



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL CANAL TRPV1
MEDIADA POR AGONISTAS ENDÓGENOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RICARDO GÓMEZ ZAMUDIO



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SARA LUZ MORALES LÁZARO

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



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 y hermanos

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. Myrian Velasco Torres, Dr. Ricardo González Ramírez, Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir y Dra. Gisela Edith Rangel Yescas, 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 Miguel Ortiz Rentería miembro del laboratorio por su contribución a este trabajo.

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 y por la Beca para las Mujeres en la Ciencia L'Oréal-UNESCO-CONACYT-AMC

Primero me gustaría agradecer a toda mi familia. En especial a mis padres, Romeo Gómez Trejo y María de Lourdes Zamudio Urbina, así como a mis hermanos Andrés y Emilio Gómez Zamudio, por el apoyo incondicional que me han dado desde principio a fin. Esto no habría sido posible sin ustedes a mi lado. ¡Los amo!

A mí querida novia Yaravy, por estar a mi lado y ofrecerme su apoyo y cariño, que me ha ayudado a ser una mejor persona. ¡Te amo!

También me gustaría agradecer a mí segunda familia, los miembros del laboratorio del Instituto de Fisiología Celular:

Un especial agradecimiento a la Dra. Sara Luz Morales Lázaro, quien es una excelente investigadora, increíble tutora y una muy buena amiga. Muchas gracias por haberme compartido de su conocimiento y de su tiempo, lo cual llevo a fortalecerme personal y profesionalmente. De todo corazón le deseo lo mejor.

A la Dra. Tamara por la confianza de permitirme ocupar el laboratorio.

A Alejandra, Felix, Miguel, Ameyalli y Ana Elena por su increíble apoyo, consejos, observaciones y su amistad que me brindaron a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

Por último, me gustaría agradecer a todos mis amigos tanto de la facultad como de la vida, que a lo largo de mi formación académica de alguna u otra forma me ayudaron a superar los obstáculos de la vida.

Todos y cada uno de ustedes han dejado una huella difícil de borrar y las enseñanzas que me han dejado, me ayudaran en mi camino por delante. ¡Gracias!

Índice

I. Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. Generalidades de los canales iónicos.....	3
1.2. Nocicepción y canales iónicos TRP	4
1.3. Generalidades del canal iónico TRPV1.....	8
1.4. Sensibilización y desensibilización del canal TRPV1: Efectos por el estado de fosforilación del canal.....	12
1.5. Activación del canal TRPV1 por el ácido lisofosfatídico.....	15
2. Justificación.....	19
3. Hipótesis	19
4. Objetivo general	19
4.1. Objetivos particulares.....	20
5. Metodología	21
5.1. Cultivo celular.....	21
5.2. Mutagénesis de sitio dirigido por medio de PCR	21
5.3. Transfección.....	25
5.4. Preparación de stocks de lípidos.	26
5.5. Electrofisiología.....	27
5.6. Preparación de agonistas endógenos para dar tratamientos a cultivos celulares.....	28
5.7. Lisis celular y obtención de proteínas totales.....	29
5.8. Cuantificación de proteínas.....	29
5.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	30
5.10. Western Blot.....	31
5.11. Análisis densitométrico y estadístico.....	32
6. Resultados	33
6.1. Evaluación de la desensibilización celular del canal hTRPV1 por efecto del tratamiento con capsaicina	33
6.2. Activación del canal hTRPV1 por LPA 18:1	36
6.3. Evaluación de la desensibilización celular del canal hTRPV1 por efecto del tratamiento con LPA 18:1.....	37

6.4. Determinación de la desensibilización celular del canal hTRPV1-S117A por efecto del LPA 18:1	41
6.5. Evaluación del efecto de los fosfolípidos LPA 18:0 y LPA 6:0 en los niveles de proteína hTRPV1	43
6.6. Determinando la posible desensibilización celular del canal hTRPV1 por efecto de la anandamida.....	45
7. Discusión.....	47
7.1. La proteína total hTRPV1 disminuye por el tratamiento con capsaicina	47
7.2. La proteína total hTRPV1 disminuye parcialmente por efecto del tratamiento con LPA 18:1.....	49
7.3. El LPA 18:1 disminuye la proteína total hTRPV1 carente del aminoácido fosforilable serina 117	50
7.4. El canal iónico hTRPV1 y su probable relación con los receptores del LPA	51
7.5. Los fosfolípidos LPA 18:0 y LPA 6:0 incrementan los niveles de proteína total hTRPV1	52
7.6. Efecto diferencial de las especies de LPA en la regulación de los niveles de proteína hTRPV1.	54
7.7. El tratamiento con anandamida disminuye los niveles proteínicos del canal hTRPV1.	55
8. Conclusiones.....	56
9. Perspectivas.....	56
10. Bibliografía	59

Abreviaturas

5HT	Serotonina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Anandamida
ASIC	Canales iónicos sensibles a ácido.
ATP	Adenosín trifosfato
ATX	Autotaxina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca²⁺	Iones Calcio
Cl⁻	Iones Cloro
DMEM	Medio Dulbecco's Eagle's Modificado
DMEM-BSA	Medio con 1% de BSA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
HCN	Canales iónicos activados por hiperpolarización
HEK 293	Células de riñón embrionario humano
IASP	Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
K⁺	Iones Potasio
LPA	Ácido lisofosfatídico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P2X	Receptores purinérgicos

PKAProteína cinasa A
PKCProteína cinasa C
PIP2Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
Mg²⁺ Iones Magnesio
MeOHMetanol
Na⁺Iones Sodio
NaClCloruro de sodio
NaFFluoruro sódico
NE.....Norepinefrina
NSAIDAnti-inflamatorios no esteroideos
SDSSodio dodecil sulfato
SSegmento transmembranal
SFBSuero fetal bovino
SNCSistema nervioso central
TRPReceptor de potencial transitorio

I. Resumen

El receptor del potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) es un importante portal del dolor y se considera un importante blanco terapéutico para el tratamiento de esta afección. Se expresa principalmente en las neuronas sensoriales nociceptivas y participa en la detección de diversos estímulos dañinos de naturaleza térmica y química. Uno de sus principales agonistas es la capsaicina, la cual puede regular los niveles de TRPV1 de origen de rata a nivel de proteína total y de membrana plasmática. Este mecanismo se produce por medio de la internalización y la degradación del canal vía el lisosoma, esto constituye una vía de regulación negativa.

En el presente trabajo se evaluó la regulación de los niveles proteínicos del canal TRPV1 de origen de humano (hTRPV1, expresado transitoriamente en células HEK 293) por efecto del tratamiento con agonistas exógenos (capsaicina) o endógenos (LPA y anandamida). Evaluando además la influencia de los iones Ca^{2+} y de la fosforilación mediada por la proteína cinasa A (PKA) en la Serina 117 (S117) del canal TRPV1. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con capsaicina, en presencia de suero y de iones Ca^{2+} disminuye los niveles proteínicos totales de hTRPV1, efecto que se pierde parcialmente en los tratamientos con capsaicina en ausencia de suero.

Además, se demostró por medio de ensayos electrofisiológicos, que el LPA 18:1 activa al canal hTRPV1 y produce una parcial disminución de los niveles de proteína total del canal de manera dependiente de Ca^{2+} . También se demostró que la

mutación del aminoácido serina 117 en el canal hTRPV1, favorece que el LPA 18:1 disminuya la cantidad de proteína total hTRPV1.

Adicionalmente, se evaluó si la anandamida puede regular los niveles proteínicos de hTRPV1, encontrándose que a concentraciones altas de este agonista y en presencia de suero y de Ca^{2+} , se produce una drástica disminución de los niveles proteínicos de hTRPV1, este efecto es de mayor magnitud en comparación al observado con la capsaicina y con el LPA 18:1.

Finalmente, se determinó que los tratamientos con otros fosfolípidos como el LPA 18:0 y 6:0, los cuales no activan al canal TRPV1, producen un aumento en los niveles de proteína hTRPV1 totales.

Estos resultados abren un campo de investigación de los efectos de moléculas endógenas que participan de la regulación positiva o negativa en la cantidad de canales TRPV1 y funcionan como moduladores endógenos favoreciendo o inhibiendo la transducción del estímulo nocivo generada por el canal TRPV1.

1. Introducción

1.1. Generalidades de los canales iónicos

Hace más de 3 billones de años se formó una barrera lipídica conocida como membrana plasmática, que separa el ambiente externo e interno de la célula. Esta barrera tiene macromoléculas que permiten el paso de iones al interior y exterior celular; mismas que se conocen como canales iónicos. Estos constituyen una parte fundamental de las membranas ya que participan en procesos como la excitabilidad celular, homeostasis y liberación de neurotransmisores entre otros eventos celulares (Hille, 2001).

De manera general, los canales iónicos poseen una arquitectura modular. Es decir, presentan estructuras específicas para la función del canal, tales como un sensor de voltaje, sitios para la unión de ligandos, poro de selectividad iónica y una región involucrada en el mecanismo de apertura del canal (Hille, 2001).

Los canales iónicos se han clasificado de acuerdo al tipo de ion que conducen a través de los filtros de selectividad que cada canal iónico posee. Así se han descrito canales que permiten el paso de iones sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{+2}) o cloro (Cl^-) (Hille, 2001).

Además, estos canales pueden denominarse de acuerdo al mecanismo que favorece su apertura, teniendo canales activados por voltaje, por ligandos intracelulares o extracelulares, mecanosensibles, entre otros. Asimismo, ciertos canales iónicos responden a diferentes estímulos nocivos, los cuales son de

particular interés en este estudio por ser considerados como receptores de estímulos dañinos para el organismo (Hille, 2001).

1.2. Nocicepción y canales iónicos TRP

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define a la nocicepción como el proceso neuronal por el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos (nocivos) a los tejidos. Este proceso está mediado por neuronas sensoriales nociceptivas (nociceptores), las cuales son receptores con un alto umbral para ser activados y transducir el estímulo nocivo. Así, entendemos a la nocicepción como un proceso fisiológico que permite la detección de estímulos mecánicos, químicos y térmicos que resulta en un potencial de acción que es interpretado como una señal dolorosa (IASP, edición 2016). Mientras que el dolor es considerado como la respuesta emocional que la IASP define como “una sensación no placentera asociada a una probabilidad de daño al tejido”.

La activación de los nociceptores lleva consigo la transmisión del mensaje hacia el sistema nervioso central a través de las fibras nerviosas C y A δ . Estas proyecciones (aférentes primarias), cuyos somas se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (DRG), van hacia el asta dorsal y continúan transmitiendo la señal por medio de las neuronas de segundo orden a través de la vía espino-talámica hacia las zonas superiores del cerebro que interpretan la señal como dolorosa (Dermot *et al.*, 2001).

En esta vía del dolor existen 4 procesos: la transducción, la transmisión, la modulación y la percepción (**Fig. 1**). La transducción llevada a cabo por los nociceptores, es la conversión del estímulo nocivo en un impulso eléctrico neuronal.

Estos impulsos son transmitidos a través de las fibras A δ y C hacia las láminas del asta dorsal. Aquí se inicia la etapa de la modulación, en la cual se lleva a cabo la producción de sustancia P induciendo la liberación de aminoácidos excitatorios como glutamato y aspartato, lo cual aumenta la transmisión sináptica (Dermot *et al.*, 2001).

Después del paso de la señal a través de las fibras nerviosas de una parte lateral a la otra del asta dorsal y de la sinapsis con neuronas residentes en ese sitio, los axones de estas neuronas de segundo orden proyectan hacia el tálamo (vía espino-talámica) y posteriormente hacia la corteza somatosensorial para que el estímulo nocivo sea percibido como dolor. A este proceso en el cual un estímulo nocivo es reconocido como dolor se le denomina percepción y es llevado a cabo en múltiples áreas del cerebro (Dermot *et al.*, 2001).

La primera etapa en la vía de generación de dolor (detección del estímulo nocivo), representa sin lugar a duda, un posible blanco para la generación de alternativas terapéuticas para el bloqueo de toda la vía.

La detección de estímulos nocivos es posible porque en la superficie celular de los nociceptores se encuentran diferentes canales iónicos, que participan de la detección del estímulo dañino, entre estos canales están algunos miembros pertenecientes a la familia de los Receptores de Potencial Transitorio (*Transient Receptor Potential*, TRP, por sus siglas en inglés) (Clapham *et al.*, 2006).

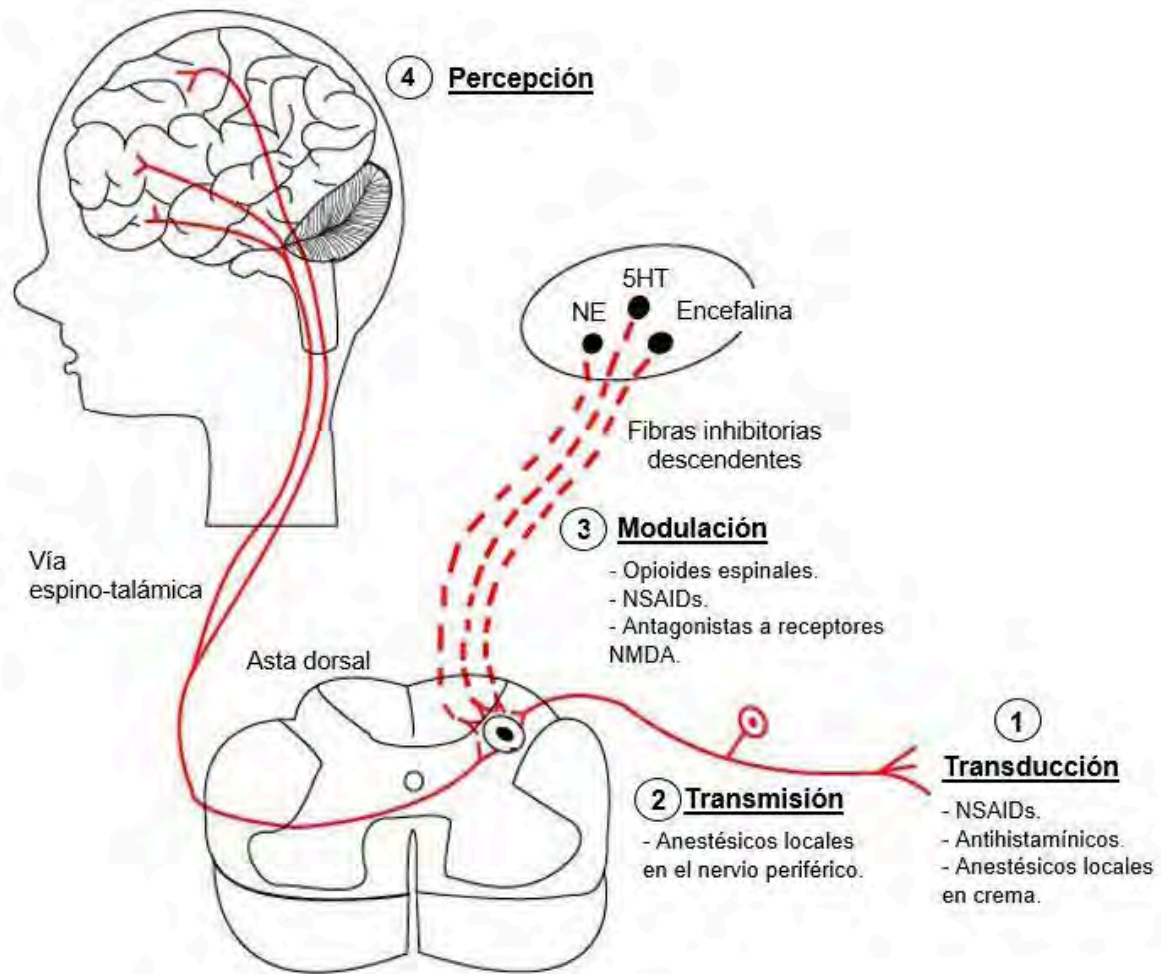


Fig. 1 Procesos de la vía del dolor. Al proceso por el cual los estímulos nocivos en el medio ambiente pasan a ser impulsos eléctricos se llama **transducción**, los cuales a través de fibras nerviosas se transmiten (**transmisión**) hacia el cerebro para ser percibidos como dolor (**percepción**). Los efectos analgésicos naturales de nuestro cuerpo se llevan a cabo por medio de la **modulación** el cual es a través de las sustancias liberadas por fibras inhibitorias descendentes como los opioides espinales o antagonistas a receptores NMDA. La transducción y transmisión son procesos que pueden ser bloqueados por medio de NSAID (anti-inflamatorios no esteroideos). Serotonina (5HT), norepinefrina (NE), (Modificado de Dermot et al., 2001).

Los canales TRP se clasifican en siete subfamilias: TRP anquirina (TRPA), TRP canónicos (TRPC), TRP melastatina (TRPM), TRP mucolipina (TRPML), mecanoreceptor no potencial C (TRPN), TRP policistina (TRPP) y TRP vaniloide (TRPV). Una de las características importantes de algunos de estos canales iónicos es que pueden ser activados directamente por ligandos que interactúan con una

parte de la estructura del canal. Algunos ejemplos de estos ligandos son compuestos de origen natural como la capsaicina (encontrada en los chiles), la alicina (encontrada en los ajos), el mentol (menta), el cinamaldehído (encontrado en la canela), eugenol (encontrado en el clavo), entre otros (Clapham *et al.*, 2006). Además, pueden ser activados por compuestos de producción endógena como la anandamida, eicosanoides, ácido lisofosfatídico (LPA), por nucleótidos purínicos como la ADP ribosa y el nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o por iones inorgánicos como Mg^{+2} y Ca^{+2} (Morales-Lázaro *et al.*, 2013; Julius, 2013).

Dentro de los canales TRP existen algunos que además pueden activarse por cambios en la temperatura, funcionando como termosensores. Así tenemos a los canales TRPA1 y TRPM8 activados a temperaturas frías, a los canales TRPM2, TRPM5, TRPV3 y TRPV4 que se activan a temperaturas templadas y a los canales TRPV1 y TRPV2 los cuales se activan a temperaturas altas (Miño *et al.*, 2016).

Los canales iónicos pertenecientes a la familia de los TRP están conformados de subunidades proteicas que se agrupan en forma de tétradas para dar origen a un canal funcional. Estructuralmente, cada monómero se caracteriza por poseer seis segmentos transmembranales (S1-S6), extremos amino y carboxilo terminales localizados intracelularmente; el asa que une al S5-S6 permite la formación del poro de conducción iónica y en el carboxilo terminal se encuentra una secuencia de aminoácidos conservada entre esta familia denominada la caja TRP (Clapham *et al.*, 2006). Dados los intereses del trabajo, a continuación, se profundizará en la descripción del canal TRPV1.

1.3. Generalidades del canal iónico TRPV1

Algunos miembros de los canales de la familia TRP se expresan de manera abundante en los nociceptores. Entre estos canales iónicos encontramos al TRPV1 del cual recientemente se obtuvo su crioestructura (resolución de 3.4Å) confirmando su estructura tetramérica y formación de un poro central de conducción iónica (**Fig. 2a-b**; Liao *et al.*, 2013). Este canal es de naturaleza catiónica no selectiva, con alta preferencia para la permeabilidad al catión divalente Ca^{2+} , aunque también puede permitir el paso otros cationes como: Na^+ , K^+ y Mg^{2+} (Darré *et al.*, 2014).

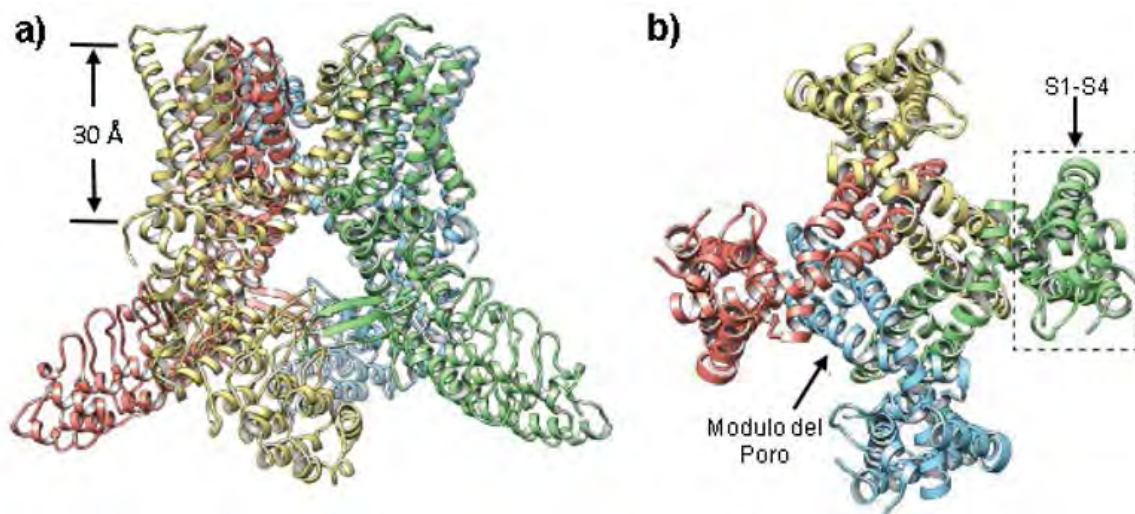


Fig. 2 Diagrama de listón del canal iónico TRPV1. a) Cada una de las 4 subunidades (tetrámero) del canal está representado con un color diferente, la porción del canal iónico TRPV1 que está embebido en la membrana plasmática está señalada como una región de 30 Å. b) Vista inferior del canal que muestra el conjunto de segmentos transmembranales S1-S4 los cuales interactúan con el módulo del poro, el cual está formado por el S5-P-S6 (Liao *et al.*, 2013).

La estructura monómera del canal TRPV1 está caracterizada por la presencia de 4 regiones principales: la región amino y carboxilo terminal localizadas intracelularmente, la región transmembranal y la región que conforma al poro. La región transmembranal está compuesta por 6 segmentos transmembranales (S1-

S6), con la región que conforma al poro ubicada en el segmento S5 y S6 (**Fig. 3**; Morales-Lázaro *et al.*, 2013).

La región amino terminal está compuesta por seis repetidos de anquirinas, los cuales son motivos estructurales de aminoácidos organizados en forma de horquilla seguidos por una estructura de hélice-vuelta-hélice y que permiten la interacción del canal con proteínas del citoplasma para regular la actividad del canal (**Fig. 3**). La región carboxilo terminal interacciona con β -tubulina, sugiriendo que el canal puede ser modulado a través de las interacciones con el citoesqueleto (Morales-Lázaro *et al.*, 2013). En el carboxilo terminal también se encuentran aminoácidos de carácter positivo que permiten la interacción del canal con fosfatidilinositoles como el PIP2, dicha interacción es muy importante para la activación del canal por capsaicina (**Fig. 3**; Morales-Lázaro *et al.*, 2013). En la región transmembranal se pueden encontrar algunos sitios para la unión de ligandos, por ejemplo, en el S5 se encuentra una secuencia consenso de aminoácidos para el reconocimiento del colesterol (CRAC por sus siglas en inglés), este ligando actúa como un inhibidor de la activación del canal TRPV1 (**Fig. 3**) (Picazo-Juárez *et al.*, 2011).

El canal TRPV1 en los últimos años se ha descrito como un portal del dolor ya que tiene la capacidad de detectar un gran número de estímulos nocivos, lo que conlleva a su activación (**Fig. 3**). Este canal se encuentra expresado principalmente en Sistema Nervioso Periférico, específicamente en las neuronas sensoriales de diámetro pequeño (fibras C desmielinizadas), y en neuronas con fibras medianas A δ mielinizadas. Estas son neuronas cuyos somas se encuentran localizados en los

ganglios de la raíz dorsal, ganglios trigeminales y ganglios nodosos (Vay *et al.*, 2012).

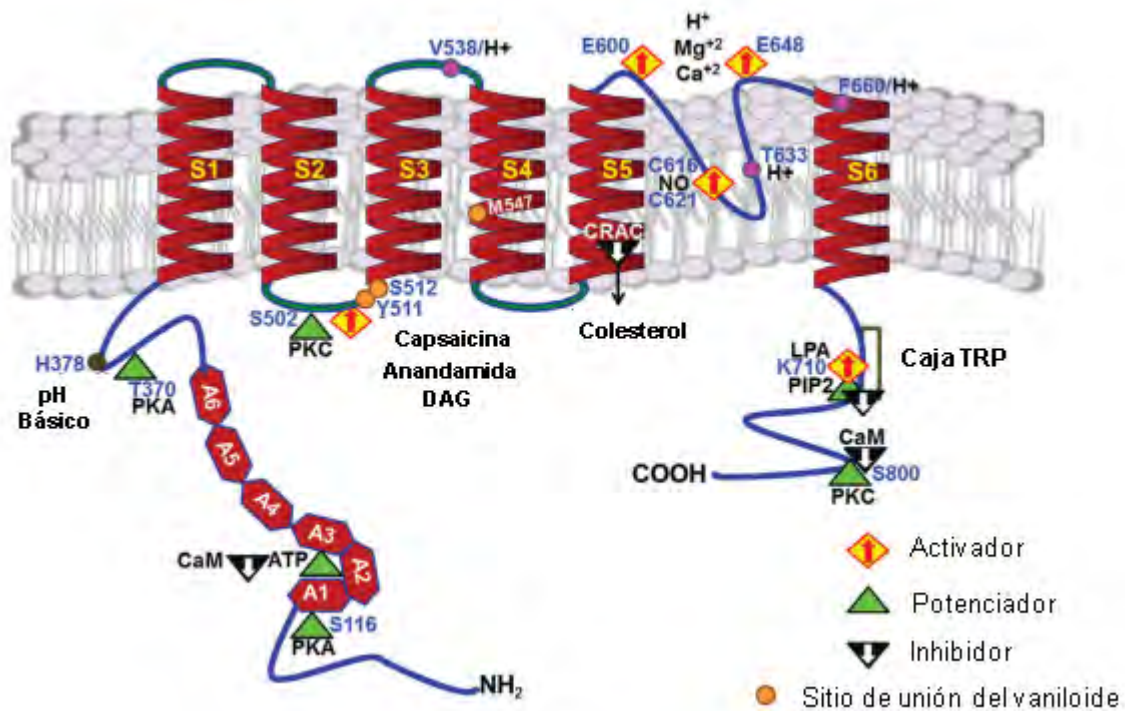


Fig. 3 Diagrama esquemático de una de las cuatro subunidades del canal TRPV1 en donde se muestran sus componentes estructurales y los sitios de unión para diversos reguladores: **activadores** (ácido lisofosfatídico (LPA), capsaicina, diacilglicerol (DAG) y anandamida), **potenciadores** (proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa A (PKA) y pH básico) e **inhibidores** (Colesterol y PIP2) (Morales-Lázaro *et al.*, 2013).

Entre los agonistas para el canal TRPV1, es decir aquellos que inducen su activación, encontramos a la capsaicina, la cual es un compuesto orgánico que presenta una estructura química del tipo vaniloide encontrada en plantas del género *Capsicum* y responsable del picor que se genera al comer cierto tipo de chiles. Este canal también puede ser activado por pH ácido extracelular y alcalino intracelular. Así mismo puede ser activado por temperaturas de alrededor de los 42°C y por algunas moléculas endógenas producidas durante procesos de inflamación y/o

lesión tisular, como el ácido lisofosfatídico (LPA), la anandamida, algunos productos del ácido araquidónico y de la lipooxigenación. Debido a sus múltiples agonistas, el canal TRPV1 es considerado como un integrador de diversos estímulos nocivos y se le considera como un receptor polimodal (Morales- Lázaro *et al.*, 2013).

Es importante mencionar que el canal TRPV1 presenta ciertas diferencias estructurales entre especies, de tal forma que existen requerimientos moleculares que determinan la activación del canal TRPV1 ante la capsaicina. Así tenemos que el canal TRPV1 aviar y el de conejo no se activan por capsaicina, debido a que, en el sitio de unión para este compuesto, localizado entre el S3 y S4, existen diferencias puntuales en aminoácidos importantes para la unión de capsaicina al canal, los cuales sí están presentes en canal de origen de rata, ratón y humano. (Julius *et al.*, 2002; Gavva *et al.*, 2004). Esto fue demostrado mediante experimentos de mutagénesis sitio dirigida, encontrándose que los residuos Y512 (Tirosina 512), S513 (Serina 513), M548 (Metionina 548) y T551 (Treonina 551) de los S3 y S4 (del canal TRPV1 de humano, hTRPV1) son importantes para la activación del canal por medio de capsaicina (Yang *et al.*, 2015). La mutación de estos sitios conlleva a la expresión de canales con poca respuesta al estímulo por capsaicina. Este estudio detalla que la cadena alifática de la capsaicina realiza interacciones tipo Van der Waals con el residuo fenilalanina 544 (F544) del canal hTRPV1 para su estabilidad; por otra parte, el aminoácido treonina 551 (T551) es importante para la unión de capsaicina funcionando como un ancla para la estabilidad molecular mediante puentes de hidrógeno interactuando con el grupo amida del compuesto. Mientras

que el ácido glutámico E571 promueve la estabilidad entre la capsaicina y el canal TRPV1, favoreciendo la apertura del canal (Yang *et al.*, 2015).

1.4. Sensibilización y desensibilización del canal TRPV1: Efectos por el estado de fosforilación del canal

La fosforilación y desfosforilación son modificaciones postraduccionales que regulan las funciones de diversas proteínas por medio de la inducción de cambios conformacionales, la interrupción o creación de interacciones proteína-proteína o por medio del bloqueo del sitio de unión de un ligando (Heung-Ching *et al.*, 2011). Este tipo de modificaciones postraduccionales regulan de manera muy importante la función del canal TRPV1, conllevando a dos estados del canal: el sensibilizado y el desensibilizado (Sanz-Salvador, 2014).

La sensibilización corresponde a una activación del canal TRPV1 ante un estímulo de menor intensidad al que originalmente se activa; por ejemplo, el canal TRPV1 se activa normalmente a temperaturas de alrededor de 42°C, en un estado sensibilizado se puede activar a 37°C. Esto es posible por medio de la fosforilación del canal TRPV1. Dicho canal es blanco de la proteína cinasa C (PKC), la cual fosforila a los aminoácidos S502 (Serina 502) y S800 (Serina 800), dando como resultado que se requieran de concentraciones muy bajas de capsaicina para activarlo (Wang *et al.*, 2015). Mientras que la fosforilación en T704 (Treonina 704) y S800 (Serina 800) sensibiliza al canal para la detección de temperaturas no nocivas (es decir, el canal baja su umbral de activación de temperatura de 42°C a 37°C) (Wang *et al.*, 2015).

Por otro lado, la proteína cinasa A (PKA) también puede modular al canal TRPV1 por medio de la fosforilación en los aminoácidos T144 (Treonina 144), T370 (Treonina 370) y S116 (Serina 116) (Brasier *et al.*, 2002). Entre estos, el sitio de fosforilación más estudiado ha sido el S116 que, por medio de procesos de desfosforilación dependiente de Ca^{2+} y fosforilación vía PKA, puede disminuir la función del canal, a lo cual se le denomina desensibilización (Brasier *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que el proceso de desensibilización puede originarse por cambios en la biofísica del canal TRPV1 y además por procesos celulares. De tal manera que la desensibilización descrita en términos biofísicos, está dada por la activación continua del canal, el cual alcanza un estado refractario, en el que se encuentra disminuida la respuesta de forma parcial o total a cualquier tipo de estímulo (Plested, 2016). Por el otro lado, está la desensibilización en términos celulares, que se refiere a una disminución de la cantidad de canales TRPV1 en la superficie celular, esto por medio de cambios en el tráfico del canal hacia la membrana plasmática o por procesos de internalización que favorezcan la degradación del canal (Gainetdinov *et al.*, 2004). Para efectos de este trabajo nosotros utilizaremos la definición de desensibilización en términos celulares y no biofísicos.

El proceso de desensibilización puede ser agudo o a largo plazo y juega un papel importante para poder controlar el dolor agudo y crónico mediado por la activación del canal TRPV1 con aplicaciones importantes para la analgesia (Sanz-Salvador, 2014). La desensibilización aguda se caracteriza por una disminución de la actividad del canal TRPV1 durante la estimulación; por otra parte, la aplicación de estímulos

breves y repetidos también produce una disminución en la activación del canal denominándose taquifilaxis. Ambos procesos pueden tener una duración desde minutos hasta horas. Sin embargo, la desensibilización a largo plazo puede durar desde semanas, meses e incluso volverse irreversible, estado denominado desfuncionalización (Liu y Simon, 1996).

Los mecanismos moleculares implicados en la desensibilización aguda son mediados por procesos de desfosforilación del canal a través de calcineurina (Mohapatra y Nau, 2005), la interacción con calmodulina (CaM) (Rosenbaum *et al.*, 2004) y la depleción del PIP2 de la membrana plasmática (Lukacs *et al.*, 2007).

A diferencia de la desensibilización aguda que se encuentra bien caracterizada, la desensibilización a largo plazo recientemente ha empezado a ser estudiada.

Así, se ha determinado que la exposición prolongada a capsaicina induce la internalización del receptor TRPV1 de origen de rata (rTRPV1) de forma dosis y tiempo dependiente, requiriéndose estrictamente la activación del canal y del flujo de Ca^{+2} a través de su poro (Sanz-Salvador *et al.*, 2012).

La ruta de internalización del canal TRPV1 es un mecanismo independiente de clatrina y dinamina, cuyo destino final es la degradación del canal por medio del lisosoma. Esta internalización puede ser bloqueada por medio de la fosforilación del canal rTRPV1 en el residuo de serina 116 mediado por PKA (Sanz-Salvador *et al.*, 2012). Por lo tanto, la internalización del canal rTRPV1 y su degradación en el lisosoma resulta ser un mecanismo molecular importante en la desensibilización a largo plazo del canal rTRPV1 mediado por capsaicina, ya que disminuye la cantidad

de canales presentes en la membrana plasmática (desensibilización celular). Esto constituye una vía importante para regular la respuesta nociceptiva y, por lo tanto, un enfoque diferente para producir analgesia por medio de la disminución de la densidad de canales en la neurona sensorial (Sanz-Salvador *et al.*, 2012).

1.5. Activación del canal TRPV1 por el ácido lisofosfatídico

El LPA es un fosfolípido bioactivo que es sintetizado por medio de la acción enzimática de la autotaxina (ATX), la fosfolipasa D (PLD) y la fosfolipasa A₂ (PLA₂), esto a partir de precursores que se encuentran en la membrana como la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Existen diversas especies de LPA que varían en el tamaño de su cadena alifática (de 16 hasta 20 carbonos), así como en la presencia de insaturaciones (0, 1, 2, insaturaciones). En conjunto todas estas especies de LPA se encuentran a una concentración máxima de 0.1 µM en el plasma sanguíneo y en el suero a una concentración de hasta 10 µM (Baker *et al.*, 2000). Las formas químicas más abundantes de LPA encontradas en el plasma sanguíneo humano son LPA 18:0 y 18:2 (Chun *et al.*, 2010; Chun *et al.*, 2015). De manera interesante, se ha determinado que en modelos animales de dolor las formas químicas más abundantes son las del LPA 18:1, 16:0 y 18:0 (Ueda *et al.*, 2013).

Uno de los agonistas del canal TRPV1 identificado en los últimos años es el ácido lisofosfatídico 18:1 (LPA 18:1). Este compuesto de producción endógena es capaz de producir dolor agudo a través de la interacción directa con el canal TRPV1 (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). Estructuralmente se caracteriza por estar constituido de un glicerol esterificado, una cadena alifática y un grupo fosfato cargado negativamente

(Chun *et al.*, 2010) que en conjunto son los componentes que le dan la capacidad de poder activar al canal TRPV1 (**Fig. 4**).

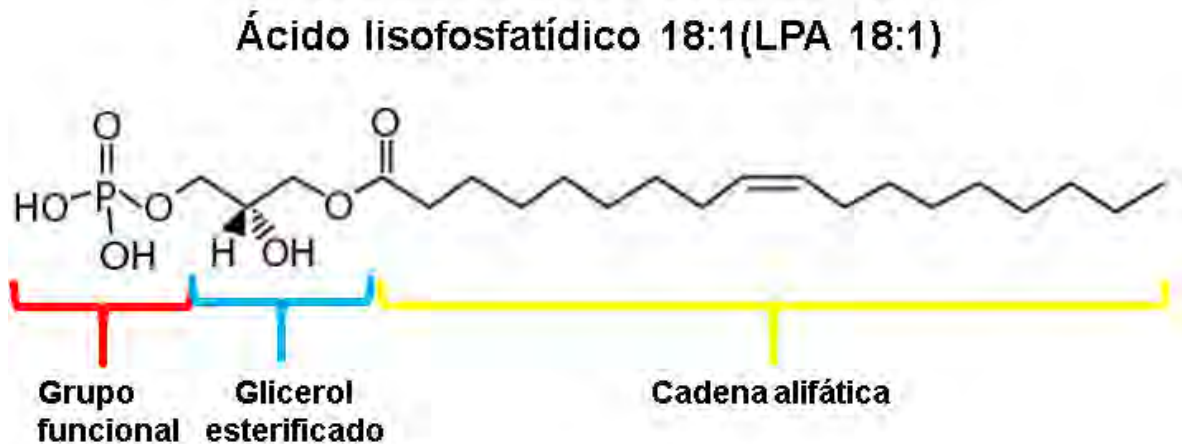


Fig. 4 Estructura del ácido lisofosfatídico 18:1 (LPA 18:1) el cual está compuesto por una cadena larga de 18 carbonos con un doble enlace (insaturación) en el carbono 9, un glicerol esterificado y un grupo fosfato cargado negativamente (Estructura obtenida de Chun *et al.*, 2010).

El LPA es un compuesto relacionado con la producción de dolor inflamatorio y dolor neuropático, este compuesto se libera cuando existe daño tisular, originando la desmielinización de las proyecciones de las neuronas; este daño produce hiperalgesia (respuesta amplificada de un estímulo doloroso) y alodinia (dolor a un estímulo no nocivo). Estos efectos son mediados por la interacción del LPA vía su receptor LPA₁ y la activación de la cascada de señalización por medio de Rho-ROCK (Ueda *et al.*, 2004).

Además, el LPA puede originar dolor agudo por medio de la activación directa del canal TRPV1. Esto fue demostrado por medio de la obtención de datos electrofisiológicos en parches escindidos de membranas de neuronas DRG, en las

cuales se observó que el canal TRPV1 es activado por la aplicación de LPA de manera muy similar a la activación por capsaicina (**Fig. 5a**).

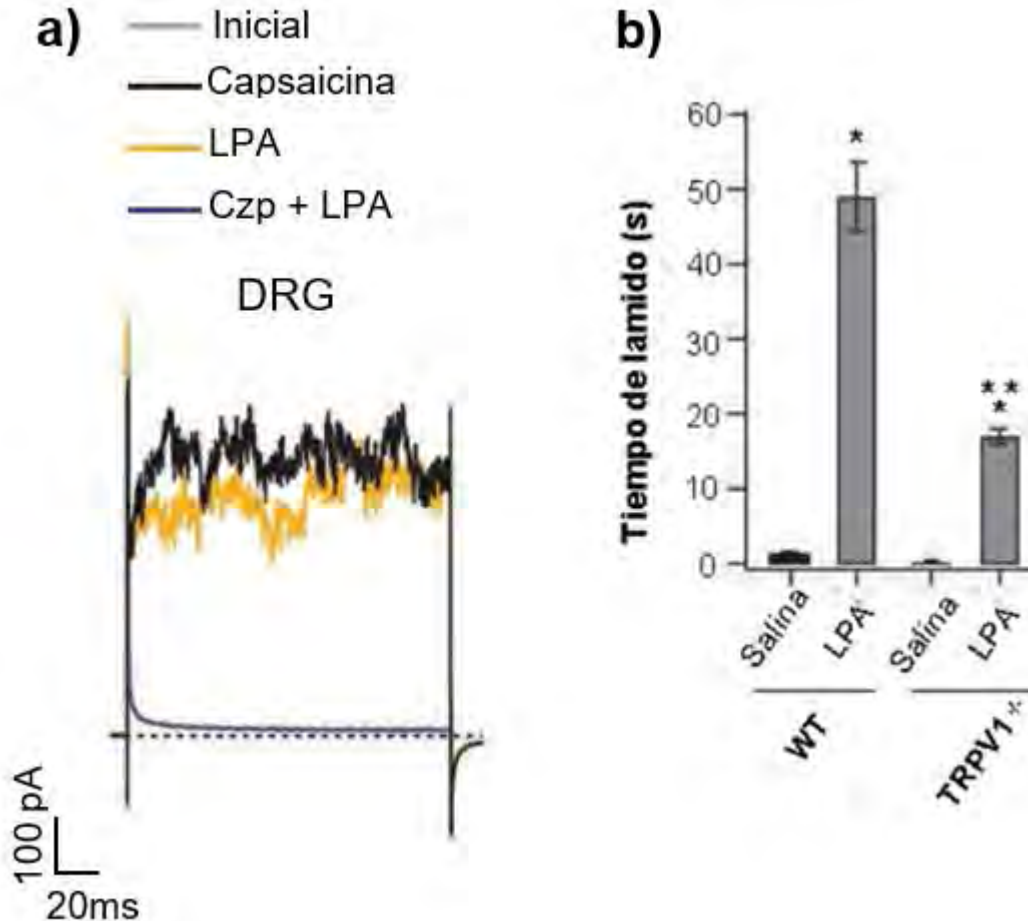


Fig. 5. El LPA activa al canal TRPV1 e induce dolor agudo. **a)** Trazos representativos de las corrientes iónicas generadas por la activación del canal TRPV1 en parches de membrana escindidos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) en configuración *inside-out* expuestos a capsaicina (4 μ M, negro), LPA (5 μ M, amarillo) y LPA + capsazepina (Czp, 30 μ M, azul). Se puede observar que la activación del canal TRPV1 por LPA es similar al de capsaicina y la activación por LPA puede ser inhibida por el antagonista del canal, la Czp. **b)** Respuesta de dolor a la inyección intradérmica del LPA en ratones silvestre (WT) y ratones *Trpv1*^{-/-}. Se observa que los animales que no expresan al canal TRPV1 presentan disminución en la respuesta de dolor al LPA WT: control, 1.5 \pm 0.3 s y WT + LPA, 49 \pm 5 s; *Trpv1*^{-/-}: control, 0.4 \pm 0.2 s y *Trpv1*^{-/-} + LPA 17 \pm 0.9 s, **p* < 0.01 (Nieto-Posadas *et al.*, 2012).

Asimismo, la aplicación intradérmica de LPA en la pata de ratones silvestres genera una respuesta clara de dolor que está disminuida en ratones que carecen de la expresión del canal TRPV1 (*Trpv1*^{-/-}), indicando que gran parte del dolor inducido por LPA es mediado por el canal TRPV1 (**Fig. 5b**; Nieto-Posadas *et al.*, 2012).

El mecanismo molecular de activación del canal TRPV1 por LPA consiste en la interacción electrostática entre el fosfolípido y el aminoácido cargado positivamente lisina 710 (K710) localizado en el carboxilo terminal del canal TRPV1 (Nieto-Posadas *et al.*, 2012).

Esta interacción es muy específica, puesto que requiere de la presencia de ciertas características estructurales del fosfolípido como tener una cadena alifática de entre 16 a 18 carbonos, una insaturación o un grupo funcional que le confiera cierto grado de torsión a la molécula, presente entre el carbono 9,10 u 11, y un grupo funcional cargado negativamente que le confiere atracción con el aminoácido cargado positivamente K710 del canal TPRV1 (Morales-Lázaro *et al.*, 2014). Estos requerimientos estructurales necesarios en el fosfolípido para la activación del canal convierten a esta interacción tan específica entre un ligando y el canal para la generación de dolor. Estos requerimientos estructurales están presentes en el LPA 18:1, la cual es una de las especies que más se produce en modelos animales de dolor (Ueda *et al.*, 2013).

2. Justificación

La activación prolongada del canal TRPV1 por capsaicina genera la internalización y degradación del canal por medio del lisosoma, mecanismo que disminuye la cantidad de canales en la membrana plasmática en las neuronas nociceptivas (desensibilización celular). Esto puede generar una desensibilización a mediano y/o largo plazo con efectos analgésicos. Con este antecedente, en este proyecto se propuso determinar si agonistas del canal TRPV1 producidos endógenamente, como el LPA y la anandamida, pueden tener igual o diferente capacidad para regular la cantidad de canales TRPV1. Debido a que el canal TRPV1 está implicado en patologías que presentan dolor crónico, se genera la posibilidad de que la producción exacerbada de agonistas endógenos en ciertos procesos patológicos, no causan disminución en los niveles de canales TRPV1, por lo tanto, este se encuentra en cantidades abundantes en la neurona para transmitir la señal nociva, conllevando a la respuesta de dolor a largo plazo.

3. Hipótesis

Los agonistas endógenos del canal TRPV1 no producen su desensibilización celular.

4. Objetivo general

Evaluación de la desensibilización celular del canal hTRPV1 por efecto de agonistas endógenos como el LPA y la anandamida.

4.1. *Objetivos particulares*

4.1.1.- Evaluar los niveles de proteína del canal hTRPV1 expresados en células HEK 293 por efecto del tratamiento a diferentes concentraciones de capsaicina en presencia y ausencia de suero (desensibilización celular).

4.1.2.- Evaluar mediante la técnica del Patch-Clamp en la modalidad de parche escindido y configuración inside-out, la activación del canal hTRPV1 por medio del LPA 18:1 en células HEK 293.

4.1.3.- Determinar los niveles de proteína del canal hTRPV1 expresados en células HEK 293 por efecto del tratamiento a diferentes concentraciones de LPA 18:1 en ausencia y presencia de Ca^{2+} (desensibilización celular).

4.1.4.- Diseño y obtención de una construcción de ADN con mutación en el aminoácido Serina 117 del canal hTRPV1.

4.1.5.- Evaluar el posible efecto desensibilizador del LPA 18:1 en la mutante del canal hTRPV1 (hTRPV1-S117A) expresados en células HEK 293, en presencia y ausencia de Ca^{2+} .

4.1.6.- Determinar si el tratamiento con LPA 18:0 y LPA 6:0 afecta la cantidad de canales hTRPV1 expresados en células HEK 293.

4.1.7.- Determinar si otro agonista endógeno del canal TRPV1, como la anandamida genera disminución de la cantidad de canales hTRPV1 expresados en células HEK 293.

5. Metodología

5.1 *Cultivo celular*

Se utilizó la línea celular de riñón embrionario humano (HEK 293) cultivada en medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10,000 unidades de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina. Para los pasajes celulares se retiró el medio de cultivo y se agregó tripsina-EDTA 0.05%, con el objetivo de desprender las células de la caja y poder recolectarlas. Posteriormente se agregó DMEM complementado y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y el paquete celular se homogeneizó en 1 ml de medio DMEM complementado. Se realizaron cultivos celulares a una sub-confluencia del 50% en placas de 6 pozos con medio DMEM complementado, los cuales fueron mantenidos a 37°C y atmosfera de 5% de CO₂ para ser transfectadas al siguiente día.

5.2 *Mutagénesis de sitio dirigido por medio de PCR*

Con el objetivo de obtener la mutante hTRPV1-S117A se realizó la técnica de mutagénesis sitio dirigido a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de dos pasos y mediante el uso de oligonucleótidos mutantes y silvestres. Posteriormente, con la utilización de técnicas de digestión enzimática, ligación, transformación y extracción de ADN a partir de colonias bacterianas se obtuvo el ADN mutado (hTRPV1-S117A), finalmente la incorporación de la mutación deseada se caracterizó por medio de enzimas de restricción y secuenciación. Para este procedimiento, primero se realizó el diseño de los oligonucleótidos que contienen la mutación puntual para el cambio del codón de serina 117 a alanina de la secuencia codificante para el canal TRPV1 de origen de

humano (Número de acceso: NM_080704.3), usando el programa Vector NTI (Tabla 1).

Oligonucleótido hTRPV1-S117A (mutante)-sentido (Mut-S) GAGAAGACCCTCAGGCTCTATGATAG <u>GGCGCGCC</u> ATCTTTGAAGCCGTTGCT
Oligonucleótido hTRPV1-S117A (mutante)-antisentido (Mut-AS) AGCAACGGCTTCAAAGAT <u>GGCGCGCCT</u> ATCATAGAGCCTGAGGGTCTTCTC
Oligonucleótido silvestre-sentido (Wt-S) GGCACCAAATCAACGGGAC
Oligonucleótido silvestre-antisentido (Wt-As) CCGTGTCCAGGATGGTGATGGC

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos obtenidos mediante el programa Vector NTI los cuales tienen las características de tener un punto de fusión (T_m) de 88.7°C, una longitud de 20 a 50 pares de bases y un contenido del 50% de citosinas y guaninas. S (sentido), AS (Antisentido). En negritas se resalta la mutación insertada para el cambio de la serina por alanina y los nucleótidos subrayados representan el sitio de restricción insertado.

También se insertó la secuencia para la generación de un nuevo sitio de restricción para la enzima Asc1 que no modifica el marco de lectura y que sirvió para la caracterización de la inserción de la mutación.

Para la realización de la primer PCR (PCR1), en el tubo 1 se mezclaron todos los componentes de la reacción: Buffer para PCR para Pfx 2X, mezcla de dNTPs 0.2 mM, MgSO₄ 1 mM, 2.5 unidad de la polimerasa Pfx platinum, 1 µg del molde de ADN (pcDNA3.1-hTRPV1 molde que contiene la secuencia codificante para el hTRPV1) y 0.2 µg de oligonucleótidos Wt-S y Mut-AS. En el tubo 2 se realizó una mezcla de reacción igual que la usada para el tubo 1, usando 0.2 µg de los oligonucleótidos Mut-S y Wt-AS. Posteriormente se procedió a llevar ambas mezclas al termociclador para la realización de los 29 ciclos de la PCR1 (tabla 2). Posterior a la PCR1, los productos de amplificación del tubo 1 (596pb) y tubo 2

(1810pb) se purificaron por gel de agarosa extrayendo las bandas deseadas. Para la segunda PCR (PCR2) se usaron alrededor de 100 ng del producto proveniente de cada uno de los tubos de la PCR1 para mezclarlos con todos los reactivos para la segunda PCR (Buffer de PCR para *Pfx* 2X, dNTPs 0.2 mM, MgSO₄ 1 mM, 2.5 unidad de polimerasa *Pfx* platinum) y se agregaron 0.2 µg de los oligonucleótidos Wt-S y Wt-AS, para la amplificación de un producto de 2355 nucleótidos que contienen ya la secuencia del canal hTRPV1 con la mutación insertada. Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a un volumen final de 50 µl con agua MilliQ.

Protocolo PCR1 y PCR2
1.- 94°C por 2 min
2.- 94°C por 30 seg
3.- 50°C por 30 seg
4.- 68°C por 2 min / 68°C por 2.5 min
5.- Repetir paso 2 al 4 29 veces
6.- 68°C por 10 min
7.- Almacenamiento de producto de PCR final a 4°C

Tabla 2. Protocolo que se siguió para la PCR1 y PCR2. Los primeros dos pasos tuvieron como objetivo la desnaturalización de las cadenas, el tercer paso se realizó para la hibridación de los oligonucleótidos con una temperatura de alineamiento de 50°C, el cuarto paso fue el de elongación de la secuencia mutante y el objetivo del quinto paso fue el de la amplificación de la mutante.

Posterior a los ciclos de PCR se confirmó la amplificación del producto por medio de su visualización en geles de agarosa al 0.8% con 0.3 µg/ml de bromuro de etidio. Una vez confirmada la amplificación del producto, se procedió a realizar una reacción de restricción a 37°C por medio de las enzimas *KpnI* y *SacII* (New England BioLabs Inc.), sitios de restricción únicos que se encuentran en la secuencia codificante para el canal TRPV1 y de esa forma purificar por gel de agarosa

extrayendo el producto de amplificación (inserto) con la mutación incorporada. Además, se realizó la digestión del vector pcDNA3.1-hTRPV1 con el mismo par de enzimas para liberar el fragmento del canal HTRPV1 silvestre. Después de la digestión enzimática del producto de PCR (inserto) y del pcDNA3.1-hTRPV1 (vector), se realizó la reacción de ligación por medio de la enzima T4 ligasa (Promega Corporation). Para esto se calcularon (Fórmula 1) los nanogramos de inserto (con la secuencia mutada) necesarios para ligarlos al vector, se mezclaron los componentes (30 ng de ADN vector, ng calculado de ADN inserto, buffer de ligación 1X, 0.1 unidad de la enzima *T4 ligasa* y agua libre de nucleasas) y se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C.

$$\frac{(ng \text{ del vector})(\text{tamaño del inserto (kb)})}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \text{índice molar} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = ng \text{ del inserto}$$

Fórmula 1 para obtener los nanogramos de inserto necesarios para introducirlos a nuestro vector hTRPV1 pcDNA 3.1. Se modificaron los 100 ng de vector recomendable a usar por 30 ng de vector y se cambió el índice molar recomendable de 3:1 a 10:1 para asegurar que nuestra secuencia mutada se inserte eficientemente en nuestro vector.

El producto de la ligación que consistió del vector con la secuencia de ADN de hTRPV1 ya mutada (vector recombinante), se usó para realizar la transformación de bacterias competentes DH5α mediante choque térmico. Después se realizó una extracción de ADN de las colonias bacterianas candidatas, en donde se aisló y purificó el vector mutado. Los ADN purificados se restringieron con la enzima *AscI* (New England BioLabs Inc.) la cual fue insertada en el diseño de nuestro oligonucleótido mutante, con el objetivo de saber si nuestra mutación estaba

correctamente insertada en nuestro vector, para así obtener ADN (pcDNA3.1-hTRPV1-S117A) a gran escala y usarlo para la transfección de las células HEK 293.

5.3 Transfección

La expresión transitoria del canal hTRPV1 o de la versión mutante hTRPV1-S117A, se realizó en células HEK 293 por medio de transfección transitoria, usando un agente policatiónico a base de polietileniminas (jetPEI). Esta técnica consiste en la introducción de ADN exógeno a las células por medio de endocitosis, en donde el agente de transfección jetPEI es el responsable de ello, además de proteger al ADN de la degradación, liberarlo dentro de la célula y permitir su translocación hasta el núcleo celular.

La transfección se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para lo cual se realizaron dos mezclas en tubos separados: tubo 1: 200 ng del vector pcDNA3.1-hTRPV1 o 300 ng de pcDNA3.1-hTRPV1-S117A en 100 μ l de NaCl 150 mM y tubo 2: 3 μ l del reactivo de transfección jetPEI con 100 μ l de NaCl 150 mM, los contenidos de ambos tubos fueron mezclados por vortex, posteriormente se mezclaron los contenidos de ambos tubos, añadiendo el contenido del tubo 2 a la mezcla del tubo 1, se mezcló mediante vortex y se dejó incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente para su posterior aplicación a las células. Después de 16 horas de haber aplicado la mezcla de transfección, se cambió el medio de cultivo y las células se dejaron incubando 24 horas más para su utilización en los tratamientos.

5.4 Preparación de stocks de lípidos.

Todos los fosfolípidos fueron preparados en stocks de 10 mM en DMEM con 1% de albumina de suero bovino deslipidado (BSA). Se calcularon los gramos necesarios de cada compuesto. Para ello se usaron los pesos moleculares obtenidos de Avanti Polar Lipids Inc. del LPA 18:1 (458.502 gr/mol), LPA 18:0 (460.518 gr/mol) y LPA 6:0 (287.247 gr/mol) y se procedió a la realización de los cálculos mediante la **fórmula 2**.

$$M = \text{moles /litro}$$

Fórmula 2 para obtener los gramos necesarios de cada compuesto para la preparación de los stocks 10 mM a partir del peso molecular de los fosfolípidos obtenidos de Avanti Polar Lipids Inc. (LPA 18:1 (458.502 gr/mol), LPA 18:0 (460.518 gr/mol) y LPA 6:0 (287.247 gr/mol).

Una vez obtenido el cálculo de los gramos necesarios para cada compuesto, se procedió a mezclarlos en el volumen requerido de DMEM con 1% de BSA libre de ácidos grasos. Se realizó la mezcla vigorosa de cada uno de los stocks mediante vórtex, para su posterior sonicación durante 15 min. Finalmente, los stocks se incubaron 1 h a 37°C bajo atmósfera de CO₂, y se realizaron alícuotas de 50 µl en viales de cristal, colocando las alícuotas en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -70°C.

Para cada tratamiento, la alícuota de LPA 10 mM fue descongelada mediante agitación vigorosa con vórtex e incubada durante 1 h a una temperatura aproximada de 36.5-37°C y se volvió a mezclar vigorosamente. Finalmente, se tomó la cantidad de LPA 10 mM necesaria para preparar cada una de las concentraciones de los tratamientos (10, 5, 2.5 y 1 µM) en solución de registro con o sin Ca²⁺ 2 mM. La

preparación del stock de anandamida (AEA) se realizó a 10 mM en metanol y se tomó la cantidad de AEA para preparar cada una de las concentraciones de los tratamientos (5, 2.5 y 1 μ M) en solución de registro con Ca^{2+} .

5.5. *Electrofisiología*

Los experimentos de electrofisiología siempre se realizaron antes de cada tratamiento con LPA 18:1 con el objetivo de verificar si el LPA preparado activaba al canal hTRPV1. Estos experimentos se llevaron a cabo por medio de la técnica de *Patch Clamp*, en modalidad de parche escindido en la configuración *inside-out*. Se utilizaron micropipetas con una resistencia de 3-5 $\text{M}\Omega$, un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti-S) con lámpara de epifluorescencia (Nikon Intensilight C-HGFI), amplificador EPC10 (HEKA Elektronik), micromanipulador motorizado MO-225 (Sutter Instruments) y un sistema de recambio rápido de soluciones RSC-200 (BioLogic, Science Instruments).

El stock de LPA se descongeló con vortex y se dejó incubando a 36-37°C durante 1 hora antes de preparar una solución de 5 μ M de LPA. La confirmación del efecto agonista del LPA 18:1 sobre el canal hTRPV1 se realizó aplicando al parche de membrana, que contenía los canales hTRPV1, LPA 5 μ M en solución simétrica de solución de registro (130 mM de NaCl, 3 mM de HEPES, 1 mM de EDTA sin Ca^{2+}). Las corrientes generadas se registraron antes y después de los 5 min de exposición al LPA, mediante la aplicación de dos pulsos de voltaje a -120 mV y a +120 mV con un potencial de mantenimiento de 0 mV. Posteriormente se expuso el parche a capsaicina y se tomó otro registro bajo los mismos pulsos de voltaje. Los registros se realizaron con el programa Patchmaster (HEKA Instruments) y se analizaron con

el programa IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Aplicando la fórmula 3, se obtuvo el porcentaje de corriente generada por la activación del LPA.

$$I/I_{Max} = \frac{I(\text{Corriente generada por LPA})}{I_{Max}(\text{Corriente generada por capsaicina})} * 100$$

Fórmula 3 para obtener el porcentaje de activación del LPA, el cual sirve para poder tener una comparación entre las corrientes generadas por nuestros compuestos de estudio y la corriente generada por el agonista capsaicina.

5.6. Preparación de agonistas endógenos para dar tratamientos a cultivos celulares

El stock de LPA se descongeló por medio de agitación vigorosa con vortex y se dejó incubando a 36-37°C durante 1 hora antes de preparar las soluciones para cada tratamiento. El tratamiento del LPA 18:1 para aplicar en cultivo celular, se realizó en solución de registro a concentraciones 10 µM, 5 µM, 2.5 µM y 1 µM en condiciones con (2 mM) o sin Ca²⁺ durante 30 minutos. Para los tratamientos de los otros lípidos (LPA 6:0 y LPA 18:0) se prepararon en solución de registro, pero a una concentración de 2.5 µM y 10 µM en condiciones de 2 mM de Ca²⁺ durante 30 minutos. El tratamiento con anandamida (5 µM, 2.5 µM y 1 µM) se realizó en solución de registro con 2 mM de Ca²⁺. Los cálculos para poder obtener las concentraciones finales deseadas se hicieron mediante el uso de la fórmula 4. Para cada tratamiento se incluyó un grupo control que consiste en células incubadas con el porcentaje correspondiente de vehículo del LPA 18:1, 18:0 y 6:0 (DMEM-BSA) o el de anandamida (metanol).

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Fórmula 4 para obtener las concentraciones finales deseadas en los tratamientos. C1= concentración inicial, C2= concentración final, V1=volumen inicial y V2 volumen final.

5.7. Lisis celular y obtención de proteínas totales

Después de haber pasado el tiempo de los tratamientos (30 min para los agonistas endógenos y 20 min para capsaicina), las células fueron lisadas para la extracción de proteínas. Como primer paso, las células se cosecharon mediante el uso de micropipeta, se centrifugaron a 1600 rpm por 3 minutos. El botón celular obtenido fue homogeneizado en 100 µl de buffer de lisis 1x (Tris Cl pH8 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Tritón X-100, 1X del inhibidor comercial de proteasas Complete y 2.5 mM NaF). Finalmente, las células fueron centrifugadas a 13 200 rpm durante 3 minutos y se recolectó el sobrenadante, el cual contenía las proteínas totales. Las muestras se guardaron a -70°C en caso de no ser cuantificadas al momento.

5.8. Cuantificación de proteínas

El fundamento de la cuantificación de proteínas por medio del ácido bicinconínico consiste en formar un complejo púrpura intenso con el ion cuproso (Cu^+), el cual es el resultado de la reacción de las proteínas con el Cu^{2+} . Posteriormente, la intensidad del complejo púrpura que es proporcional a la cantidad de proteínas, es cuantificada por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. El método de ácido bicinconínico consiste en la aplicación de una solución de trabajo (ácido bicinconínico más Cu^{2+}) a muestras de proteína de concentración conocida (BSA) que constituyen la curva patrón (0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2 µg/µl

de BSA) y a muestras problemas. Una vez incubadas las muestras durante 30 minutos a 37°C, se analizaron las absorbancias de las muestras a 562 nm. Las absorbancias de las muestras problema se extrapolaron con los datos de la curva patrón mediante una regresión lineal, utilizando el programa GraphPad Prism, para poder así obtener las concentraciones de proteínas de las muestras problema.

5.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La separación de proteínas para la detección del canal hTRPV1 y la proteína de control de carga (GAPDH) se realizó por medio de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS).

Esta técnica consiste en la separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular, para lo cual se prepararon geles de poliacrilamida al 10% (de acuerdo a lo indicado en: *Current Protocol in Molecular Biology, One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins*). Las funciones de los geles de poliacrilamida son las de compactar las proteínas en los pozos del gel y separarlas de acuerdo a su peso molecular. Se utilizó un buffer de corrida 1x (Trizma Base 0.25M, 0.1% de SDS y glicina 0.192M) y una fuente de poder la cual proporciona la corriente necesaria que hace migrar a las proteínas del polo negativo al polo positivo teniendo como resultado su separación de acuerdo a su peso molecular. Primero se preparó el gel de separación con una concentración final de acrilamida del 10% y un gel de concentración al 3.9% de acrilamida. Posterior a la polimerización de los geles, se añadió el buffer de corrida 1x y se procedió a cargar 30 µg de proteínas de cada uno de los tratamientos, previamente cuantificados por el método de ácido

bicinconónico. Los geles se dejaron corriendo a 20 mA a máximo voltaje durante 2 horas y 30 minutos.

5.10. Western Blot

La técnica de Western Blot consiste en la transferencia de las proteínas que se separaron en el gel de poliacrilamida hacia membranas de PVDF en donde se utilizó una fuente de poder y un buffer de transferencia (Glicina 39 mM, Trizma Base 48 mM, .037% de SDS y 20% de MeOH).

Una vez obtenidos los geles con las proteínas separadas de acuerdo a su peso molecular se transfirieron a una membrana de PVDF durante 1 hora a 100 V y a máxima corriente (transferencia sumergida).

Posteriormente, la membrana se bloqueó añadiendo 10-15 ml de PBS-T (PBS 1x más 0.1% de Tween) con leche descremada al 6% y se dejó incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente con movimiento.

Una vez pasado el bloqueo, la membrana fue lavada con PBS-T durante 5 minutos, e incubada con el anticuerpo primario para la detección de hTRPV1 (P-19 Santa Cruz) diluido 1:1000 en PBS-T con 3% de leche descremada y para la detección de la proteína GAPDH, se usó el anticuerpo (14C10, Cell Signaling) diluido 1:5000 en PBS-T con leche al 3%. En algunos experimentos la inmunodetección de actina se realizó como control de carga, utilizando un anticuerpo monoclonal no comercial (donado) diluido 1:500 en PBS-T. Las incubaciones se realizaron toda la noche a 4°C.

Posterior a las horas de incubación, se retiró el anticuerpo primario, se lavó 3 veces la membrana con PBS-T durante 10 minutos y se añadió el anticuerpo secundario

para TRPV1 (anti-cabra 1:5000) y para GAPDH (anti-conejo 1:7500) diluidos en PBS-T con leche al 3%. El caso de la inmunodetección de actina se realizó la incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:5000 en PBS-T). Las incubaciones de los anticuerpos secundarios se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Al término de la incubación de los anticuerpos secundarios, se enjuagó la membrana 3 veces durante 10 minutos con PBS-T y se revelaron mediante la utilización de un kit de quimioluminiscencia (ECL Western Blot) en condiciones sin iluminación. Una vez obtenidas las bandas correspondientes a la señal de las proteínas se procedió a un análisis densitométrico y estadístico.

5.11. Análisis densitométrico y estadístico.

El análisis densitométrico tiene como objetivo la cuantificación de las bandas obtenidas por la presencia de nuestras proteínas de interés (TRPV1 y GAPDH).

Una vez obtenidos los 3 experimentos independientes de cada uno de los tratamientos dados, se procedió a realizar el análisis densitométrico de cada una de las placas obtenidas del Western Blot utilizando el programa ImageJ el cual asigna un valor numérico proporcional (área bajo la curva) a la intensidad de la señal. Posteriormente se realizó un análisis estadístico t de student no pareada (unpaired) y se estableció un valor de $*p < 0.05$ o $**p < 0.005$ como indicativo de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dados. Además, se realizaron las gráficas de los niveles de expresión relativa del grupo con tratamiento con respecto al grupo control, al cual se le asignó como el 100%. Lo anterior se realizó mediante la utilización del programa GraphPad Prism.

6. Resultados

6.1 Evaluación de la desensibilización celular del canal hTRPV1 por efecto del tratamiento con capsaicina

Previamente, se reportó que la capsaicina disminuye los niveles de proteína del canal TRPV1 de origen de rata (desensibilización celular) (Sanz-Salvador *et al.*, 2012). Con el objetivo de saber si este efecto se conserva sobre el canal TRPV1 de origen de humano (hTRPV1), se procedió a realizar tratamientos con diferentes concentraciones de capsaicina (5, 2.5 y 1 μM) a células HEK 293 con expresión transitoria del canal hTRPV1. Estos experimentos se realizaron en medio DMEM (el cual contiene alrededor de 1.8 mM Ca^{+2}) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Pasados 20 minutos de tratamiento a 37°C, se procedió a realizar la extracción de proteínas totales para la evaluación de los niveles de la proteína total TRPV1 por medio de Western Blot. Como resultado de estos experimentos, se observó una disminución del 80%, 75% y 40% de la proteína total TRPV1 por el tratamiento con capsaicina a concentraciones de 5, 2.5 y 1 μM , respectivamente (**Fig. 6**).

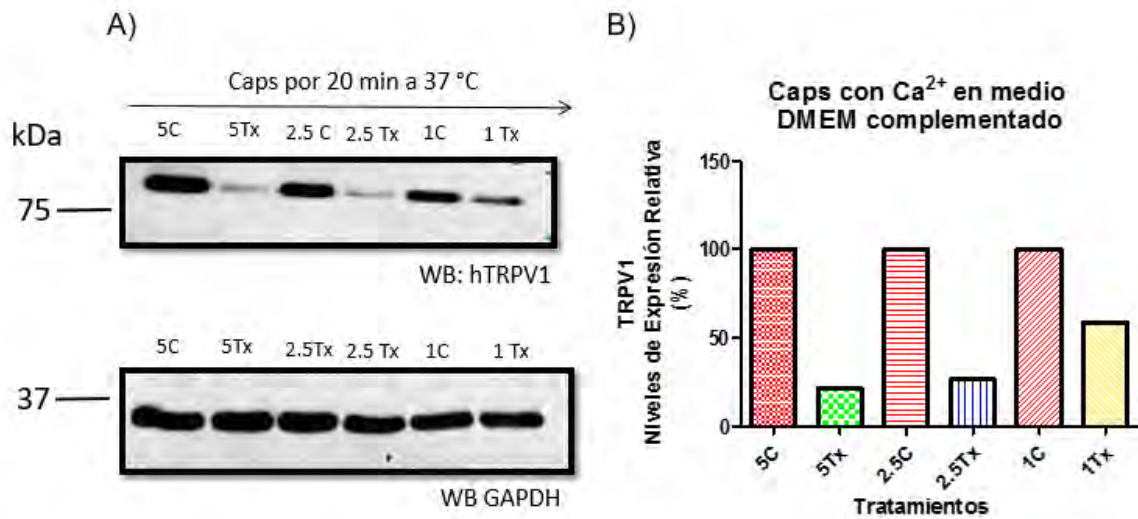


Fig. 6 Disminución de la proteína total hTRPV1 por efecto del tratamiento con capsaicina. A) Inmunodetección de la proteína total hTRPV1 expresada en células HEK 293 control (C) e incubadas a diferentes concentraciones con capsaicina en medio DMEM con 10% de SFB. La inmunodetección de GAPDH se realizó como control de carga. 5C: Control (0.05% MeOH), 5Tx: Tratamiento 5 μ M, 2.5C: Control (0.025% MeOH), 2.5Tx: Tratamiento 2.5 μ M, 1C: Control (0.01% MeOH) y 1Tx: Tratamiento 1 μ M. **B)** Gráfica que muestra la señal normalizada para el canal hTRPV1 con respecto a su control de carga (GAPDH). La gráfica muestra el porcentaje de proteína total hTRPV1 del control (C), el cual fue establecido como el 100% y para cada uno de los tratamientos (Tx) resultó ser: 20% (5 μ M), 25% (2.5 μ M) y 60% (1 μ M). Experimento único. Caps=capsaicina.

La activación del canal TRPV1 por compuestos de origen lipídico y la presencia de estos en el SFB, nos llevó a evaluar si dichos lípidos podrían estar actuando conjuntamente con la capsaicina para provocar cambios en los niveles de proteína hTRPV1. Por lo que se procedió a realizar los tratamientos en solución de registro carente de lípidos biológicamente activos y además se tiene la ventaja de poder controlar las concentraciones de Ca^{2+} extracelular.

Contrario a lo que se veía en los tratamientos con medio DMEM con SFB, los efectos de la capsaicina en solución de registro con 2 mM de Ca^{2+} a una concentración alta de 5 μ M no muestran un efecto tan notable para disminuir la cantidad de proteína hTRPV1, ya que la disminución del canal resultó ser de solamente un $25 \pm 8\%$ comparado con el 80% de disminución observada en medio DMEM con SFB.

Mientras tanto, a concentraciones (1 y 2.5 μ M) de capsaicina, la disminución en la proteína total hTRPV1 fue de un $50 \pm 17\%$ y $50 \pm 14\%$, respectivamente (**Fig. 7**).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el efecto de la capsaicina se potencia en los tratamientos en los cuales se usa DMEM complementado con 10% de SFB, causando una disminución de los niveles proteínicos del canal.

Con estos resultados se observa que la desensibilización celular del canal TRPV1 por efecto de la capsaicina es independiente del origen de especie (Sanz-Salvador *et al.*, 2012), y que la presencia del SFB favorece la disminución de la proteína TRPV1 por efecto del tratamiento con capsaicina.

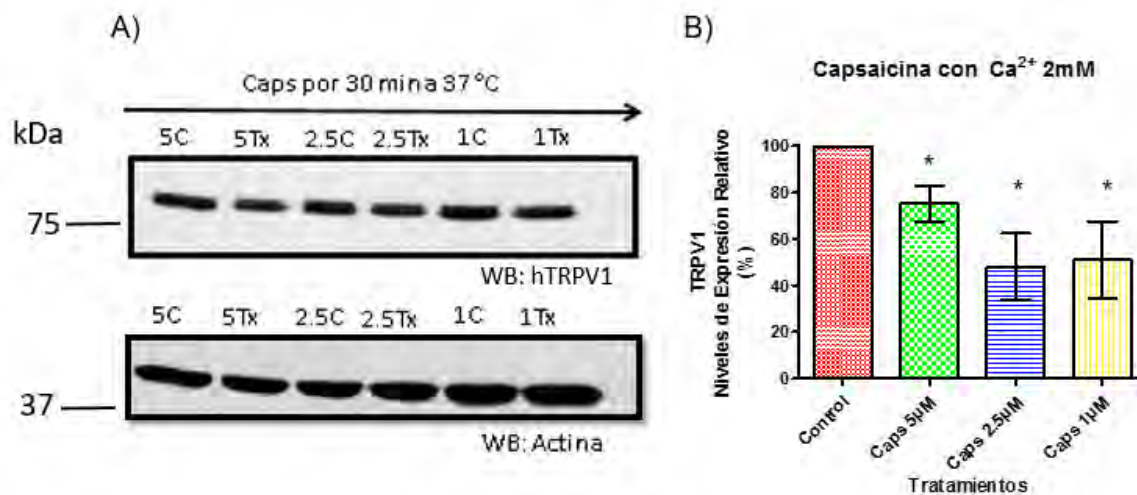


Fig. 7 Disminución de la proteína total hTRPV1 por efecto del tratamiento con capsaicina sin SFB. **A)** Inmunodetección de la proteína total hTRPV1 expresada en células HEK 293 control (C) e incubadas a diferentes concentraciones con capsaicina (Tx) en solución de registro con 2 mM de Ca^{2+} y sin SFB. La inmunodetección de actina se realizó como control de carga. 5C: Control (0.05% MeOH), 5Tx: Tratamiento 5 μ M, 2.5C: Control (0.025% MeOH), 2.5Tx: Tratamiento 2.5 μ M, 1C: Control (0.01% MeOH) y 1Tx: Tratamiento 1 μ M **B)** La gráfica muestra la señal normalizada de la proteína total hTRPV1 con respecto a su control de carga (Actina), en la cual se observa el porcentaje de la proteína total hTRPV1 con respecto a las células control, el cual fue establecido como el 100% (Control); para los tratamientos (Tx) resultó ser de: $75 \pm 8\%$ (5 μ M), $50 \pm 14\%$ (2.5 μ M) y del $50 \pm 17\%$ (1 μ M). Los valores representan la media de cuatro réplicas independientes (n=4). Fue aplicado un análisis estadístico t de student, *p < 0.05.

6.2 Activación del canal hTRPV1 por LPA 18:1

Previamente se había reportado que el LPA 18:1 activa al canal TRPV1 de origen de rata (rTRPV1) (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). Haciendo un alineamiento de los aminoácidos necesarios para la interacción del LPA con el canal de origen de humano (hTRPV1) y de rata (rTRPV1), se encontró que la secuencia de humano conserva el aminoácido K710 el cual es importante para la activación del canal por medio del LPA (**Fig. 8**). Es por ello que se procedió a confirmar el efecto agonista del LPA sobre el canal TRPV1 de origen de humano (hTRPV1).

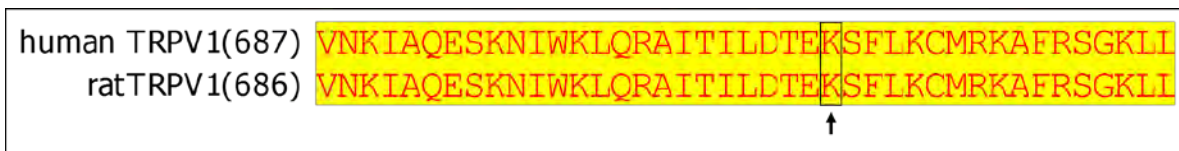


Fig. 8 Alineamiento entre secuencias de aminoácidos de hTRPV1 y rTRPV1 homologas. El alineamiento de secuencias entre el hTRPV1 y el rTRPV1 homologas, nos muestran al aminoácido K710 conservado en ambos canales (señalado con una flecha), aminoácido importante para la activación del canal TRPV1 por medio del ácido lisofosfatídico 18:1 (LPA 18:1) (Obtenido por medio del programa VectorNTI).

Para ello se realizaron ensayos de electrofisiología por medio de la técnica del *Patch Clamp*, en modalidad de parches de membrana escindido configuración inside-out en células HEK 293 con expresión transitoria del canal hTRPV1. Primero, los parches de membrana escindidos se incubaron durante 5 min con el LPA 18:1 (5 μ M), registrando las corrientes producidas antes y después de la aplicación del lípido. Posteriormente, el parche fue expuesto a 4 μ M de capsaicina. Como resultado de este protocolo se registró una corriente iónica evocada por el LPA 18:1 de alrededor del 89% con respecto a la activación máxima producida por la capsaicina. Esto se nos indica que el LPA produce corrientes iónicas muy

parecidas en magnitud a la generadas por la capsaicina y que la activación del canal TRPV1 por el LPA es independiente del origen de la especie del canal (**Fig. 9**).

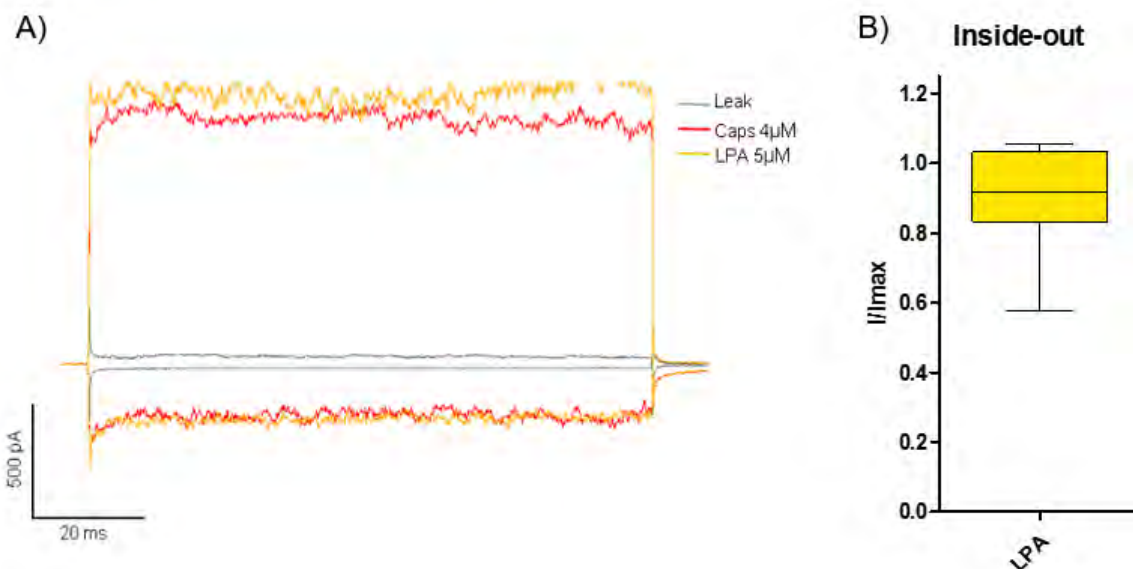


Fig. 9 Corrientes iónicas del canal hTRPV1 en parches escindidos de membrana de células HEK 293. A) Trazo representativo de las corrientes generadas por la activación del canal hTRPV1 presente en parches de membrana en configuración Inside-out, incubados con 5 μM de LPA (trazo amarillo) y 4 μM de capsaicina (Caps, trazo rojo). Leak, (trazo en gris) representa la corriente basal de la célula. **B)** Gráfica de la corriente evocada por 5 μM de LPA (I) normalizada a la corriente máxima evocada por 4 μM capsaicina ($I_{\text{max}}=1$). La línea horizontal dentro de la caja representa la media, la caja muestra el 25 y 75 percentiles ($n=13$). pA: picoAmperes, ms: milisegundos.

6.3 Evaluación de la desensibilización celular del canal hTRPV1 por efecto del tratamiento con LPA 18:1

Para determinar la posible disminución en la proteína total hTRPV1 por efecto del tratamiento con LPA 18:1, las células HEK 293 con expresión transitoria del canal, fueron tratadas con diferentes concentraciones de LPA 18:1 (1, 2.5 y 5 μM) en solución de registro al cual se adicionó 2 mM de Ca^{2+} y en ausencia de SFB (esto con el fin de evitar el efecto potenciador del SFB observado en los experimentos con capsaicina y atribuir posibles efectos sólo a la presencia del LPA). Los resultados muestran una disminución del $25 \pm 8\%$ y $20 \pm 3\%$ en los niveles de

proteína total hTRPV1 a concentraciones de 5 y 2.5 μM de LPA, pero no a concentraciones de 1 μM . Por el contrario, a esta concentración se observó un aumento en la cantidad de proteína de alrededor de un $15 \pm 2\%$ (Fig. 10).

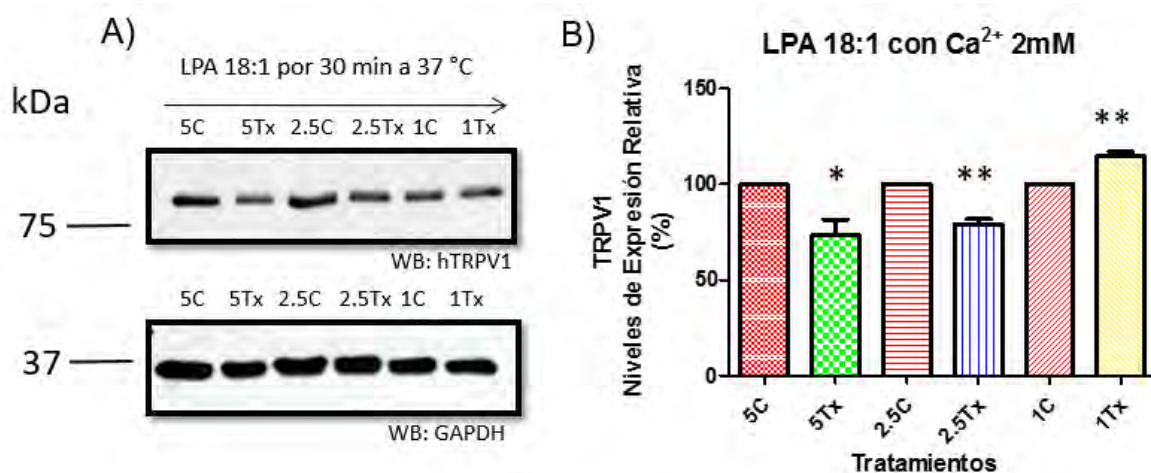


Fig. 10 Evaluación de los niveles de proteína total hTRPV1 por efecto del tratamiento con LPA 18:1 en presencia de iones calcio. **A)** Inmunodetección de la proteína total hTRPV1 expresada en células HEK 293 control (C) e incubadas a diferentes concentraciones con LPA (Tx) en solución de registro con 2 mM de Ca²⁺ y sin SFB. La inmunodetección de GAPDH se realizó como control de carga. 5C: Control (0.05% DMEM-BSA, vehículo del LPA), 5Tx: Tratamiento 5 μM , 2.5C: Control (0.025% DMEM-BSA), 2.5Tx: Tratamiento 2.5 μM , 1C: Control (0.01% DMEM-BSA) y 1Tx: Tratamiento 1 μM **B)** La gráfica muestra la señal normalizada para la proteína total hTRPV1 con respecto a su control de carga (GAPDH), en la cual se observa el porcentaje de proteína total hTRPV1 con respecto a las células control, el cual fue establecido como el 100% (Control); para los tratamientos (Tx) resultó ser de: $75 \pm 8\%$ (5 μM), $80 \pm 3\%$ (2.5 μM) y del $115 \pm 2\%$ (1 μM). Los valores representan la media de tres réplicas independientes (n=3). Fue aplicado un análisis estadístico t de student, *p< 0.05, **p<0.005.

Además, se evaluó si una concentración más elevada de LPA podría tener un mayor efecto en la desensibilización del canal, para lo cual se realizó el tratamiento de LPA a una concentración de 10 μM , observándose que no existe una dosis dependencia del efecto, ya que a esta concentración se ve un efecto de reducción de la proteína de hTRPV1 de sólo el $10 \pm 4\%$ que no resultó ser estadísticamente significativo (Fig. 11).

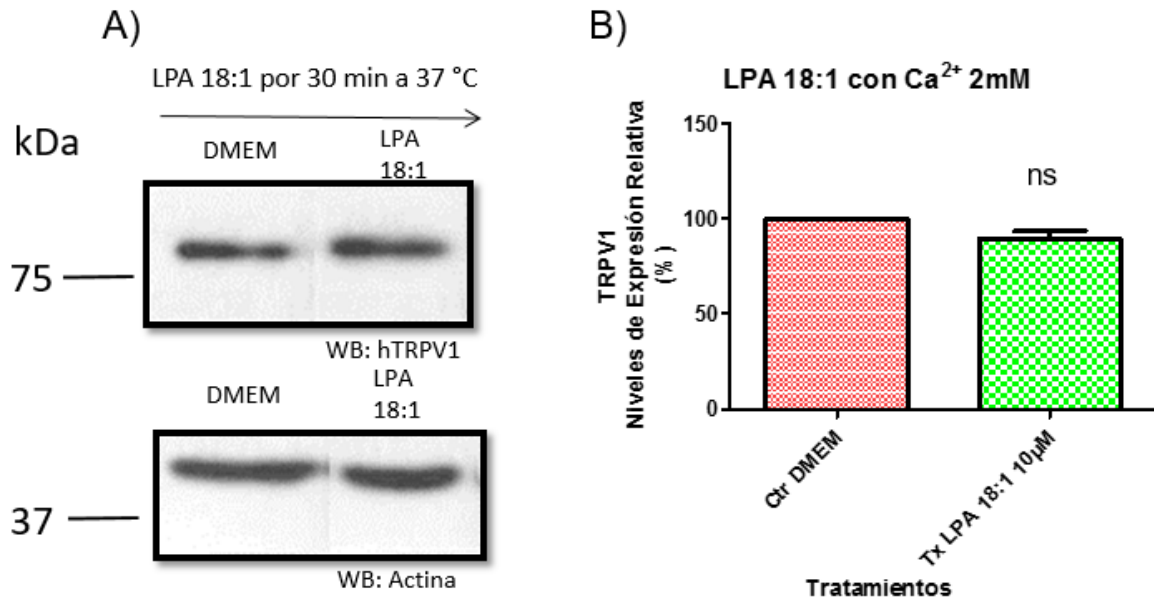


Fig. 11. Evaluación de los niveles de proteína total hTRPV1 por efecto del tratamiento con 10 µM de LPA 18:1. **A)** Inmunodetección de la proteína total hTRPV1 expresada en células HEK 293 control (X % DMEM-BSA) e incubadas con 10 µM de LPA (Tx) en solución de registro con 2 mM de Ca²⁺ y sin SFB. La inmunodetección de actina se realizó como control de carga. DMEM: Control (0.1% DMEM-BSA, vehículo del LPA), LPA 18:1=Tratamiento 10 µM. **B)** La gráfica muestra la señal normalizada para la proteína total hTRPV1 con respecto a su control de carga (Actina), en la cual se observa el porcentaje de proteína total hTRPV1 con respecto a las células control, el cual fue establecido como el 100% (Control). La gráfica muestra un ligero efecto de disminución en los niveles de proteína total del canal hTRPV1 respecto al control, el cual no resultó ser estadísticamente significativo (n=3), t de student, ns: no significativo.

La desensibilización celular del canal rTRPV1 por capsaicina necesita el flujo de iones de Ca²⁺ hacia el interior de la célula, por lo tanto, si no existe este flujo no se lleva a cabo la disminución de la proteína rTRPV1. Para determinar si el 20% de disminución de la proteína hTRPV1 mediada por LPA 18:1 a 5 y 2.5 µM era dependiente de la presencia de calcio, se procedió a dar tratamientos a las mismas concentraciones de LPA en solución de registro sin Ca²⁺, observándose que ya no existen cambios en los niveles de proteína total hTRPV1 a estas concentraciones. Además, se observó que el aumento en la cantidad de proteína hTRPV1 a la menor

concentración de LPA (1 μM) necesita la presencia de Ca^{2+} , ya que en condiciones libres del catión ya no se observa ningún aumento. Por el contrario, existe una disminución del canal del $12 \pm 2\%$ que resultó estadísticamente significativo (**Fig. 12**).

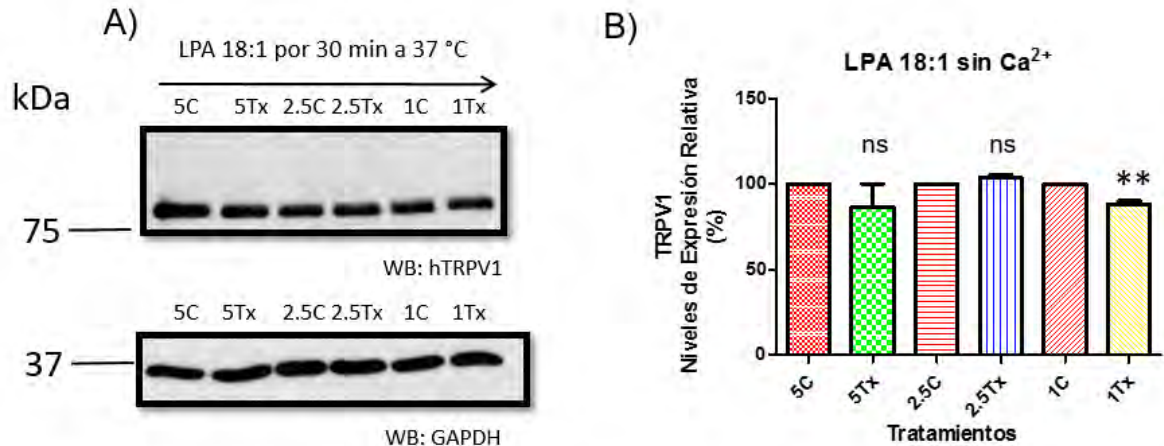


Fig. 12 Evaluación de los niveles de proteína total hTRPV1 por efecto del tratamiento con 10 μM de LPA 18:1 en condiciones libres de calcio **A)** Inmunodetección de la proteína total hTRPV1 expresada en células HEK 293 control (X % DMEM-BSA) e incubadas con 10 μM de LPA (Tx) en solución de registro sin Ca^{2+} . La inmunodetección de GAPDH se realizó como control de carga. 5C: Control (0.05% DMEM-BSA, vehículo del LPA), 5Tx: Tratamiento 5 μM , 2.5C: Control (0.025% DMEM-BSA), 2.5Tx: Tratamiento 2.5 μM , 1C: Control (0.01% DMEM-BSA) y 1Tx: Tratamiento 1 μM **B)** La gráfica muestra la señal normalizada para la proteína total hTRPV1 con respecto a su control de carga (GAPDH), en la cual se observa el porcentaje de proteína total hTRPV1 con respecto a las células control, el cual fue establecido como el 100% (Control); para los tratamientos (Tx) resultó ser de: $86 \pm 14\%$ (5 μM), $104 \pm 2\%$ (2.5 μM) y del $88 \pm 2\%$ (1 μM). Los valores representan la media de tres réplicas independientes ($n=3$). Fue aplicado un análisis estadístico t de student, $**p < 0.005$, No significativo (ns).

Con estas dos condiciones de tratamiento con LPA, los resultados muestran que la presencia o ausencia de Ca^{2+} juegan un papel importante en el efecto parcial de desensibilización celular del LPA sobre el canal hTRPV1.

6.4 Determinación de la desensibilización celular del canal hTRPV1-S117A por efecto del LPA 18:1

El parcial efecto del LPA para disminuir la cantidad de canales hTRPV1 nos llevó a evaluar si esto era mediado por alguna vía de señalización, esto partiendo del antecedente en el cual se ha determinado que PKA fosforila al residuo de serina 116 en el canal rTRPV1 evitando su desensibilización. Para ello, primero se realizó una construcción de ADN con una mutación puntual en el residuo Serina 117 del canal hTRPV1 (residuo homólogo al de S116 de rTRPV1, **Fig. 13**), el cual se cambió por alanina (no polar), un aminoácido que no puede ser fosforilado por la PKA. Las células HEK 293 se transfectaron con esta construcción mutante (pcDNA3.1-hTRPV1-S117A) para evaluar su desensibilización celular por efecto del LPA 18:1.

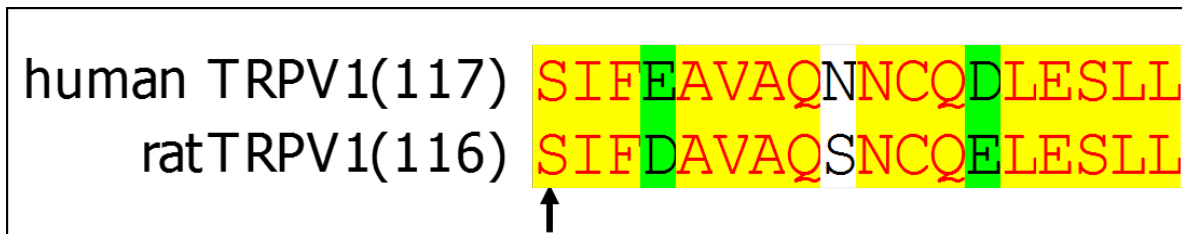


Fig. 13 Secuencia homologa de aminoácidos entre el canal hTRPV1 y rTRPV1. El alineamiento de secuencias entre hTRPV1 y rTRPV1 demuestra que el aminoácido S116 de rTRPV1 esta conservado en hTRPV1, pero en una posición diferente, S117 (Obtenido por medio del programa Vector NTI).

El tratamiento con 5 μM de LPA en solución de registro con 2 mM de Ca^{2+} , claramente ocasionó una disminución del $52 \pm 12\%$ en la proteína total hTRPV1-S117A. A concentraciones más bajas de LPA (2.5 μM) los niveles de expresión del canal no cambiaron ($1 \pm 4\%$) y a la concentración más baja de 1 μM se muestra una tendencia al aumento de la proteína, aunque no fue estadísticamente significativo ($12 \pm 7\%$) (**Fig. 14**).

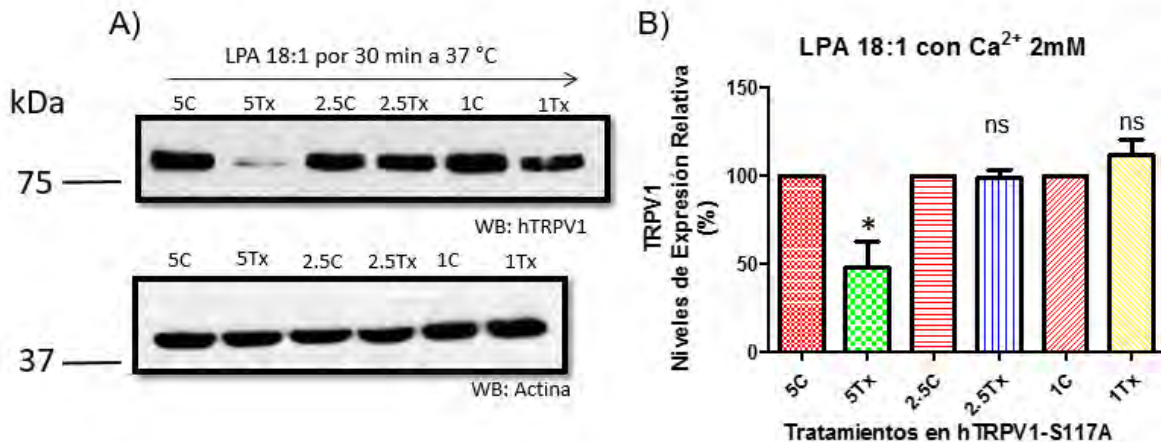


Fig. 14 Determinación de los niveles de proteína total hTRPV1-S117A por efecto del tratamiento con LPA 18:1

A) Inmunodetección de la proteína total hTRPV1-S117A expresada en células HEK 293 control (C) e incubadas a diferentes concentraciones con LPA (Tx) en solución de registro con 2 mM de Ca^{2+} y sin SFB. La inmunodetección de actina se realizó como control de carga. 5C: Control (0.05% DMEM-BSA, vehículo del LPA), 5Tx: Tratamiento 5 μ M, 2.5C: Control (0.025% DMEM-BSA), 2.5Tx: Tratamiento 2.5 μ M, 1C: Control (0.01% DMEM-BSA) y 1Tx: Tratamiento 1 μ M

B) La gráfica muestra la señal normalizada para la proteína total hTRPV1-S117A con respecto a su control de carga (GAPDH), en la cual se observa el porcentaje de proteína total con respecto a las células control, el cual fue establecido como el 100% (Control); para los tratamientos (Tx) resultó ser del $48 \pm 12\%$ (5 μ M), $99 \pm 4\%$ (2.5 μ M) y del $112 \pm 7\%$ (1 μ M) de proteína total hTRPV1-S117A. Los valores representan la media de cuatro réplicas independientes ($n=4$). Fue aplicado un análisis estadístico "t" de student, $*p < 0.05$, No significativo (ns).

Por el contrario, los tratamientos en condiciones sin Ca^{2+} en esta construcción mutante, no ocasionaron ningún tipo de cambio en los niveles de la proteína hTRPV1-S117A, indicando que la concentración de 5 μ M de LPA favorece la desensibilización celular sólo cuando el canal no se puede fosforilar en la Serina 117 y además este proceso necesita la presencia de Ca^{2+} (**Fig. 15**).

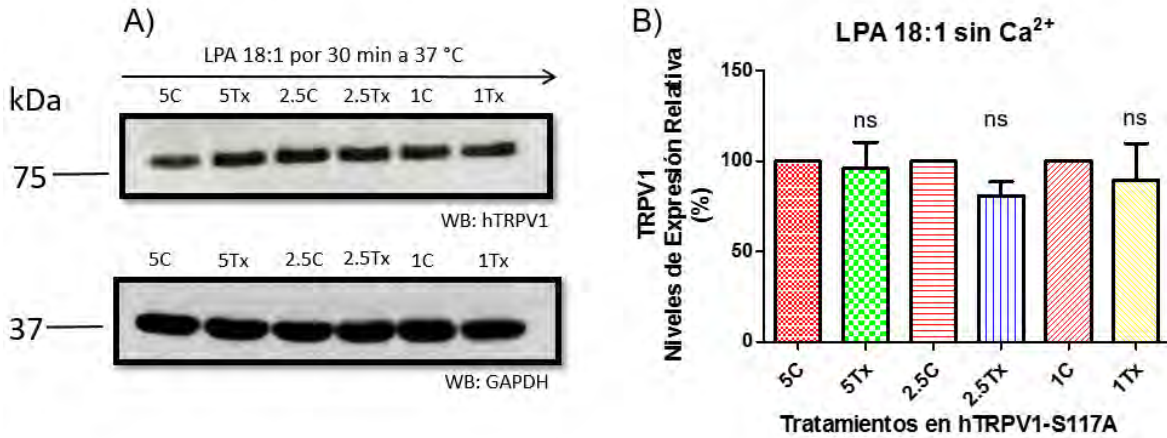


Fig. 15 Determinación de los niveles de proteína total hTRPV1-S117A por efecto del tratamiento con LPA 18:1 en ausencia de iones calcio A) Inmunodetección de la proteína total hTRPV1-S117A expresada en células HEK 293 control (C) e incubadas a diferentes concentraciones con LPA (Tx) en solución de registro sin Ca²⁺. La inmunodetección de GAPDH se realizó como control de carga. 5C: Control (0.05% DMEM-BSA, vehículo del LPA), 5Tx: Tratamiento 5 µM, 2.5C: Control (0.025% DMEM-BSA), 2.5Tx: Tratamiento 2.5 µM, 1C: Control (0.01% DMEM-BSA) y 1Tx: Tratamiento 1 µM **B)** La gráfica muestra la señal normalizada para la proteína total hTRPV1-S117A con respecto a su control de carga (GAPDH), en la cual se observa el porcentaje de proteína total con respecto a las células control, el cual fue establecido como el 100% (Control); para los tratamientos (Tx) resultó ser del 104 ± 15% (5 µM), 81 ± 8% (2.5 µM) y del 100 ± 20% (1 µM). Los valores representan la media de tres réplicas independientes (n=3). Fue aplicado un análisis estadístico “t” de student, No significativo (ns).

6.5 Evaluación del efecto de los fosfolípidos LPA 18:0 y LPA 6:0 en los niveles de proteína hTRPV1

En un estudio previo, se observó que existen otros fosfolípidos con capacidad de unirse al canal TRPV1, pero no lo activan (por ejemplo, LPA 18:0 y LPA 6:0) (Morales-Lázaro *et al.*, 2014). Por lo que se realizaron tratamientos con estos fosfolípidos, con el objetivo de saber si tenían algún efecto regulador en los niveles de proteína hTRPV1. Estos tratamientos se realizaron a dos concentraciones diferentes de LPA 18:0 o LPA 6:0 (2.5 y 10 µM), en solución de registro y en presencia de 2 mM de Ca²⁺.

El tratamiento con 10 µM de LPA 18:0 en presencia de 2 mM de Ca²⁺ generó un aumento del 67% ± 30% en la proteína hTRPV1. En el tratamiento con 2.5 µM de

LPA 18:0 se observó una tendencia al aumento en la proteína hTRPV1, pero este aumento no fue estadísticamente significativo (**Fig. 16**).

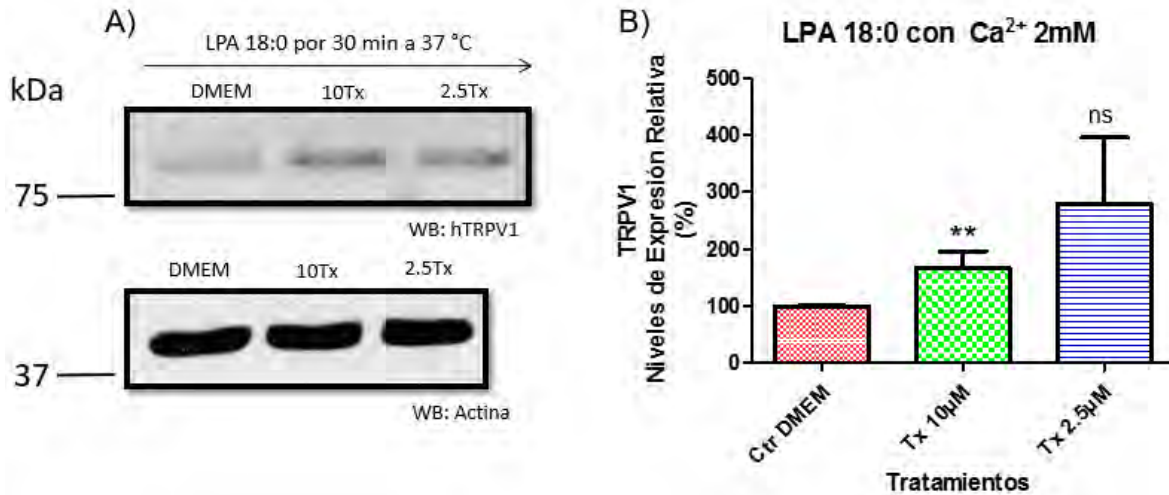


Fig. 16 Efectos en la expresión del canal hTRPV1 por el tratamiento con LPA 18:0. A) WB que muestra el efecto del LPA 18:0 en los niveles de proteína total hTRPV1 incubadas durante 30 minutos a 37°C en solución de registro con 2 mM de Ca^{2+} y 10 y 2.5 μ M de LPA 18:0 (Tx). La detección de actina se realizó como control de carga. B) La gráfica muestra los porcentajes de la señal normalizada del canal TRPV1, en la cual la condición control fue establecida como el 100% de proteína TRPV1 y para los tratamientos resultó ser $167 \pm 30\%$ (10 μ M) y de $280 \pm 116\%$ (2.5 μ M). Los valores representan la media de tres réplicas independientes (n=3). Fue aplicado un análisis estadístico "t" de student, No significativo (ns). ** $p < 0.005$.

Con respecto a los tratamientos con LPA 6:0, los cuales también se aplicaron en solución de registro con Ca^{2+} , se observó un aumento no significativo del doble en la cantidad de proteína hTRPV1 a la concentración de 2.5 μ M y este aumento, aunque en menor proporción, también se observó a la concentración de 10 μ M con un $19 \pm 2\%$ de aumento (**Fig. 17**).

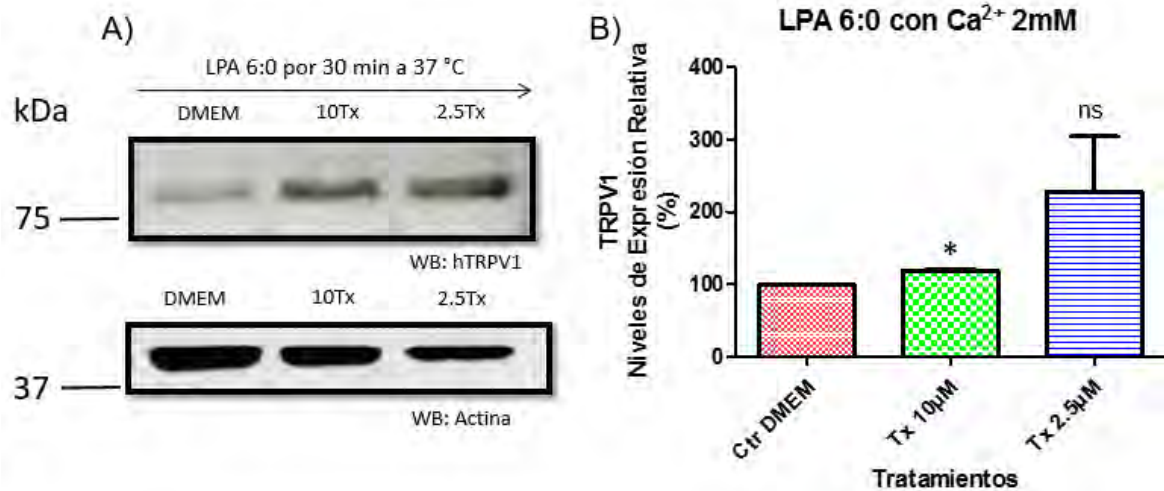


Fig. 17 Efecto del tratamiento con LPA 6:0 en los niveles de proteína TRPV1. A) WB que muestra el efecto del tratamiento con ácido lisofosfatídico 6:0 (LPA 6:0) sobre los niveles de proteína hTRPV1 en células incubadas durante 30 minutos a 37°C en solución de registro a 10 y 2.5 µM de LPA 6:0 (Tx) y para el control (C), solo con el vehículo del LPA (DMEM con BSA al 1%). La detección de Actina se realizó como control de carga. B) La gráfica muestra los porcentajes de la señal de TRPV1 normalizada, en la cual la condición control (C) fue establecida como el 100% y para los tratamientos los valores obtenidos fueron: 119 ± 2% (10 µM) y 228 ± 76% (2.5 µM). Los valores representan la media de tres réplicas independientes (n=3). Fue aplicado un análisis estadístico "t" de student, No significativo (ns). *p<0.05.

Estos resultados sugieren que algunos fosfolípidos que no activan al canal TRPV1, podrían tener un efecto positivo regulando los niveles de proteína hTRPV1, efecto que probablemente involucre la participación de los receptores a LPA.

6.6 Determinando la posible desensibilización celular del canal hTRPV1 por efecto de la anandamida.

Otro activador del canal TRPV1 es la anandamida, el cual es un lípido endógeno de carácter canabinoide (endocanabinoide) que actúa en diversas vías del dolor y en el sistema endocanabinérgico de nuestro organismo. Sorprendentemente, los efectos de este compuesto a concentraciones 2.5 µM y 5 µM tienden a disminuir hasta un 50% la expresión del canal TRPV1. Mientras que a concentraciones 1 µM no tiene efecto significativo (**Fig. 18**).

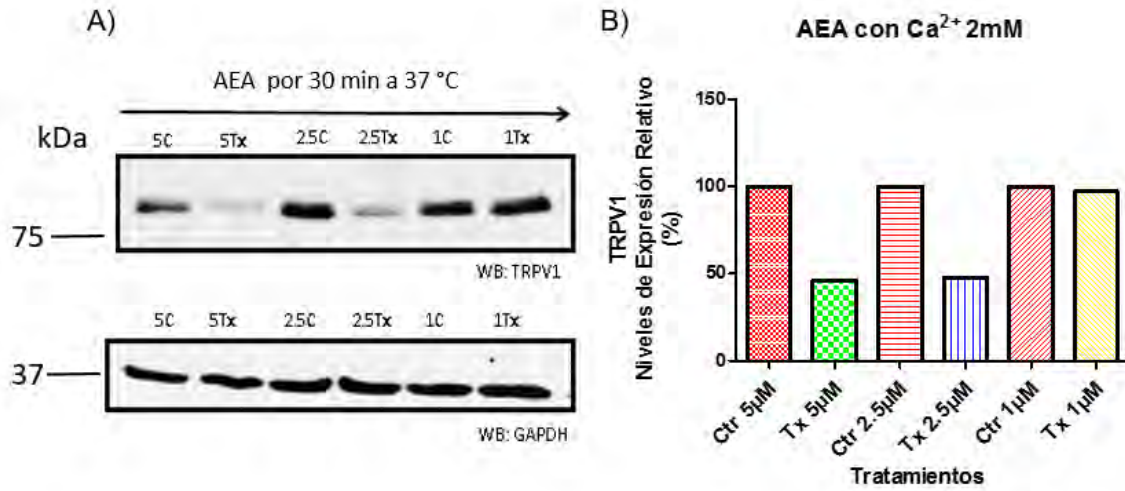


Fig. 18 Determinación de los niveles de la proteína total hTRPV1 por efecto del tratamiento con anandamida. A) Inmunodetección de la proteína hTRPV1 expresada en células HEK 293 control (C) e incubadas a diferentes concentraciones de anandamida (AEA) en células HEK 293 con expresión transitoria del canal hTRPV1 e incubadas durante 30 minutos a 37°C en solución de registro a diferentes concentraciones de AEA (Tx) en presencia de 2 mM de calcio. La condición control (C) se refiere a las células incubadas con el porcentaje correspondiente del vehículo de la AEA (metanol). La inmunodetección de GAPDH fue usada como control de carga. 5C: Control con 0.05% de MeOH, 5Tx: Tratamiento 5 µM, 25C: Control con 0.025% de MeOH, 25Tx: Tratamiento 2.5 µM, 1C: Control con 0.01% de MeOH y 1Tx: Tratamiento 1 µM. **B)** La gráfica muestra los porcentajes de la señal normalizada para la proteína TRPV1, en la cual la condición control (C), fue establecida como el 100% de nivel proteínico. Para cada tratamiento el valor obtenido resultó ser de 46% (5 µM), 47% (2.5 µM) y del 100%(1 µM). Experimento único.

7. Discusión

El canal TRPV1 expresado en neuronas sensoriales nociceptivas puede transmitir diferentes señales del ambiente y por lo tanto resulta relevante el estudio de los mecanismos moleculares que regulan su actividad (Vay *et al.*, 2012).

Estos mecanismos repercuten directamente en la generación de la respuesta de dolor en enfermedades crónicas, por ejemplo, la sensibilización del canal TRPV1 está relacionado con la activación del canal por estímulos de baja intensidad, generando, por ejemplo, hipersensibilidad térmica en procesos de inflamación (Mrozkova *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015) y alodinia en el dolor neuropático (Baron *et al.*, 2010). El otro mecanismo molecular para la regulación del canal TRPV1 es la desensibilización (ya sea a nivel biofísico o celular), la cual es una vía de inhibición del canal que protege del dolor crónico producido por ejemplo, en la neuropatía diabética (Ramkumar *et al.*, 2014), convirtiéndose en un mecanismo para la generación de analgesia (Smith y Brooks, 2014).

7.1 La proteína total hTRPV1 disminuye por el tratamiento con capsaicina

Previo a este trabajo, Sanz Salvador detalló a nivel molecular la disminución de la proteína total y de membrana del canal rTRPV1 por efecto del tratamiento con capsaicina (desensibilización celular), demostrando que estos efectos son mediados por el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula que promueve la internalización del canal rTRPV1 y su posterior degradación vía el lisosoma (Sanz-Salvador *et al.*, 2012). Sin embargo, en ese estudio no se determinó si compuestos

de producción endógena, y que funcionan como agonistas del canal TRPV1 (por ejemplo, el LPA 18:1 o anandamida) promuevan o no ese efecto desensibilizador. Además, en ese estudio se trabajó con el canal de origen de rata y no se sabía si este efecto se conserva en el canal de origen de humano (hTRPV1). Es por ello que en este trabajo se decidió explorar si la capsaicina disminuye la cantidad de canales hTRPV1. De acuerdo con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que este efecto se conserva sólo en los tratamientos con capsaicina en presencia de suero fetal bovino (SFB), lo cual es evidenciado por una marcada reducción en los niveles de proteína total hTRPV1 (Fig. 6). Sin embargo, en condiciones libres de SFB y concentraciones de Ca^{2+} controladas (2 mM), el canal hTRPV1 disminuye parcialmente sus niveles proteínicos (Fig. 7). El resultado en condiciones libres de SFB, difiere con respecto al efecto observado en rTRPV1 (Sanz-Salvador *et al.*, 2012) y en hTRPV1 en condiciones con SFB. Esta gran diferencia podría ser resultado de la presencia de diversas moléculas bioactivas en el SFB, ya que es un medio rico en diversos factores de crecimiento (IGF-1, TGF-Beta1 y FGF-2), hormonas y diferentes lípidos bioactivos (colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol), estos últimos sirven además como precursores de la síntesis de un agonista endógeno del canal TRPV1, el LPA (Mirendil *et al.*, 2013). Con base en estos resultados, se decidió trabajar en condiciones libres de suero, para asegurar que los efectos de cualquier agonista endógeno del canal TRPV1, como el LPA 18:1, no se enmascare o se potencien por efecto de otra molécula bioactiva.

7.2 La proteína total hTRPV1 disminuye parcialmente por efecto del tratamiento con LPA 18:1

El posible efecto en la desensibilización del canal hTRPV1 por efecto del tratamiento con LPA 18:1 se evaluó en condiciones libres de SFB y en presencia o ausencia de Ca^{2+} . En presencia de Ca^{2+} se observó que altas concentraciones de LPA (5 y 2.5 μM) producen una parcial disminución de la proteína hTRPV1 (solo un 25-20% de disminución) (Fig. 10), efecto que se revirtió en ausencia de Ca^{2+} (Fig. 12). En comparación de los datos obtenidos con capsaicina, podemos definir que a una concentración igual de LPA y capsaicina (5 μM) y en presencia de SFB y Ca^{2+} , se observó un efecto desensibilizador similar (disminución de alrededor de un 25% la proteína total hTRPV1). Sin embargo, a concentraciones más bajas de ambos agonistas se observan efectos diferentes, ya que a 2.5 μM de LPA 18:1 existe una disminución de la proteína hTRPV1 del 20% (Fig. 10), mientras que esa misma concentración de capsaicina favorece una disminución del 50% de la proteína hTRPV1, que se mantiene a 1 μM de capsaicina (Fig.7). Por el contrario, el tratamiento con 1 μM de LPA 18:1 aumenta la cantidad de proteína hTRPV1 en un 15% (Fig. 10). Más aún, consideramos la posibilidad de que a mayor concentración de LPA 18:1 se pudiera observar un efecto similar al de la capsaicina, sin embargo, a 10 μM sólo se obtiene alrededor de un 10% de disminución de la proteína hTRPV1 (Fig. 11). Estos resultados nos muestran que, a ciertas concentraciones, dos agonistas del canal hTRPV1, uno exógeno (capsaicina) y otro endógeno (LPA 18:1), ejercen diferente desensibilización celular sobre el canal hTRPV1. También se determinó que para los efectos parciales del LPA 18:1 se necesita la presencia de iones Ca^{2+} , indicando, que este efecto es parecido al de capsaicina. Además, el

ligero aumento en la proteína hTRPV1 por efecto de 1 μ M de LPA 18:1, también fue dependiente de la presencia de iones calcio (efecto no observado en ningún tratamiento con capsaicina), este dato nos podría indicar que, a esta concentración, se activan vías de señalización que podrían estar mediadas a través de alguno de los receptores al LPA y que favorecen la estabilización de la proteína hTRPV1, aunque este punto faltaría por abordar experimentalmente.

7.3 El LPA 18:1 disminuye la proteína total hTRPV1 carente del aminoácido fosforilable serina 117

Además, probamos si la parcial disminución de la proteína total hTRPV1 por efecto del LPA 18:1 podría ser dependiente de la vía de señalización por PKA, la cual puede activarse por medio de alguno de los receptores al LPA (LPA₄₋₆) (Mirendil *et al.*, 2013) y que repercutiera en fosforilación del canal hTRPV1 en Serina 117. Esta fosforilación ha sido descrita como clave para conferirle al canal TRPV1 resistencia a la internalización y por lo tanto resistencia a la degradación del canal (Mohapatra y Nau, 2005). Para abordar si este residuo (Serina 117) es importante para los efectos mediados por el LPA 18:1 sobre el hTRPV1, se realizaron experimentos usando una versión mutante del canal hTRPV1, en el cual la Serina 117 se cambió por una alanina (hTRPV1-S117A). De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento con 5 μ M de LPA 18:1 en condiciones libres de SFB y en presencia de 2 mM de Ca²⁺, disminuyó en un 50% los niveles de proteína TRPV1 (Fig. 14). Este resultado sugiere que el LPA además de activar al canal hTRPV1, puede activar alguna vía de señalización por medio de los receptores LPA₄₋₆, favoreciendo la acumulación de cAMP para la activación de PKA (Mirendil *et al.*, 2013), que finalmente fosforila al residuo S117 para evitar la disminución de la proteína

hTRPV1, efecto que se pierde cuando la serina es cambiada por un aminoácido no fosforilable como la alanina, en este contexto el canal queda susceptible a ser internalizado y degradado, resultando en una clara disminución de la proteína hTRPV1 (Fig. 14), efecto claramente dependiente de calcio, ya que al realizar el ensayo en ausencia de calcio, la versión mutante de la proteína (hTRPV1-S17A) no disminuye la proteína hTRPV1 (Fig. 15). Una observación adicional en el canal mutante hTRPV1-S117A, es que a concentraciones de 2.5 y 1 μM en presencia o ausencia de calcio, no se observó ningún cambio en los niveles de proteína hTRPV1-S117A (Fig. 14-15), lo que indica que la disminución del 20% de la proteína hTRPV1 silvestre por el tratamiento a 2.5 μM , así como el aumento del 15% de la proteína hTRPV1 a 1 μM de tratamiento con LPA, necesita del residuo Serina117 para ejercer sus efectos a esas concentraciones.

7.4 El canal iónico hTRPV1 y su probable relación con los receptores del LPA

El tratamiento con dos concentraciones bajas de LPA (2.5 y 1 μM) mostró un efecto opuesto (2.5 μM disminuye la proteína hTRPV1 y 1 μM la incrementa), esto podría deberse a que de acuerdo a las concentraciones de LPA se pueden activar diferentes receptores de LPA, los cuales desencadenan vías de señalización específicas. A este respecto, se ha reportado que la especie de LPA 18:1 presenta diferentes concentraciones efectivas medias (EC_{50}) para activar a sus receptores, teniendo una EC_{50} específica para el tipo de receptor: LPA₁ (130 nM), LPA₂ (3 nM), LPA₃ (81 nM), LPA₄ (245 nM), LPA₅ (15 nM) (Williams *et al.*, 2009). Sin embargo, las concentraciones de LPA en nuestros tratamientos se encuentran por arriba de estas EC_{50} , de tal manera que cualquiera de las vías por estos receptores se podría

estar activando. De forma interesante, se ha determinado que los receptores LPA₃ y LPA₅ presentan cierta selectividad de ligando por la especie de LPA 18:1. En nuestro caso, la débil desensibilización del canal hTRPV1 a la concentración de 5 μ M de LPA, debe estar mediada por la activación del receptor LPA₅ generando la activación de PKA y la fosforilación de S117, evitando que disminuya la proteína hTRPV1. En cuanto a la sensibilización del hTRPV1 (aumento en la proteína) observada a la menor concentración (1 μ M), es posible que se deba a una vía por medio del receptor LPA₁₋₄, ya que todos ellos señalizan por medio de PKC (Mirendil *et al.*, 2013), cinasa que también participa de la sensibilización del canal TRPV1 (Bavhe *et al.*, 2003); Además, nuestros datos sugieren que el aumento de la proteína TRPV1 debe ser por la activación de una PKC dependiente de Ca²⁺ ya que en ausencia del catión se pierde dicho efecto (Fig. 12).

7.5 Los fosfolípidos LPA 18:0 y LPA 6:0 incrementan los niveles de proteína total hTRPV1

Otro aspecto evaluado en este estudio fue el efecto de fosfolípidos inertes para la activación del canal TRPV1, como el LPA 18:0 y LPA 6:0, los cuales no activan al canal, pero tienen la capacidad de interaccionar débilmente con él (Morales-Lázaro, 2014). El tratamiento con el LPA 18:0 en condiciones libres de SFB y en presencia de calcio, demuestra que, a dos concentraciones diferentes, existe un aumento en la proteína hTRPV1 (Fig. 16); mientras que para la menor concentración usada (2.5 μ M), se observó una tendencia al aumento de la proteína (que resultó no estadísticamente significativa), a la mayor concentración (10 μ M) se observó un aumento de alrededor del 60% en la proteína hTRPV1. Con respecto al LPA 6:0 el tratamiento con 10 y 2.5 μ M mostró también un aumento (Fig. 17). Para el caso del

LPA 18:0 se sabe que la EC_{50} para interaccionar con sus receptores son mayores que el LPA 18:1, por ejemplo, LPA₁ (800 nM), LPA₂ (100 nM) y LPA₃ (50 μ M) (Bandoh et al., 2000). Este antecedente nos indica que al menos los efectos observados sobre el hTRPV1 por el tratamiento con el LPA 18:0 deben ser mediados por el LPA₁ o LPA₂, ya que la máxima concentración usada en nuestros ensayos fue de 10 μ M, la cual no es suficiente para la activación de señales vía el LPA₃ (EC_{50} = 50 μ M). La activación de los receptores LPA₁ y LPA₂ por el LPA 18:0 podrían ser suficientes debido a que ambos receptores activan río abajo a la PKC (Mirendil et al., 2013), que como se mencionó anteriormente es una de las vías de sensibilización del canal TRPV1.

De las especies de LPA de mayor producción endógena se encuentran aquellas que poseen cadenas alifáticas largas de 16 a 20 carbonos, ya sea saturadas o insaturadas (Bandoh et al., 2000). Sin embargo, las especies de cadena corta, como el LPA 6:0 es una de las minoritarias, que además posee limitada acción como ligando para los receptores al LPA, debido a que presenta una cadena alifática corta (de tan solo 6 carbonos) que le impide hacer una interacción estable con los receptores al LPA (Erickson et al., 1998). En nuestros experimentos, los tratamientos con esta especie de LPA con cadena corta aumenta la cantidad de proteína TRPV1, aunque el mecanismo por el cual podría estar favoreciendo este aumento no se le puede atribuir a un efecto mediado por receptores al LPA, puesto que presenta muy poca afinidad hacia ellos, así que resultaría interesante estudiar a detalle el mecanismo molecular por el cual esta especie de LPA regula positivamente los niveles de proteína TRPV1.

7.6 Efecto diferencial de las especies de LPA en la regulación de los niveles de proteína hTRPV1.

La regulación positiva en la expresión del canal TRPV1 por efecto del receptor LPA₁ ya ha sido reportada previamente en un modelo de cáncer de hueso, en el cual se observa un aumento en los niveles de expresión del canal TRPV1 y de las corrientes evocadas por capsaicina (Pan *et al.*, 2010). Esta regulación positiva se pierde cuando se usa un antagonista del receptor LPA₁ o al usar un inhibidor de la PKC ϵ (mediador río abajo de la señalización por LPA₁). Más aún el trabajo de Nieto y colaboradores muestran claramente la activación directa del canal TRPV1 por efecto del LPA 18:1. Ambos trabajos coinciden en que hay una regulación positiva del canal TRPV1 de origen de rata por efecto del LPA. Sin embargo, en este trabajo no se evaluó si el LPA 18:1 podría desensibilizar a nivel celular a el canal hTRPV1, lo cual promoviera la disminución de la proteína hTRPV1. A diferencia de lo observado en el tratamiento con capsaicina (una disminución del 50% de la proteína hTRPV1), esa misma concentración de LPA 18:1 solo promueve un 20% de disminución de la proteína, mientras que los lípidos 18:0 y 6:0 aumentan la cantidad de hTRPV1. Con estos resultados, por primera vez se proporciona una evidencia del efecto diferencial de tres especies de LPA (18:1, 18:0 y 6:0) sobre los niveles proteicos del canal hTRPV1. Estos efectos que podrían estar mediados por los receptores LPA₁, LPA₂ o LPA₅ de acuerdo a la afinidad de las especies de LPA 18:1 y 18:0 por estos receptores (Bandoh *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2009).

7.7 El tratamiento con anandamida disminuye los niveles proteínicos del canal hTRPV1.

Aunado a todos los resultados obtenidos con las diferentes especies de LPA, se estudió también la desensibilización celular del canal hTRPV1 por efecto de otro agonista de origen endógeno y lipídico, la anandamida (Smart *et al.*, 2000). Este agonista generó una gran desensibilización celular del canal hTRPV1, ya que en condiciones libres de SFB y en presencia de Ca^{2+} ocasionó más del 50% de disminución en los niveles de proteína de hTRPV1, muy similar a lo observado con la capsaicina y muy por encima del efecto que ocasiona el LPA 18:1. Este efecto podría ser mediado por la interacción directa de la anandamida con el canal hTRPV1 favoreciendo un mecanismo desensibilizador muy parecido al de capsaicina (aún no determinado), pero además este efecto puede ser mediado a través del receptor endocanabinoide específico para la anandamida el CB1. Este último al ser activado por anandamida, desencadena la vía de señalización por la proteína Gai-o que inhibe a la adenilato ciclasa y, por lo tanto, a la vía de activación por PKA (Felder y Glass, 1998). Este efecto podría repercutir directamente disminuyendo la estabilidad del canal TRPV1 y favoreciendo la desensibilización del canal. De acuerdo con lo anterior, la desensibilización del canal hTRPV1 por efecto de anandamida podría llevarse a cabo a través de dos vías, por su unión directa al canal o por la interacción con el receptor endocanabinoide CB1.

8. Conclusiones

- El tratamiento con capsaicina disminuye los niveles de proteína total hTRPV1, efecto que se potencia ante la presencia de SFB, probablemente por el contenido de alguna molécula bioactiva que favorece el efecto de la capsaicina.
- El canal hTRPV1 es activado por el LPA 18:1.
- El tratamiento con LPA 18:1 disminuye parcialmente los niveles proteínicos totales de hTRPV1 de manera dependiente de Ca^{2+} .
- El canal hTRPV1-S117A es más susceptible a la desensibilización celular por efecto del LPA 18:1.
- Los fosfolípidos inertes para la activación del canal TRPV1, LPA 18:0 y LPA 6:0 aumentan los niveles proteínicos del canal hTRPV1.
- La anandamida disminuye los niveles proteicos del canal hTRPV1. Esta desensibilización celular es muy parecida a la producida con el tratamiento con capsaicina y con mayor eficiencia al efecto originado por el LPA 18:1.

9. Perspectivas

Debido al carácter endógeno de los compuestos evaluados, los resultados del presente estudio generan diversas preguntas a responder, para entender los mecanismos moleculares responsables para los diferentes efectos observados con cada uno de los lípidos evaluados.

En concordancia con los datos de un aumento en la expresión del canal hTRPV1 en un modelo de cáncer de hueso, este trabajo muestra que el tratamiento con LPA 18:0 y 6:0 aumenta la proteína hTRPV1, por lo que es importante determinar cuál es el receptor a LPA responsable de este aumento, esto por medio del uso de antagonistas de los receptores LPA₁₋₄ como el α -bromometileno fosfonatos (BrP-LPA) o antagonistas específicos como el DGPP 8:0 y ácido tiofosfatídico 8:0 para

los receptores de LPA1 y LPA3 (Chun *et al.*, 2014). Más aún, resulta interesante determinar cómo es que el LPA 6:0 favorece un aumento en los niveles de la proteína hTRPV1, puesto que este fosfolípido no es un buen ligando para los receptores al LPA, tal vez lo haga de una manera independiente de los receptores mencionados, lo que resultaría en un mecanismo novedoso por el cual se regula positivamente los niveles de la proteína hTRPV1.

Considerando que el LPA 18:1 es un ligando de gran afinidad por el receptor LPA₅, sería interesante evaluar si la proteína hTRPV1 cambia sus niveles por el efecto específico de la activación de este receptor, esto mediante el uso del farnesil pirofosfato (FPP), que es un agonista por excelencia del receptor LPA₅, con el fin de poder evaluar esta vía.

Por otro lado, la desensibilización celular del canal hTRPV1 por la anandamida, la cual es mayor que la inducida por el LPA 18:1 e incluso muy similar al generado por la capsaicina, genera la posibilidad de evaluar si este efecto es mediado por la interacción directa de la anandamida con el canal o por efecto indirecto, es decir por una interacción de la anandamida con el receptor CB1. Esto podría ser abordado mediante el uso de un agonista del receptor CB1 que no active al canal hTRPV1, por lo tanto, si el efecto es mediado por el receptor CB1 se debería observar una disminución de la proteína hTRPV1, independiente de la activación del canal y esto constituiría una forma novedosa de generar analgesia sin activar al canal TRPV1, ya que no existiría la molestia inicial de irritación por la activación del canal, pero sí se favorecería la disminución de sus niveles proteínicos. De encontrar un resultado positivo con este tipo de agonistas del CB1, sería importante realizar este tipo de

experimentos en el sistema de expresión endógeno del canal TRPV1, las neuronas DRG y realizar ensayos de conducta de dolor para ver una posible atenuación de la respuesta de dolor por la activación del canal TRPV1.

10. Bibliografía

1. Bandoh K, Aoki J, Taira A, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. 2000. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett.*;478(1-2):159-65.
2. Baron R., Binder A. and Wasner G. 2010. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms and treatment. *Lancet Neurol*, 9, 807- 819.
3. Baker Daniel L., Umstot Ed. S., Desiderio D. M. and Tigyi Gabor J. 2000. Quantitative Analysis of Lysophosphatidic Acid in Human Blood Fractions. *Annals of the New York Academy Sciencies*. 805(1), 267-269.
4. Bhawe G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS and Gereau RW 4th. 2003. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1).,100(21):12480-5.
5. Brasier D. J., Bhawe G., Zhu W., Wang H., Oxford G. S. and Gereau R. W. 2002. cAMP- dependent Protein Kinase Regulates (VR1) by Direct Phosphorylation. *Neuron*, 35(4), 721-731
6. Chun J., Choi J. W., Herr D.R., Noguchi K., Yung Y. C., Lee C. W., Mutoh T., Lin M. E., Teo S. T., Park J. E., Moslet A. N. 2010. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 157-186.
7. Chun J., Stoddard N. C. and Yung Y. C. 2014. LPA Receptor Signaling: Pharmacology, Physiology and Pathophysiology. *Journal of Lipid Research*, 55(7), 1192-1214.
8. Chun J., Yung Y.C., Stoddard N. C and Mirendil H. 2015. Lysophosphatidic Acid Signaling in the Nervous System. *Neuron*, 85 (4), 669-682.
9. Clapham David E. Ramsey S., Delling Marcus. 2006. An introduction to TRP Channels. *Annu. Rev. Physiology*, 68, 619-647.
10. Darrè Leonardo, Furini Simone and Domene Carmen. 2014. Permeation and Dynamics of an Open-Activated TRPV1 Channel. *Journal of Molecular Biology*, 427 (2), 537-549.
11. Dermot J. Kelly, Mahmood Ahmad and Brull Sorin J. 2001. Preemptive Analgesia I: Physiological Pathways and Pharmacological Modalities. *Can J. Anesth*, 48:10, 1000-1010.
12. Erickson JR, Wu JJ, Goddard JG, Tigyi G, Kawanishi K, Tomei LD, Kiefer MC. 1998. Edg-2/Vzg-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem.*;273(3):1506-10.
13. Felder CC, Glass M. 1998. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 38:179-200.
14. Gainetdinov Raul R, Lefkowitz RJ, Caron MG, Bohn LM and Premont RT. 2004. Desensitization of G Protein-Coupled Receptors and Neuronal Functions. *Annu Rev Neurosci*, 25, 107-144.

15. Gava N. R., Klionsky L., Shi L., Tamir R., Edenson S., Zhang T. J., et al. 2004. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 20283-20295.
16. Gibson S. B., Fang X., Johnston J. B., Chen J., Hu X., Graham B. A. and Ishdorj G. 2008. Lysophosphatidic Acid Protects Cancer Cells from Histone Deacetylase (HDAC) inhibitor-induced Apoptosis through Activation of HDAC. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16818-16829.
17. Heung-Ching Cheng, Robert Z. Qi, Hemant Paudel, and Hong-Jian Zhu. 2011. Regulation and Function of Protein Kinases and Phosphatases. *Enzyme Research*, 2011, 3 pages.
18. Hille B. 2001. Ion channels of excitable membranes. Sunderland Massachusetts, USA. *Ed Sinauer Associates, Inc.* 3rd ed.
19. International Association for the Study of Pain. 2016. *IASP Taxonomy*. consultado en: <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Nociception>
20. Jo A. O., Redmond S., Ryskamp D. A. and Krizaj D. 2014. TRPV1 and endocannabinoids: Emerging Molecular Signals that modulate mammalian vision. *Cells*, 3, 914-938.
21. Julius David. 2013. TRP channels and Pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 355-384.
22. Julius David and Jordt SE. 2002. Molecular basis for species-specific sensitivity to hot chilli peppers. *Cell*, 108, 421-430.
23. Liao M., Cheng Y., Julius D., and Cao E. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504, 107-124.
24. Liu L, Simon SA. 1996. Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol*, 75, 1503-1514.
25. Liu J., Du J., Yang Y. and Wang Y. 2015. Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia. *Experimental Neurology*, 273, 253-262.
26. Lukacs V, Thyagarajan B., Vamai P., Balla A., Balla T. and Rohacs T. 2007. Regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci*, 27, 7070-7080.
27. Mirendil H, Lin M and Chun J. 2013. Lysophosphatidic Acid (LPA) receptor signaling. Chapter 1: Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry, ed. John Wiley & Sons.
28. Mohapatra DP, Nau C. 2005. Regulation of Ca²⁺ dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 280, 13424-13432.
29. Morales Lázaro Sara L., Rosenbaum T. and Simon Sidney A., 2013. The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *The Journal of Physiology*, 591(13), 3109-3121.
30. Morales-Lázaro Sara L., Serrano Flores B., Llorente Itzel, Hernández García E., González Ramírez R., Rosenbaum Tamara, Escalante Alcalde Diana, Souvik B. and Miller D et al. 2014. Structural Determinants of the Transient Potential Receptor 1 (TRPV1) Channel Activation by Phospholipid Analogs. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24079-24090.

31. Mrozkova P., Spicarova D. and Palecek J. 2016. Hypersensitivity Induce by Activation of Spinal Cord PAR2 Receptors is Partially Mediated by TRPV1 Receptors. *Plos One*, 11(10), 1-18.
32. Nieto-Posadas A., Picazo-Juárez G., Llorente Itzel., Jara-Oseguera A., Morales-Lázaro S., Escalante-Alcalde D., D Islas León and Rosenbaum Tamara. 2012. Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature Chemical Biology*, 8, 78-85.
33. O'Neil RG and Heller S. 2005. The mechanosensitive nature of TRPV1 channel. *Pflugers Arch – European Journal of Physiology*, 451, 193-203.
34. Pan H. L., Zhang Y. Q. and Zhao Z. Q. 2010. Involvement of lysophosphatidic acid in bone cancer pain by potentiation of TRPV1 via PKC pathway in dorsal root ganglion neurons. *Molecular Pain*, 6, 85-96.
35. Picazo-Juárez Giovanni, Romero Suárez S., Nieto Posadas A., Llorente Itzel, Jara Oseguera A., Briggs M., McIntosh J. M., Simon S. A., Ladrón de Guevara E., Islas D. León and Rosenbaum T. 2011. Identification of a Binding Motif in the S5 Helix that confers Cholesterol Sensitivity to the TRPV1 Ion Channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(28), 24966-24076.
36. Plested Andrew J. R. 2016 Structural mechanisms of activation and desensitization in neurotransmitter-gated ion channels. *Nature structural and molecular biology*, 23(6), 494-502.
37. Ramkumar V., Brito R., Sheth S., Mukherjea D. and Rybak L. P. 2014. TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells*, 3, 517-545.
38. Rosenbaum T., Gordon-Shaag A., Munari M. and Gordon SE. 2004. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol*, 123, 53-62.
39. Sanz-Salvador Lucia, Ferrer-Montiel Antonio, Andrés-Borderia Amparo y Planell-Cases Rosa. 2012. Agonist and Ca²⁺ dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287 (23): 19462-19471.
40. Sanz-Salvador Lucia, Martínez García Fernando y Planells Cases Rosa María. 2014. Desensibilización inducida por agonista del receptor TRPV1 (tesis doctoral). Centro de Investigaciones, Príncipe Felipe. Universidad de Valencia, España.
41. Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. 2000. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol.*;129(2):227-30.
42. Smith H. and Brooks J. R. 2014. Capsaicin-based therapies for pain control. *Progress in Drug Research*, 68, 129-146.
43. Thermo Scientific. (s.f). *Introducing Thermo Scientific HyClone Lipid Reduced FBS*. <https://thermofisher.portica.de/system/includes/download.php>
44. Ueda H., Inoue M., Chun J., Rashid M. H., Fujita R. and Contos J.J. 2004. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signalling. *Nature Medicine*, 10(7), 712-718.
45. Ueda H., Chun J. and Nagai Ma. L. 2013. An LPA species (18:1 LPA) plays key roles in the self-amplification of spinal LPA production in the peripheral neuropathic pain model. *Molecular Pain*, 9, 29

46. Vay Laura, Gu Chungjing and McNaghton Peter A. 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology*, 165, 787-801.
47. Yang F., Xiao X., Cheng W., Yang W., Yu P., Sing X., Zheng J. 2015. Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of TRPV1 ion channel. *Nature Chemical Biology*, 11(7), 518-524.
48. Wang S., Joseph J., Ro J. Y., and Chung M. K. 2015. Modality-specific mechanisms of PKC induced hypersensitivity of TRPV1: S800 is a polymodal sensitization site. *Pain*, 156(5), 931-941.
49. Williams JR, Khandoga AL, Goyal P, Fells JI, Perygin DH, Siess W, Parrill AL, Tigyi G and Fujiwara Y. 2009. Unique ligand selectivity of the GPR92/LPA5 lysophosphatidate receptor indicates role in human platelet activation. *J Biol Chem*. 284(25):17304-19.