N. A., Lew, M. J., Abogadie, F. C., Poole, D. P., Jennings, E. A., Ivanusic, J. J., & McIntyre, P., 2012. N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21765-21772.
120. Voet, Voet y Pratt, 2009. *Fundamental of Biochemistry*. Edit. Medica Panamericana. P.259.
121. Vriens, J., Nilius, B., & Voets, T., 2014. Peripheral thermosensation in mammals. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(9), 573-589.
122. Wilson, Buffa y Lou, 2007. *Física* Edit. Pearson. Pp. 553.
123. Willis y Coggeshall. 2004. *Sensory mechanisms of the spinal cord*. Vol. 1 Primary Afferent Neurons and the Spinal Dorsal Horn. 3era ed. Edit. Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
124. Winter, Z., Buhala, A., Ötvös, F., Jósavay, K., Vizler, C., Dombi, G., ... & Oláh, Z., 2013. Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel—an overview of the current mutational data. *Molecular pain*, 9(1), 1.
125. Xiao-Fei Gao, Jin-Jing Yao, Yan -Lin He, Changlong Hu, Yan-Ai Mei, 2012. Sigma-1 Receptor Agonists Directly Inhibit NaV1.2/1.4 Channels. *PLoS ONE*. Vol. 7.
126. Zamanillo, D., Romero, L., Merlos, M., & Vela, J. M., 2013. Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. *European journal of pharmacology*, 716(1), 78-93.
127. Zacharova, G., & Palecek, J., 2009. Parvalbumin and TRPV1 receptor expression in dorsal root ganglion neurons after acute peripheral inflammation. *Physiological Research*, 58(2), 305.
128. Zheng, J., 2013. Molecular Mechanism of TRP Channels. *Compr Physiol*. Vol. 1. P.221–242.