



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de la inactivación por
temperatura del canal iónico TRPV1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

ANA SÁNCHEZ MORENO

TUTOR:

DR. LEÓN DAVID ISLAS SUÁREZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

| | |
|------------------|---|
| Apellido paterno | Sánchez |
| Apellido materno | Moreno |
| Nombre (s) | Ana |
| Teléfono | 5519164661 |
| Universidad | Universidad Nacional Autónoma de México |
| Facultad | Facultad de Ciencias |
| Carrera | Biología |
| Número de cuenta | 413015680 |

2. Datos del tutor

| | |
|------------------|------------|
| Grado | Dr. |
| Nombre (s) | León David |
| Apellido paterno | Islas |
| Apellido materno | Suárez |

3. Datos del sinodal 1

| | |
|------------------|--------------|
| Grado | Dr. |
| Nombre (s) | Luis Alfonso |
| Apellido paterno | Vaca |
| Apellido materno | Domínguez |

4. Datos del sinodal 2

| | |
|------------------|-------------|
| Grado | Dra. |
| Nombre (s) | Tamara Luti |
| Apellido paterno | Rosenbaum |
| Apellido materno | Emir |

5. Datos del sinodal 3

| | |
|------------------|----------------|
| Grado | Dr. |
| Nombre (s) | Froylán Miguel |
| Apellido paterno | Gómez |
| Apellido materno | Lagunas |

6. Datos del sinodal 4

| | |
|------------------|---------------------|
| Grado | Dra. |
| Nombre (s) | Gertrudis Hortensia |
| Apellido paterno | González |
| Apellido materno | Gómez |

7. Datos del trabajo escrito

| | |
|-------------------|---|
| Título | Caracterización de la inactivación por temperatura del canal iónico TRPV1 |
| Número de páginas | 75 |
| Año | 2018 |

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. León David Islas Suárez, por dirigir el curso de esta tesis, por sus enseñanzas y su gran apoyo. Sus sabios consejos me permitieron entrenarme en este tortuoso mundo del trabajo científico. Gracias por ser muy paciente, muy atento y confiar en mi trabajo. Gracias por haberme enseñado tanto.

Agradezco a mis sinodales Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez, Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir, Dr. Froylán Miguel Gómez Lagunas y Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez por sus valiosas correcciones en mi trabajo escrito, gracias por su orientación.

A la Dra. Gisela Edith Rangel Yescas, técnico del laboratorio, por su valiosa aportación en el área de biología molecular y celular. Gracias por su paciencia y dedicación, por ser más que una tutora y ser increíblemente generosa.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio en la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina por su valioso apoyo, sus sugerencias y por hacer del trabajo experimental un tiempo ameno.

Quisiera agradecer a mis padres, Ismael Sánchez Martínez y Anita Moreno Ruíz por ser mi ancla, por ser un motivo de superación y aliento, han sido el mejor ejemplo que la vida me dió. A mis hermanos, Dulce Berlen, Adela, Agustina, Valeria, Maricruz, Jennifer e Ismael por estar siempre conmigo, gracias por ser mis amigos, mis confidentes. Gracias inmensamente, los amo.

Agradezco a Fénix, mis compañeros del alma, por superar conmigo tanta adversidad, juntos emergimos de las cenizas. Gracias.

A todos mis amigos, por su valiosa escucha y compañía. Gracias totales.

Gracias a todos los que hicieron posible la realización de esto, mi sueño, de cuando apenas era una enana.

Esta tesis fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el proyecto IN209515 y con una beca para su autora.

“El Universo no fue hecho a medida del hombre, tampoco le es hostil, le es indiferente”.

Carl Sagan

Índice

| | |
|---|-----------|
| Resumen..... | 7 |
| Introducción..... | 8 |
| I. Canales iónicos..... | 9 |
| II. Canales TRP..... | 11 |
| III. TermoTRPs..... | 13 |
| IV. Termosensación..... | 14 |
| V. TRPV1: modelo de estudio..... | 18 |
| VI. Activación de TRPV1 por temperatura..... | 22 |
| VII. Estimulación de TRPV1 con pulsos de temperatura consecutivos..... | 29 |
| Objetivos..... | 37 |
| Hipótesis..... | 38 |
| Métodos..... | 39 |
| I. Cultivo celular..... | 39 |
| II. Transfección..... | 39 |
| III. Soluciones..... | 40 |
| IV. Fijación de voltaje en microáreas de membrana (<i>patch clamp</i>)..... | 40 |
| V. Microcalentador..... | 41 |
| VI. Calibración de temperatura..... | 42 |
| VII. Activación por temperatura..... | 43 |
| VIII. Perfusión de solución fría..... | 44 |
| IX. Activación con capsaicina..... | 45 |
| X. Análisis de datos..... | 45 |
| Resultados..... | 46 |
| I. Identificación de la inactivación por temperatura de TRPV1..... | 46 |
| II. Caracterización de la inactivación por rampas simétricas..... | 46 |
| III. Dependencia de la inactivación en el tiempo entre los estímulos..... | 51 |
| IV. Dependencia de la inactivación en el pulso de temperatura..... | 53 |
| V. Irreversibilidad de la inactivación por enfriamiento del baño de registro..... | 54 |
| VI. Irreversibilidad de la inactivación al estimular con capsaicina..... | 60 |
| VII. Estabilización del dominio de anquirinas..... | 63 |
| Discusión..... | 67 |
| Conclusiones..... | 71 |

Resumen

TRPV1 es un canal iónico polimodal, se activa por varios estímulos de naturaleza física y química, si bien es más conocido como el receptor de capsaicina. De manera particular, resulta de interés para este estudio su activación por calor, debido a ello TRPV1 pertenece a los canales TRPs activados por temperatura o termoTRPs, cuyo mecanismo de activación aún no ha sido dilucidado. En esta tesis se ha caracterizado la inactivación de TRPV1 por temperatura; a través de su expresión heteróloga en células HEK 293, se ha registrado mediante *patch clamp*, al ser estimulado con un microcalentador generado previamente en el laboratorio. Es un fenómeno que se había detectado anteriormente, pero nunca se retomó de manera particular y nunca como un fenómeno molecular propio del canal. La inactivación depende del uso o repetición del estímulo, es muy sensible a la temperatura de estimulación, modifica la entalpía y entropía de activación del canal, y se ha considerado irreversible, puesto que al enfriar el medio que rodea al canal o al estimular con capsaicina, el canal no regresa del estado inactivado al estado abierto. Este fenómeno es importante en tanto que si se logrará recuperar la corriente, podría dar idea del mecanismo mediante el cual TRPV1 detecta la temperatura, y desde luego porque es un mecanismo de inhibición que se relaciona con las cadenas de señalización celular en las que TRPV1 participa.

Introducción

La capacidad de los seres vivos de reaccionar a los estímulos ambientales, así como a los estímulos internos nos ha permitido sobrevivir (Randall, Burggren y French, 2001). Nuestros sentidos son el medio que nos conecta con el mundo, la capacidad de percibir el ambiente es de suma importancia para permanecer en el mismo, no obstante dicha permanencia no sería posible con sólo detectar los estímulos ambientales, es necesario responder a ellos.

El sistema nervioso nos permite detectar, procesar, y responder a los estímulos ambientales, es el sistema que inicia las reacciones de los seres vivos (Randall et al., 2001). En el sistema nervioso periférico las neuronas sensoriales o aferentes llevan información del exterior hacia el sistema nervioso central, mientras las neuronas motoras o eferentes llevan información del sistema nervioso central hacia los órganos efectores (músculos, glándulas) (Aidley, 1989).

Las neuronas son células especializadas en la comunicación celular (Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall, LaMantia & White, 2012) cuyas terminaciones axónicas y dendritas forman complejas redes nerviosas; se comunican mediante señales eléctricas y químicas que se propagan a través de dichos circuitos, por lo que son llamadas células eléctricamente excitables, puesto que pueden ser estimuladas y responder a dicho estímulo (Merriam-Webster, 2016), con una respuesta estereotípica.

La excitabilidad eléctrica de las neuronas se debe a la presencia de un gradiente electroquímico a través de su membrana, es decir, hay una diferencia en la concentración de iones hacia el interior celular con respecto al espacio extracelular; y si se mide el potencial eléctrico de la membrana celular con un microelectrodo, es negativo con respecto al exterior celular (Aidley, 1989), pues la membrana tiene permeabilidad selectiva a cierto tipo de iones.

La membrana de las células es una bicapa lipídica que aísla el contenido celular, lo protege del medio ambiente (Hille, 1992). No obstante, la célula necesita transportar nutrientes hacia el interior y sacar desechos hacia el exterior; y en el contexto de la excitabilidad celular, requiere el movimiento de iones, pues el sistema nervioso se comunica a través de la señalización eléctrica (Aidley, 1989).

Existen transportadores en la membrana que permiten el paso de moléculas al interior y exterior celular en contra de su gradiente de concentración, por lo que requieren un gasto energético en forma de ATP. De hecho, este tipo de transportadores denominados activos, mantienen las diferentes concentraciones de iones a ambos lados de la membrana. Sin embargo, los canales iónicos son las principales proteínas que se encargan del movimiento de iones, siguen el gradiente de concentración, pues emplean la energía del gradiente

electroquímico (Randall et al., 2001); y son quienes le brindan a la membrana la permeabilidad selectiva a cierto tipo de iones (Fig. 1).

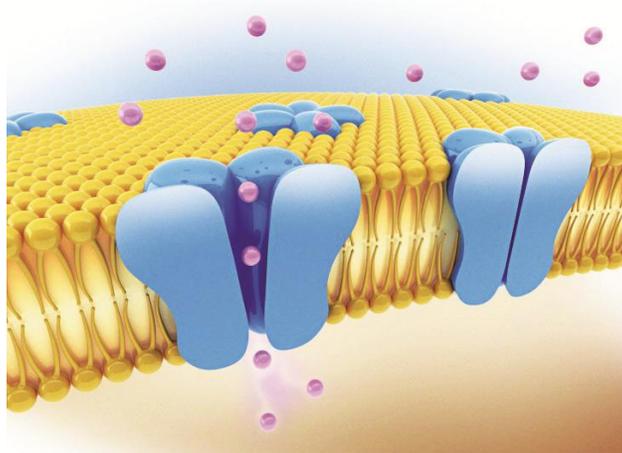


Fig. 1. Caricatura de un canal iónico (azul) embebido en la membrana celular (amarillo) permitiendo el flujo de iones (violeta). Tomado de <https://www.itaca.edu.es/canales-ionicos.htm>.

I. Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas que forman poros en la membrana y dejan pasar iones, se encuentran en todas las células de nuestro cuerpo, siendo fundamentales en la excitabilidad celular (Hille, 1992).

Son moléculas que responden a un estímulo específico (Hille, 1992), sea éste de origen físico o químico: voltaje, ligandos (moléculas), estímulos mecánicos, temperatura, luz; la respuesta del canal puede ser la apertura o cierre del poro, fenómeno denominado en inglés *gating* (compuerta, en español).

Una vez abierto, un canal iónico presenta permeabilidad selectiva, esto es, deja pasar sólo cierto (s) tipo (s) de iones, como son Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , entre algunos otros. El flujo de iones es un flujo de corriente eléctrica involucrada en la señalización eléctrica y la excitabilidad celular del sistema nervioso, pues cuando el canal se abre o se cierra da forma a la señal y respuesta en las células excitables (Hille, 1992).

En ese sentido, Julius Bernstein (1902-1912) (citado en Hille, 1992) propuso que la célula excitable está rodeada por una membrana, que en estado de reposo es mayoritariamente permeable a K^+ , su gradiente de concentración (hay más potasio en el espacio intracelular que en el espacio extracelular) supera al gradiente eléctrico (la fuerza que atrae los cationes de potasio al interior celular negativo), y éste fluye hacia el exterior, de tal forma que se genera una diferencia de potencial negativa en el interior de la célula.

Entonces, cuando una célula excitable se encuentra en estado de reposo, los canales de fuga (*leak channels*) permanecen abiertos y permiten la fuga de potasio al exterior celular, y

entonces el potencial de membrana es cercano al potencial de equilibrio del K^+ (de aproximadamente -70 mV, porque hay permeabilidad a otros iones en menor medida), el potencial en que el potasio no presenta movimiento neto a través de la membrana (Randall, et al, 2001).

Cuando se detecta un estímulo ocurre una despolarización, es decir, el potencial de membrana se vuelve positivo debido a la apertura de canales de Na^+ dependientes de voltaje. Dado que el sodio se halla en mayor concentración en el exterior de la célula, éste se mueve hacia el interior celular, y genera así un potencial de membrana positivo. Dicha despolarización es transitoria, debido a la inactivación presente en los canales de sodio, y la subsecuente prevalencia de los canales de potasio activados por voltaje, por lo que se genera una repolarización, el potencial de membrana vuelve a ser negativo. Incluso se da una hiperpolarización, esto es, el potencial de membrana se vuelve aún más negativo que el potencial de reposo. Así, al proceso potencial de reposo, despolarización, repolarización e hiperpolarización se le llama potencial de acción (Fig. 2).

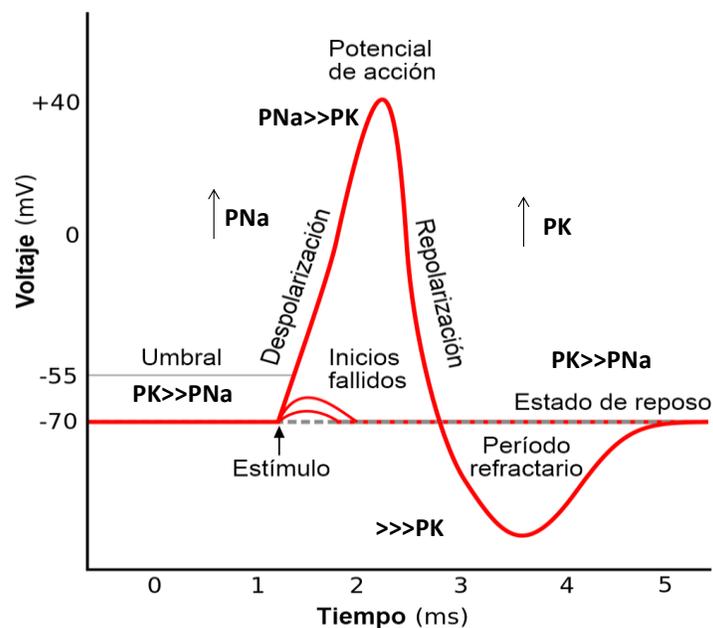


Fig. 2. Esquema de un potencial de acción (P=Permeabilidad). Modificado de <https://curiosoando.com/cual-es-la-diferencia-entre-potencial-de-accion-y-potencial-graduado> y Purves et al., 2012.

El potencial de acción es el lenguaje con que se comunican las neuronas, al detectar un estímulo las células excitables disparan potenciales de acción que se propagan por las redes neuronales y se emite una respuesta. Los canales iónicos son moléculas que permiten la generación de los potenciales de acción. Y los potenciales de acción son la base de cada sensación, de cada pensamiento, de cada impulso para actuar en el ambiente (Randall, et al., 2001)

A nivel molecular un canal iónico es una proteína constituida por una secuencia definida de aminoácidos, su funcionamiento obedece a que sus diferentes dominios estructurales interactúan entre sí y con la membrana, y originan diversos mecanismos para detectar los estímulos a los que son sensibles, mecanismos de inactivación y por supuesto de cierre, además de que les permiten interactuar con otras moléculas del interior o exterior celular.

A saber, los estados por los que pasa un canal iónico van desde el estado cerrado, el estado abierto y nuevamente el estado cerrado, con posibilidad de inactivación. Normalmente, en ausencia del estímulo al que es sensible, el canal está cerrado, una vez que se detecta un estímulo, la probabilidad de apertura del poro aumenta, el canal pasa al estado abierto mediante un cambio conformacional de la proteína, conduce iones, y luego pasa nuevamente al estado cerrado cuando se remueve el estímulo.

Se dice que un canal iónico está activado cuando es capaz de abrirse y conducir iones en presencia del estímulo al que es sensible; no obstante, cuando dicho estímulo está presente pero aún así el canal no se abre y conduce iones, se dice que se halla inactivado. Un canal sólo podrá volver a abrirse cuando la inactivación sea removida (Hille, 1992).

Ahora bien, con base en las similitudes estructurales en su secuencia de aminoácidos, se han generado clasificaciones que agrupan los canales iónicos en diferentes familias. Existe una gran diversidad de ellos como son, canales activados por ligandos intracelulares (nucleótidos cíclicos como el ATP) o extracelulares (neurotransmisores), canales activados por voltaje (permeables a sodio, potasio o calcio), canales activados por temperatura (termoTRPs), canales sensibles a estímulos mecánicos, entre otros. El canal iónico de interés en esta tesis pertenece a la superfamilia de canales TRP.

II. Canales TRP

La superfamilia de canales iónicos TRP se dio a conocer a partir de una disfunción en la cascada de fototransducción en los fotorreceptores de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), dicha anomalía se encontraba en un canal iónico que originaba un potencial de receptor transitorio, por lo que se le denominó TRP (*Transient Receptor Potential* por sus siglas en inglés) (O Poletini, Moraes, Ramos, Jeronimo, y de Lauro, 2015).

Se trata de canales catiónicos no selectivos, principalmente permeables a Ca^{2+} (O Poletini et al., 2015). Se expresan desde levaduras, esponjas hasta el ser humano, siendo fundamentales en la percepción sensorial, pues participan en la transducción de señales de la visión, el olfato, la audición, mecanosensación y termosensación. Además de poseer un papel importante en procesos de inflamación, dolor, osmolaridad, entre otros (Kadowaki, 2015).

No obstante, quizá la característica más interesante de los canales TRP es que son polimodales, esto es, son sensibles a varios estímulos fisicoquímicos (luz, temperatura,

presión, pH, una gran diversidad de ligandos, lípidos, voltaje), permitiéndole a la célula integrar dichos estímulos en una respuesta concertada, resultando ventajoso para la selección natural al generar canales iónicos de este tipo (Palovcak, Delemotte, Klein, y Carnevale, 2015).

Estructuralmente todos los canales TRP son tetrámeros, están formados por 4 subunidades, cada una de las cuales posee seis dominios transmembranales, siendo los dominios S5 y S6 los que forman el poro permeable a cationes; la longitud y la secuencia de los dominios N terminal y C terminal varía entre las 8 subfamilias conocidas (Wang y Siemens, 2015) pero ambos son intracelulares (Fig. 3).

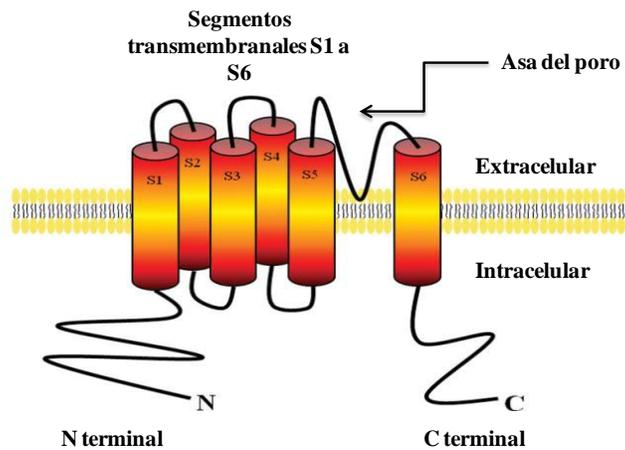


Fig. 3. Esquema de una subunidad típica de los canales TRP. Modificado de O Poletini et al., 2015.

Existen 8 familias conocidas de canales TRP:

1. *TRPC* (Canónica). Posee 7 miembros (TRPC1 a TRPC7) y participa en la transducción de señales de neuronas y otros tipos celulares (Wang y Siemens, 2015; Kadowaki, 2015).
2. *TRPV* (Vaniloide). Posee 6 miembros (TRPV1 a TRPV6). Está involucrada en la sensibilidad a temperatura, así como en la activación por ligandos (capsaicina, alicina), además de participar en procesos de inflamación y dolor (Wang y Siemens, 2015; Kadowaki, 2015).
3. *TRPM* (Tipo Melastatina). Posee 8 miembros (TRPM1 a 8), se activa por ligando (mentol), por temperatura (fría o cálida) y participa en transducción de señales (Wang y Siemens, 2015; Kadowaki, 2015).
4. *TRPP* (Policistina). Posee 3 miembros (TRPP2, TRPP3 y TRPP5) y está involucrada en procesos de desarrollo (Wang y Siemens, 2015; Kadowaki, 2015).
5. *TRPML* (Mucolipina). Posee 3 miembros (TRPML1 a TRPML3), está involucrada en procesos de endocitosis y autofagia (Wang y Siemens, 2015; Kadowaki, 2015).
6. *TRPA* (Rica en anquirinas). Sólo posee un miembro: TRPA1 el cual se activa por temperatura y ligandos (Kadowaki, 2015).

7. *TRPN*. Se encuentra en *D. melanogaster*, participa en audición y mecanosensación (Kadowaki, 2015).
8. *TRPY*. Sólo se ha encontrado en levaduras, de ahí su nombre (*yeast* en inglés) (O Poletini et al., 2015).

Es importante mencionar que las distintas familias de canales TRP poseen dominios característicos ya sea en la región N terminal o C terminal, como son: dominio de anquirinas, dominio TRP, dominio enzimático (tipo cinasa), dominio *coiled-coil* (por su nombre en inglés) (Fig. 4).

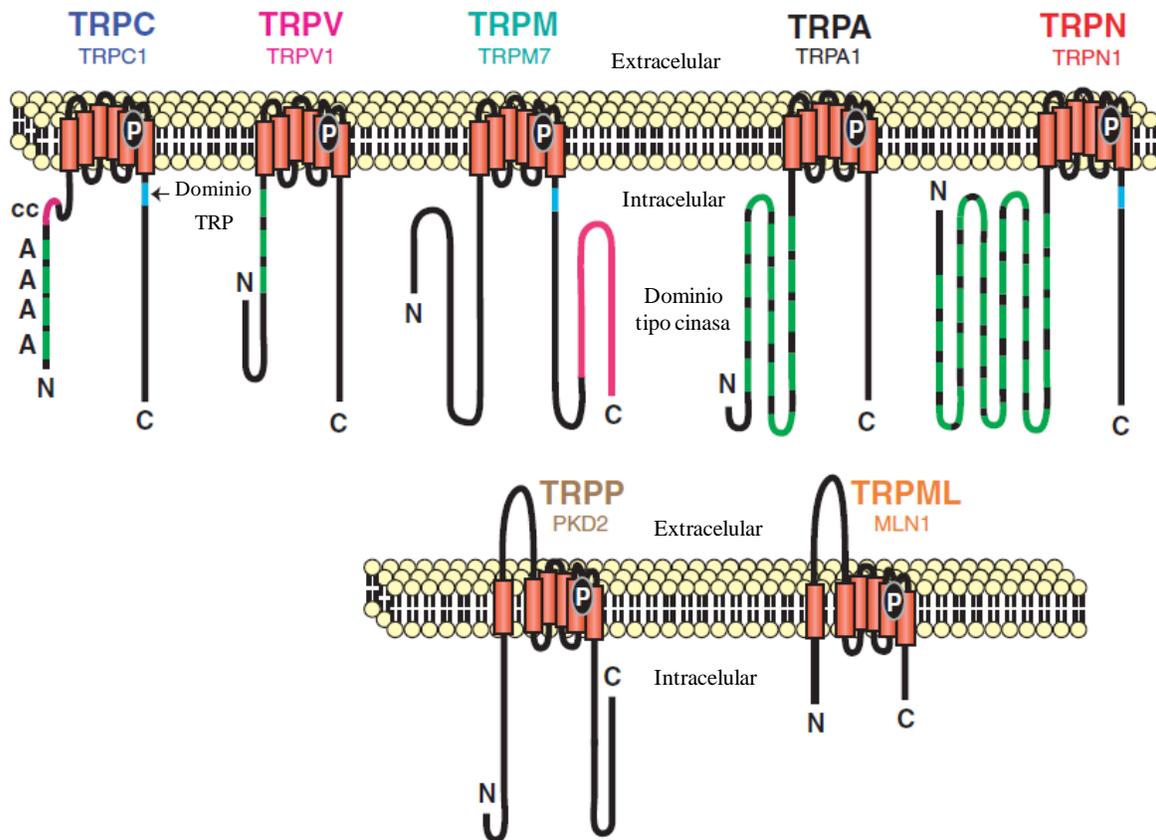


Fig. 4. Canales TRP (falta TRPY) con sus respectivos dominios en el C o N terminal. A: dominios de anquirina, cc: dominio *coiled-coil*. Tomado de Montell, 2005.

A su vez, el canal de interés en esta tesis pertenece a un subgrupo de canales denominado termoTRPs.

III. TermoTRPs

Dentro de los canales TRP hay un grupo de canales denominados termoTRPs pues se activan por temperatura, dichos canales se expresan en neuronas cuyas proyecciones se hallan en la piel, por lo que actúan como detectores moleculares (Baez, Raddatz, Ferreira, Gonzalez, y Latorre, 2014).

Constan de 11 miembros distribuidos en 4 subfamilias: TRPV, TRPM, TRPA y TRPC; TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPV1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4 se activan con temperaturas cálidas, y TRPA1, TRPC5 y TRPM8 se activan con temperaturas frías (Fig. 5). Además, debido a su carácter polimodal se activan por compuestos derivados de plantas, lípidos, pH, voltaje, entre otros estímulos (Baez et al., 2014).

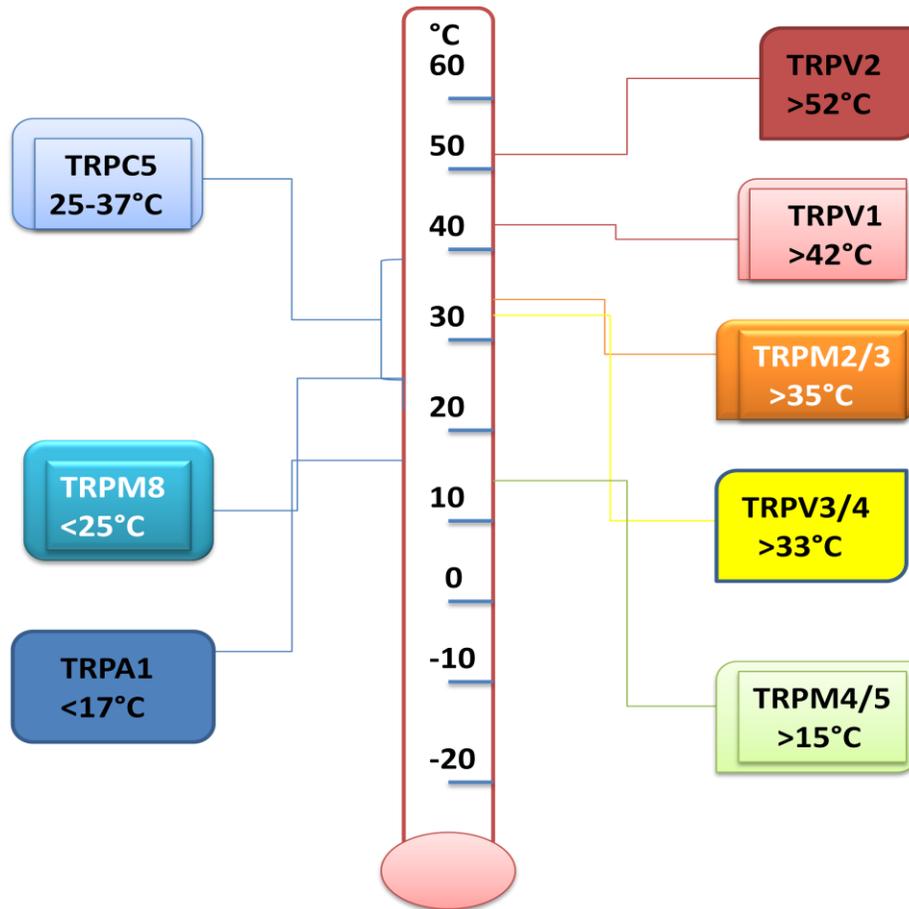


Fig. 5. Rango de temperatura de activación de los canales TermotRPs en *Mus musculus*.

IV. Termosensación

La temperatura es una medida de la velocidad a la que se mueven los átomos y moléculas, por ende todos los objetos en la naturaleza están sujetos a fluctuaciones térmicas (Baez et al., 2014).

Es un parámetro físico muy importante en la adaptación y sobrevivencia de todos los organismos (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014), por lo que éstos han desarrollado mecanismos para sentir los cambios en la temperatura y responder a los mismos (Zhang, 2015).

La mayoría de los organismos que no regulan su temperatura corporal están restringidos a un rango estrecho de temperatura, en el caso de los animales de sangre caliente (homeotermos), son capaces de mantener su temperatura corporal en un rango más amplio de temperaturas externas, aún así, su temperatura corporal permanece en aproximadamente 37°C, pues las proteínas pueden dañarse (Davidovits, 2008).

La termosensación forma parte del sentido del tacto, uno de los sentidos más complejos. En mamíferos, la temperatura, el dolor, las fuerzas mecánicas y algunos estímulos químicos son detectados por neuronas sensoriales (aférentes primarias) pertenecientes a los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y el ganglio trigeminal (Patapoutian, Peier, Story, y Viswanath, 2003). El ganglio de la raíz dorsal forma parte del sistema nervioso periférico, es un grupo de cuerpos neuronales localizados en la zona lateral de la médula espinal en la columna vertebral, y el ganglio trigeminal se halla en la cabeza (Dhaka, Viswanath & Patapoutian, 2006).

Las neuronas DRGs se proyectan a tejido periférico, la piel, donde, en el caso de las neuronas que sensan temperatura y dolor, constituyen terminaciones nerviosas libres que detectan el estímulo; y tienen otra proyección que se dirige al cuerno dorsal de la espina dorsal, a la que transmite información sobre el estímulo (Patapoutian et al., 2003) (Fig. 6). Las neuronas termosensoriales detectan temperaturas en un rango nocivo (forman parte de los nociceptores, las neuronas que sensan dolor) o inocuo (Patapoutian et al., 2003).

Las neuronas que sensan dolor y temperatura son, según su tamaño y velocidad de conducción: fibras de diámetro pequeño, no mielinizadas (conducción lenta) de tipo C, y fibras más grandes, mielinizadas (conducción más rápida) de tipo A δ ; algunos nociceptores son polimodales, responden a varios estímulos y otros son unimodales, sólo detectan un estímulo (Patapoutian et al., 2003).

Entre las neuronas de tipo C y A δ , se han identificado dos grupos de acuerdo a su temperatura de activación: un grupo de neuronas C y A δ tipo II, de diámetro pequeño y mediano responden aproximadamente a 43°C, la temperatura que está justo en el rango de nocividad; y otro grupo contiene neuronas A δ tipo I, de diámetro mediano y más grande que responden a más de 52°C (Patapoutian et al., 2003; Dhaka et al., 2006).

resultados indican que TRPV1 no es el único sensor molecular en las neuronas con un umbral de activación de 42°C (Zhang, 2015).

Pero, ¿cómo se da la transducción de la señal térmica a una señal eléctrica en las neuronas termosensibles debido a la mediación de los canales activados por temperatura (incluido TRPV1)? Los canales sensibles a temperatura detectan los cambios ambientales de temperatura (en diferentes rangos) y se activan, permitiendo el paso de cationes que despolarizan la célula, y ésta dispara potenciales de acción que alcanzan la médula espinal y finalmente el cerebro, donde se traducen en respuestas fisiológicas y de comportamiento (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014) (Fig. 7).

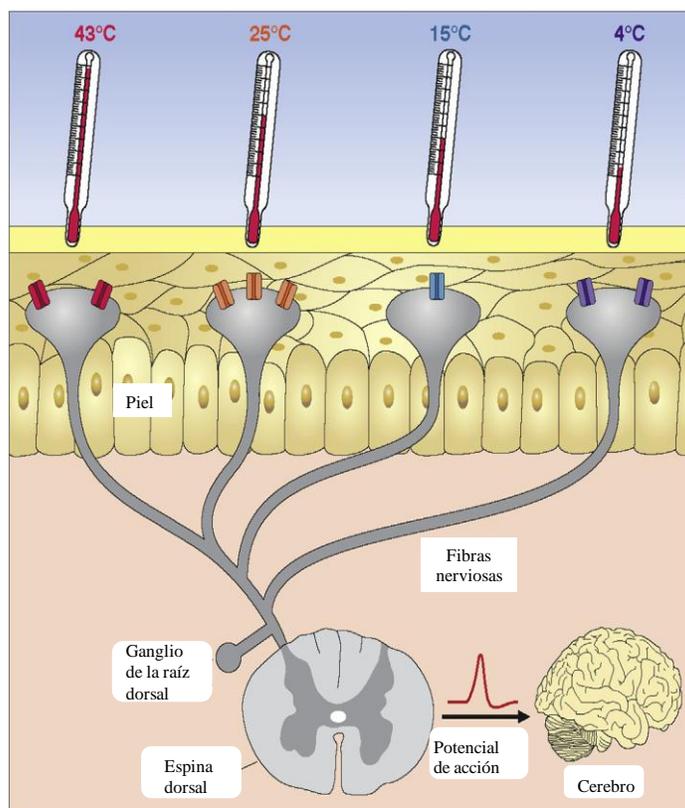


Fig. 7. Canales iónicos sensibles a temperatura en neuronas sensoriales. Tomado de Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014.

Es importante mencionar que el proceso de termosensación descrito en esta tesis se presenta a nivel de sistema nervioso periférico, pues después de la médula espinal, a través del eje espino-talámico, la señal alcanza el hipotálamo, el centro regulador de la temperatura corporal, encargado de mantener la homeostasis a través de diversos mecanismos de ganancia o pérdida de temperatura, según los órganos efectores (Wang & Siemens, 2016), y luego llega a la corteza somatosensorial primaria del cerebro, donde se genera la respuesta consciente al estímulo térmico.

De esta manera, la piel, las vísceras y el sistema nervioso central en sí mismo reportan cierta temperatura, y el hipotálamo junto con otras áreas del cerebro generan respuestas fisiológicas y de comportamiento a ésta (Fig. 8) (Wang & Siemens, 2016).

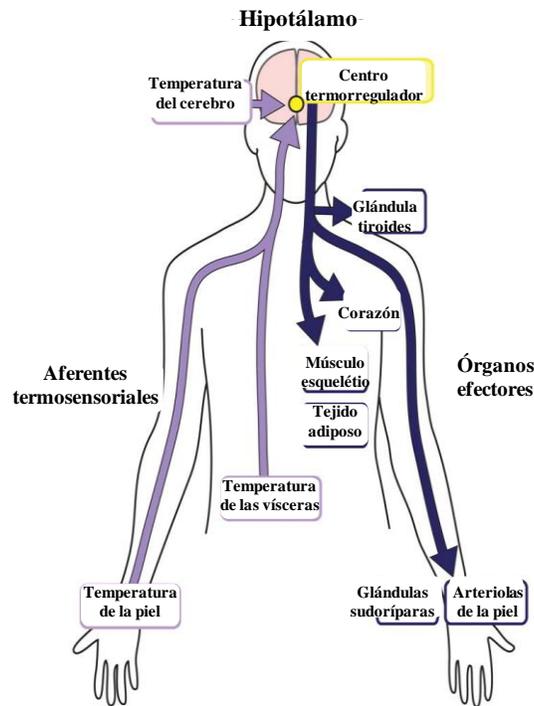


Fig. 8. Termorregulación de la temperatura corporal. Tomado de Wang & Siemens, 2016.

V. TRPV1: modelo de estudio

TRPV1 es uno de los canales iónicos más caracterizados, existe una gran cantidad de estudios acerca de su activación y regulación.

Fue clonado en 1997 por el grupo del Dr. David Julius, surge como el receptor de capsaicina (Caps), el principal compuesto activo de los chiles (género *Capsicum*) que les brinda su carácter pungente o picante. La capsaicina es un compuesto lipofílico cuya estructura es muy parecida a la de la vainilla, por lo que se denomina compuesto vaniloide (Fig. 9). Actúa selectivamente en un subgrupo de neuronas sensoriales de tipo C y A δ , cuyas terminaciones son denominadas nociceptores, ya que son sensibles a estímulos nocivos de tipo mecánico, térmico o químico; la capsaicina produce el dolor quemante (*burning pain* en inglés) típico del enchilamiento (Calixto, Kassuya, André, y Ferreira, 2005).

Otro de los compuestos que permitió identificar a TRPV1 fue la resiniferatoxina (RTX), un diterpeno muy irritante aislado del látex de la planta *Euphorbia resinifera* que es incluso más potente que la capsaicina al activar a TRPV1, y comparte con ésta una estructura muy parecida (Fig. 9). De esta forma, inicialmente se denominó VR1 (receptor vaniloide 1, por

su denominación en inglés), ahora es conocido como TRPV1 después de que fue integrado a la superfamilia de canales TRP. Se expresa principalmente en neuronas pequeñas y de mediano tamaño del ganglio de la raíz dorsal, así como el ganglio trigeminal. (Calixto et al., 2005).

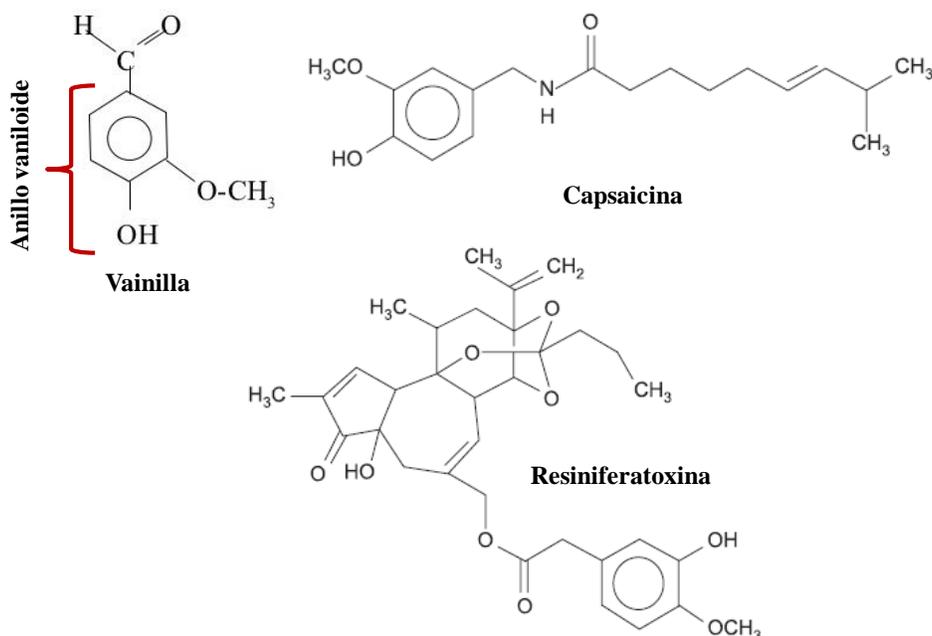


Fig. 9. Compuestos vaniloides. La capsaicina y la resiniferatoxina son denominados compuestos vaniloides, ya que comparten el anillo vaniloide con la vainilla. Modificado de Calixto et al., 2005.

TRPV1 es un canal catiónico no selectivo, mayoritariamente permeable a Ca^{2+} , que funciona como integrador molecular, al activarse por estímulos de naturaleza física y química (Calixto et al., 2005), es un canal polimodal.

Se activa por ligandos como capsaicina y resiniferatoxina; funciona como un canal rectificador saliente, es decir, se activa a potenciales despolarizantes superiores a +60 mV en ausencia de algún agonista (Winter, Buhala, Ötvös, Jósvey, Vizler et al., 2013); se activa por pH ácido extracelular; por temperatura, aproximadamente a más de 42°C; por mediadores lipídicos como la anandamida (Calixto et al., 2005), un compuesto vaniloide endógeno.

Ahora bien, dado que Caps y RTX tienen un sitio específico de unión al canal denominado sitio vaniloide, se consideran activadores; aquellos otros compuestos que afectan la función del canal de forma positiva pero indirecta (pues no se unen a un sitio específico del canal) se dice que lo sensibilizan. Varios mediadores de inflamación producidos en presencia de daño tisular sensibilizan o potencian al canal frente a sus agonistas, (Winter et al., 2013), tal es el caso de la bradicinina, el glutamato, prostaglandinas o el factor de crecimiento

nervioso (NGF) (Calixto et al., 2005). Dichos sensibilizadores actúan al unirse a receptores acoplados a proteínas G o receptores de cinasas de tirosinas (RTKs) (Winter et al., 2013).

De esta forma, TRPV1 participa en varias cascadas de señalización: posee sitios de fosforilación en los que actúan cinasas como PKC y PKA, la fosforilación en ciertas serinas y treoninas del canal sensibilizan al mismo cuando es activado por Caps, protones o calor; participa en la desensibilización dependiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular, donde la calmodulina (un sensor de calcio) se une al canal; o en la inhibición con PIP_2 (un fosfolípido de membrana), la cual sólo es removida cuando PLC (fosfolipasa C) hidroliza a PIP_2 (Rosenbaum y Simon, 2007).

Es así que TRPV1 está involucrado en la modulación de procesos nociceptivos que originan dolor (Calixto *et al.*, 2005; Rosenbaum y Simon, 2007), por lo que es una diana importante en la búsqueda de analgésicos potenciales.

En ese sentido, el primer antagonista identificado de TRPV1 fue el colorante rojo de rutenio (RuRed). No obstante, debido a que no es un antagonista específico puesto que actúa sobre otros canales TRP, se generó de forma sintética la capsazepina, un antagonista competitivo originado a partir de la capsaicina (Calixto et al., 2005).

Con respecto a la estructura de TRPV1 se han llevado a cabo varios estudios, pero es de gran relevancia el estudio llevado a cabo por Julius en 2013 mediante microscopía electrónica en frío, pues la reconstrucción tridimensional de la proteína tiene una resolución cercana a la resolución atómica (Liao, Cao, Julius, y Cheng, 2013).

Con base en esta estructura TRPV1 es un tetrámero, presenta 4 subunidades, cada una de ellas con 6 α -hélices como pases transmembranales (S1-S6), los segmentos S1-S4 presentan aminoácidos hidrofóbicos que forman una estructura rígida, la cual aparentemente permanece estática durante la activación del canal; entre el segmento S5 y S6 se halla una hélice que forma parte del asa que da lugar al poro, de tal manera que se forma una especie de cono invertido, con una simetría de 4 y el poro en el centro (Fig. 10). El poro es como un embudo con la parte más externa bastante amplia, seguido de un filtro de selectividad corto, una cavidad central amplia y finalmente otra constricción hacia el fondo, dicha constitución le brinda mucha flexibilidad, pues el poro se puede dilatar y dejar pasar cationes orgánicos grandes (Liao et al., 2013) (Fig. 11).

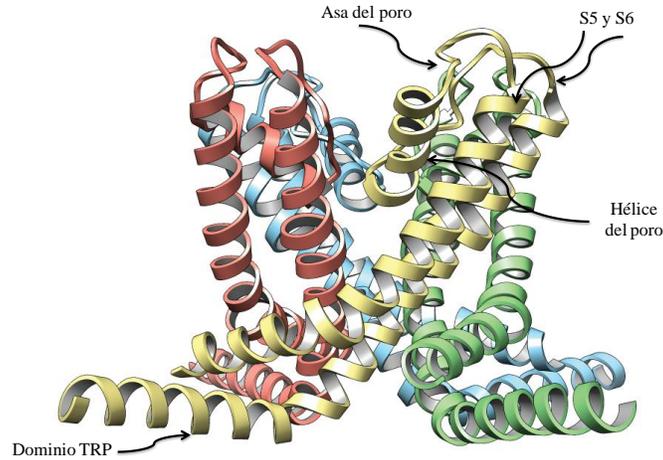


Fig 10. Diagrama en forma de cinta de TRPV1 como tetrámero. Se muestra la simetría de las cuatro subunidades que rodean al poro central (cada una de las subunidades se muestran con colores diferentes: amarillo, rojo, verde y azul). Tomado de Liao et al., 2013.

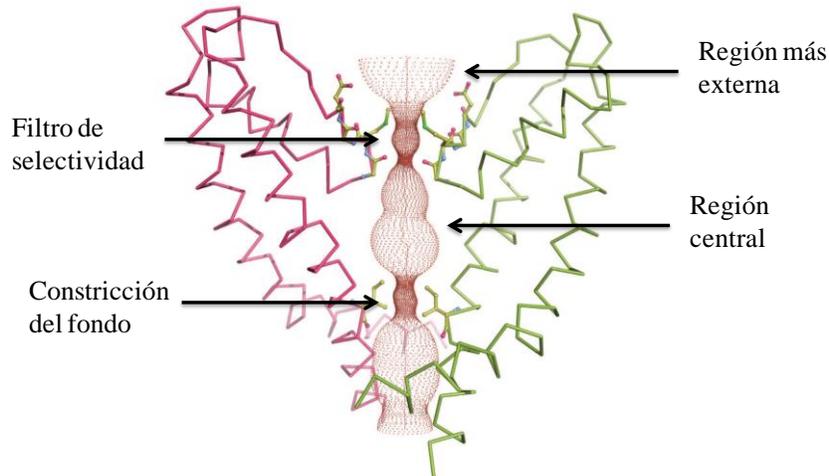


Fig. 11. Esquema del poro de TRPV1 en el que se muestran sus principales regiones. Tomado de Liao et al., 2013.

La región N terminal presenta 6 repeticiones de anquirina (si bien en la estructura resuelta sólo se observan 4) y la región C terminal tiene el dominio TRP, ambos son citoplásmicos (Fig. 12). El dominio TRP es mayoritariamente un α -hélice de 23 a 25 aminoácidos, y con respecto a las repeticiones de anquirina forman una estructura larga y colgante (Liao et al., 2013).

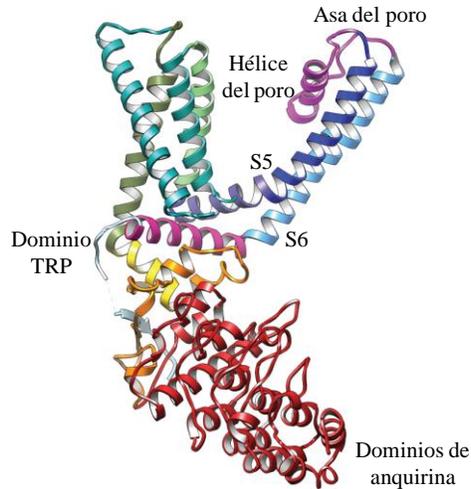


Fig. 12. Diagrama en forma de cinta que muestra los principales dominios del N y C terminal (dominios de anquirina y el dominio TRP respectivamente). Tomado de Liao et al., 2013.

El dominio de repeticiones de anquirina consta de 263 aminoácidos (101-364) distribuidos en 6 motivos (repeticiones de anquirina o ANK), cada repetición está formada por 2 hélices alfa antiparalelas, una interna y una externa, seguidas de un asa en forma de dedo (Lishko, Procko, Jin, Phelps, y Gaudet, 2007) (Fig. 13).

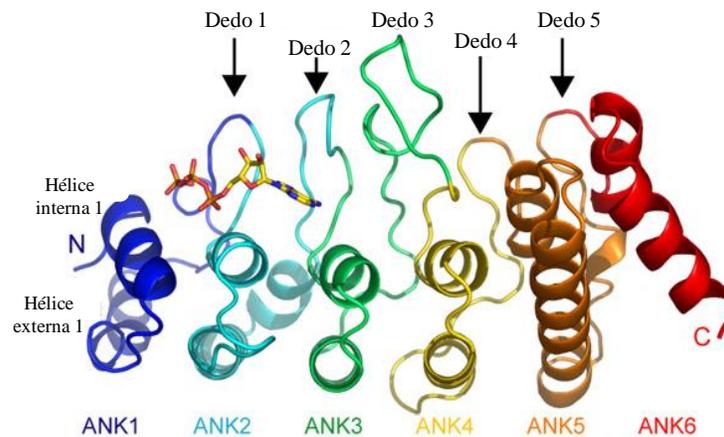


Fig. 13. Estructura en forma de cinta del dominio de anquirinas de TRPV1. Cada repetición o motivo está representado por un color distinto. La estructura fue resuelta mediante cristalización. Tomado de Lishko et al., 2007.

VI. Activación de TRPV1 por temperatura

Todas las proteínas tienen cierta dependencia de la temperatura, en las proteínas con acción enzimática su velocidad de reacción se modifica cuando se modifica la temperatura, no obstante, esta dependencia es muy pequeña comparada con la dependencia que presentan los canales iónicos activados por temperatura, el *gating* o respuesta del canal se modifica en función de la temperatura (Jara-Oseguera e Islas, 2013).

El coeficiente de temperatura Q_{10} es un factor que nos dice qué tanto depende de la temperatura un proceso determinado, se define como la razón de cambio en la velocidad de una reacción química medida a dos temperaturas separadas por 10°C (Gordon, 2015) (Ecuación 1); para un canal iónico considerado insensible a la temperatura es de aproximadamente 3 (Sengupta y Garrity, 2013 citado en Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014), en el caso de TRPV1 es de 27 (Liu, Hui, y Qin, 2003), es un termosensor exquisito.

Ecuación 1

$$Q_{10} = \left(\frac{k_2}{k_1} \right)^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right)}$$

Donde k_1 y k_2 son las velocidades de la reacción a la temperatura T_1 y T_2 , respectivamente (la temperatura puede ser en grados Celsius o grados Kelvin) (Ito, Ikemoto y Yoshioka, 2015).

Además, TRPV1 es un termosensor intrínseco, ya que cuando fue reconstituido en liposomas artificiales se activó por temperatura (Cao, Cordero-Morales, Liu, Qin, y Julius, 2013 citado en Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014).

Ahora bien, se ha caracterizado la sensibilidad exquisita a la temperatura de TRPV1, y que en general los demás termoTRPs también presentan, pero el mecanismo mediante el cual sensan la temperatura sigue siendo un misterio. Como en los canales sensibles a voltaje donde el S4 funge como sensor de voltaje, se ha buscado un posible sensor de temperatura.

En ese sentido, se han propuesto varios dominios sensores de temperatura (Fig. 14). En 2006, Brauchi, Orta, Salazar, Rosenmann, y Latorre realizan quimeras (combinación de las partes de 2 o más proteínas) en las que colocan el C terminal de TRPV1 en TRPM8 y viceversa, con lo cual la sensibilidad de ambos canales cambia, ahora TRPV1 se activa por frío y TRPM8 por calor (Fig. 5), por lo que se sugiere la participación del C terminal en la direccionalidad de la sensación de temperatura (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014).

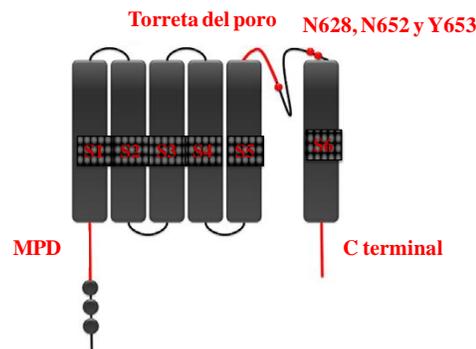


Fig. 14. Sitios que se ha postulado son responsables de la sensibilidad a temperatura de TRPV1. Modificado de Baez et al, 2014.

En 2008 y 2010 Grandl, Kim, Uzzell, Bursulaya, Petrus, Bandell, et al. realizaron mutagénesis en el dominio de poro de TRPV1 y TRPV3, las cuales afectaban la sensibilidad a temperatura (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014). Específicamente en 2010, realizaron mutaciones puntuales en el poro externo de TRPV1 y encontraron que N628K, N652T y Y653T disminuyen significativamente la sensibilidad a temperatura (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014).

Y también en el poro, en 2010 Yang, Cui, Wang, y Zheng, realizaron una modificación en la torreta, una secuencia de 24 aminoácidos entre el pase transmembranal 5 y la hélice del poro, sustituyeron una parte de la misma por una secuencia artificial con muchas glicinas, el canal resultante presentaba aún sensibilidad a capsaicina, pero la sensibilidad a calor disminuyó significativamente (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014). Esto sugería un papel muy importante de la torreta del poro en la activación de TRPV1 por calor; no obstante, en ese mismo año Yao, Liu, y Qin cuestionaron tal hecho al mostrar una delección de la misma región, que mantenía la sensibilidad a temperatura.

Luego, un año después (2011) nuevamente Yao, Liu, y Qin, realizaron varias quimeras de los canales TRPV1-4, mediante las cuales convergen a una secuencia de aproximadamente 80 aminoácidos que abarca las dos últimas repeticiones de anquirina y la región que las conecta con el primer pase transmembranal S1 (dominio cercano a la membrana: MPD), como la responsable de la sensibilidad a temperatura porque es la única mutación que modifica la entalpía de activación en los canales TRPVs.

Según los análisis termodinámicos de los termoTRPs, la activación de dichos canales por temperatura involucra un gran cambio de entalpía (ΔH). Esto es, si se toma en cuenta el cambio conformacional de la proteína al activarse por temperatura como una reacción química, el paso del estado cerrado (C) a abierto (O) involucra un gran cambio en el flujo de calor a presión constante (entalpía) (Chang & Goldsby, 2013; Baez et al, 2014). La medición de la entalpía se ha realizado con base en un modelo matemático de 2 estados, el más simple, C-O, dando valores de aproximadamente 100 Kcal/mol (Yao, Liu, y Qin, 2010b).

Y con base en los modelos antes mencionados, se ha encontrado que el cambio en la entropía (ΔS), es decir, la gran probabilidad de ocurrencia de estados desordenados en la reacción (Davidovits, 2008), también es grande y positivo, de alrededor de 315 cal/(mol)•K (Yao, Liu, y Qin, 2010b); así que ΔH y ΔS se compensan dando lugar a un cambio relativamente pequeño en la energía libre de Gibbs (ΔG), la energía disponible para realizar trabajo (Chang & Goldsby, 2013), la cual si es negativa nos indica que la reacción es espontánea, entonces el paso del estado abierto a cerrado del canal es un proceso espontáneo y reversible (Ecuación 2) (Baez et al, 2014).

Ecuación 2

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

En el caso de los canales activados por temperaturas frías, los valores de ΔH y ΔS son negativos y de aquellos que se activan por calor son positivos, esto porque cuando la temperatura decrece, ΔG disminuye para un canal activado por frío (TRPM8), y cuando la temperatura aumenta ΔG decrece para un canal activado por calor (TRPV1 por ejemplo) (Baez et al, 2014).

Uno de los primeros estudios que involucran el cálculo de los parámetros termodinámicos en la activación de TRPV1 por temperatura es el que realizaron Liu, Hui, y Qin en 2003. A partir de un análisis de canal unitario (*single channel* en inglés) en ovocitos de rana (*Xenopus leavis*) obtienen la probabilidad de apertura (P_o) del canal con respecto a la temperatura, dicha curva sigue una tendencia sigmoidea, saturada más o menos a 50°C (Fig. 15).

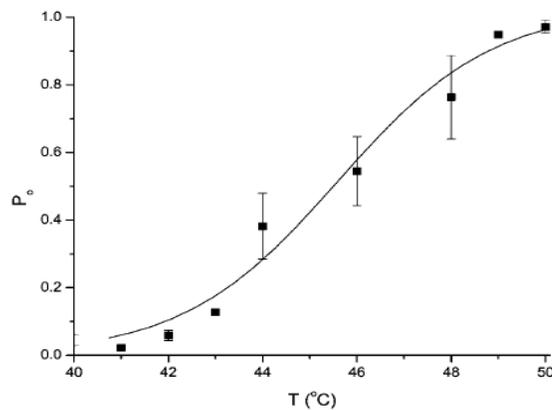


Fig. 15. Probabilidad de apertura de TRPV1 al ser activado por temperatura. Tomado de Liu et al, 2003.

Con base en la P_o , realizan una regresión lineal de la gráfica de Van Hoff (una gráfica de $\ln K_{eq}$ vs $1/T$, que da una idea del cambio en la velocidad de una reacción química como consecuencia del cambio en la temperatura), y encuentran valores altos de la entalpía y entropía, principalmente de esta última, por lo que sugieren que el canal presenta un gran cambio conformacional cuando se activa por temperatura.

Pero quizá lo más interesante que explican, es la actividad del canal cuando es estimulado por un rango de temperatura de 40°C a 50°C, pues cuando aumenta la temperatura, los cierres largos del canal (*gaps*) van disminuyendo en duración, y las aperturas del canal (*burst*) se van haciendo más largas. Dichos *burst* y *gaps* son altamente dependientes de la temperatura según el cálculo de sus Q_{10} .

Liu, Hui, y Qin explican que existen varios tipos de *gaps* y *burst* de diferente duración, y cuando aumenta la temperatura, se favorecen los cierres más cortos y las aperturas más largas. De esta forma, sugieren que el canal pasa por varios estados cerrados y varios

estados abiertos (modelo de varios estados), donde las aperturas de larga duración y los cierres de corta duración están acoplados a altas temperaturas.

Posteriormente, en 2010 Yao et al. realizaron un estudio enfocado en la cinética y energética de TRPV1 cuando es activado por calor. A partir de un método muy rápido (en el orden de ms) para estimular al canal por calor (un diodo láser infrarrojo), obtienen que la temperatura es el estímulo más rápido para activar al canal (constante de 6 ms), a diferencia de su activación por capsaicina o pH (Yao et al., 2010b).

Concluyen que es principalmente el curso temporal de la apertura del canal el que da cuenta de la dependencia de temperatura del mismo en el equilibrio, y no así el curso de cierre, el cual más bien depende de una temperatura fría, como en TRPM8.

Además, puntualizan que el canal pasa de un estado cerrado ordenado (entropía baja) a un estado abierto desordenado (entropía alta), donde la entropía y la entalpía se compensan, y entonces la energía libre de Gibbs permite un proceso de activación por temperatura muy rápido.

Por otra parte, Latorre, Brauchi, Orta, Zaelzer, y Vargas (2007) enfatizan la idea del acoplamiento entre la energía térmica del sensado de la temperatura y la energía mecánica de la apertura del poro. Sugieren que TRPV1 está compuesto por 4 módulos: el módulo N terminal, C terminal, el módulo del poro y el módulo S1-S4, existe un módulo en el canal capaz de sensar la temperatura que influye la respuesta del canal o *gating*, permitiendo la apertura del poro; así como un módulo que sensa el voltaje, igualmente acoplado al “*gating*” del canal, y además el sensor de voltaje y temperatura están acoplados alostericamente.

Una forma de explicar esta interacción alostérica es análoga en proteínas alostéricas, normalmente las proteínas tienen un sitio de unión donde se une su ligando, y se genera un cambio conformacional en la proteína que permite realizar su función, pero existen otras proteínas, las proteínas alostéricas que se unen a un modulador (una molécula), y la unión a este modulador genera un cambio conformacional que facilita la unión de su ligando, la proteína pasa de un estado menos activo a uno más activo cuando se une el modulador, de tal forma que la unión de un ligando en un sitio, afecta la unión de otro ligando en otro sitio de la misma proteína (Nelson & Cox, 2013). Según la idea del acoplamiento alostérico entre un módulo del sensado de la temperatura y uno de voltaje, ambos se detectan en sitios distintos (sitios alostéricos, “otro lugar”) pero acoplan sus energías, térmica y eléctrica, respectivamente, hacia la energía mecánica de abrir el poro.

Lo anterior se observa en una curva P_o vs V (voltaje), donde en un canal activado por calor como TRPV1, al aumentar la temperatura, dicha curva se corre hacia la izquierda (el canal se abre a potenciales cada vez menos despolarizantes). En el caso de los canales activados

por frío (TRPM8) al aumentar la temperatura, la curva se corre hacia la derecha (el canal se abre a potenciales cada vez más despolarizantes) (Chowdhury, Jarecki, y Chanda, 2014).

Para explicar el corrimiento de la curva P_o vs V , y con base en la idea de que TRPV1 y TRPM8 más bien son canales con múltiples estados abiertos y cerrados (Lui et al., 2003), Latorre et al. (2007) proponen un modelo ramificado de 8 estados, con un sensor de voltaje y uno de temperatura (Fig. 16).

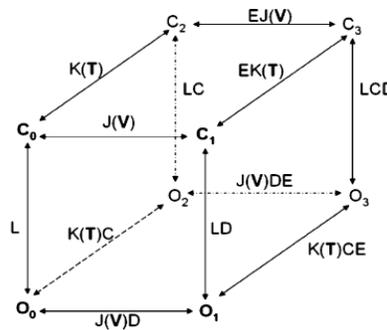


Fig. 16. Modelo de 8 estados del canal iónico TRPV1. Donde L es la constante de equilibrio de la transición cerrado a abierto del canal sin la detección de algún estímulo, J cuando se detecta voltaje y K cuando se detecta temperatura; C representa un factor alostérico del acoplamiento entre el sensor de temperatura y la apertura del poro, D entre el sensor de voltaje y la apertura del poro, y E el acoplamiento entre el sensor de temperatura y voltaje.

Con respecto al acoplamiento entre el sensado de voltaje y la temperatura en TRPV1, Yao et al. (2010b) probaron que a potenciales despolarizantes baja el umbral de activación del canal, el tiempo de respuesta es más rápido y la dependencia de temperatura del canal baja, pues los valores de la entalpía y entropía bajan. No obstante, a potenciales hiperpolarizantes aún se observa respuesta del canal a la temperatura, por lo que la activación de los sensores de voltaje no es necesaria para la apertura del canal.

Ahora bien, generalmente se establece que la entalpía y entropía de la activación de TRPV1 por calor son independientes de la temperatura, entonces la curva de van Hoff ($\ln K$ vs. $1/T$) es una línea recta cuya pendiente es la entalpía. No obstante, Clapham y Miller (2011) destacan que el comportamiento de las proteínas no es así, en un cambio conformacional se da un cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p), la cantidad de calor necesario para elevar un grado Celsius la temperatura de cierta cantidad de una sustancia dada (Chang & Goldsby, 2013), por lo que ΔS y ΔH se modifican al cambiar la temperatura (T_0 y T).

Por consiguiente, con base en un brillante análisis termodinámico, sostienen que la relación entre la constante de equilibrio (K) y la temperatura, siguen una curva en forma de U en un modelo de dos estados (cerrado-abierto). Las curvas del canal activado por frío y la del canal activado por calor, corresponden a la temperatura inicial (T_0) de 29°C y 21°C, respectivamente (Fig. 17).

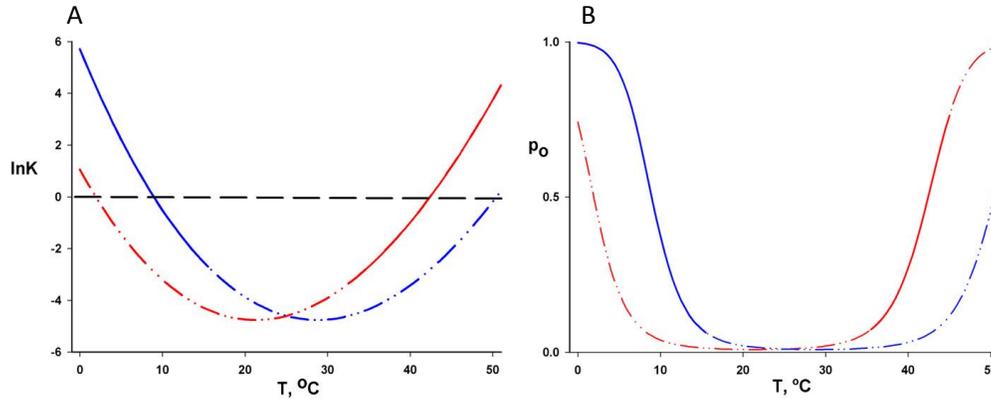


Fig. 17. A) Curva $\ln K$ vs. Temperatura en forma de U, para un canal iónico activado por calor (línea roja) y un canal activado por frío (línea azul). B) Gráfico P_o vs. T a temperaturas bajas y altas. Tomado de Clapham y Miller (2011).

De esta manera, enfatizan que un canal activado por calor también debe ser activado por frío, según la forma de U de la curva $\ln K$ vs. T , y sugieren que los cambios conformacionales en el proceso de activación por temperatura son los mismos (Fig. 17b).

Concluyen que un cambio en la capacidad calorífica es la fuente de la gran sensibilidad a temperatura de los canales TRP, pues determina los grandes cambios de entalpía y entropía; y que dicho cambio de capacidad calorífica proviene de la exposición de aminoácidos hidrofóbicos al agua, entonces un canal activado por calor también puede ser activado por frío, ya que la exposición de aminoácidos hidrofóbicos al agua ocurre en ambos procesos de activación.

No obstante, Jara-Oseguera e Islas (2013) destacan que si bien no se descarta un papel del cambio en la capacidad calorífica como determinante en la sensibilidad a temperatura de los canales TRP, existe otro mecanismo que puede dar cuenta de dicho comportamiento.

Retoman la idea del acoplamiento alostérico de Latorre et al. (2007), y destacan que la apertura del poro no es tan dependiente de la temperatura como lo es la detección que realiza el sensor de temperatura (Liu et al., 2003 y Yao et al., 2010b). Con base en ello, proponen que existen otros parámetros relevantes en la activación por temperatura de TRPV1, y que dan cuenta de la activación del canal al mismo tiempo por temperaturas frías y cálidas, como en el modelo de Clapham & Miller (2011).

Entonces, a través de predicciones del modelo alostérico de 8 estados encuentran que la constante de equilibrio L (la apertura del poro sin ningún estímulo), la proporción $\Delta H/\Delta S$ y el factor alostérico C (acoplamiento entre el sensor de temperatura y la apertura del poro) determinan el cambio de un canal activado por calor (TRPV1) a uno activado por frío (TRPM8); al mantener los mismos valores de ΔH , sugieren que ambos canales se activan

con valores positivos de entalpía y entropía, pero el acoplamiento entre el sensor de temperatura y la apertura del poro es inverso.

Aún más, encuentran que la dependencia de temperatura (entalpía) del factor alostérico C (ΔH_c), es muy importante en la activación del canal tanto por temperaturas frías como cálidas, aunque se mantengan los mismos parámetros para ambas curvas. Por lo que ΔH_c parece tener grandes contribuciones en el comportamiento de los termoTRPs.

De esta manera, es importante resaltar la proposición del mecanismo de acoplamiento inverso entre el sensor de temperatura y la apertura del poro en la activación de un canal por diferentes rangos de temperatura, pues enfatiza la sucesión de pasos que sigue TRPV1 al activarse por temperatura, cómo son y están relacionados cada uno de ellos.

En ese mismo sentido, recientemente (2014) Chowdhury, Jarecki & Chanda realizaron un estudio en el que mutaron varios aminoácidos del dominio sensor de voltaje (S1, S2, S3 y S4) del canal activado por voltaje Shaker, el cual presenta una dependencia muy baja a la temperatura, por aminoácidos con diferente polaridad, de forma que ahora Shaker presentaba dependencia de la temperatura. Midieron la dependencia de la temperatura a través del corrimiento de la curva P_o vs V , hacia la derecha o izquierda según sea un canal sensible al frío o calor, respectivamente. Dichas mutaciones se realizaron en sitios donde los aminoácidos pasaban por cambios en solvatación hacia la apertura del canal.

Enfatizan que según el cambio en la polaridad de los aminoácidos, el fenotipo de un canal dependiente de la temperatura puede cambiar de ser sensible a calor a ser sensible al frío.

Con base en lo anterior, sugieren que la sensibilidad a la temperatura de los canales como los termoTRPs no proviene de un dominio sensor de temperatura, sino que existen pequeños sitios (microdominios) dentro del canal que sufren cambios en la solvatación de los aminoácidos, hidrofóbicos o hidrofílicos, que dan lugar a cambios en la capacidad calorífica y a su vez de la entalpía y entropía, por lo que no se requiere un gran cambio conformacional en su activación por temperatura.

VII. Estimulación de TRPV1 con pulsos de temperatura consecutivos

Con base en la información previa se puede notar que el mecanismo de activación de TRPV1 por temperatura aún no ha sido dilucidado de manera definitiva, si bien se tienen ya ciertas características de la activación del canal por calor. Esto obedece, entre otras razones, a las dificultades que conlleva estimular a TRPV1 por calor, puesto que el método de calentamiento debe ser rápido, de lo contrario los parches o microáreas de registro en la membrana no pueden mantenerse por mucho tiempo; además, como la temperatura afecta todo el sistema, el calentamiento debe ser localizado, sólo en un área pequeña.

Entonces, el laboratorio donde se llevó a cabo esta tesis desarrolló un método para activar a TRPV1 por calor, se trata de un microcalentador al cual se le administra un voltaje, se

produce una corriente y calienta el área cercana a él, dicho microcalentador se ha usado para activar corrientes de TRPV1 por temperatura satisfactoriamente (Islas, De-la-Rosa, Rodríguez-Cortés, Rangel-Yescas & Elias-Viñas, 2015).

De esa manera, en un sistema de expresión heterólogo, células HEK 293 que expresan TRPV1, se registraron corrientes del canal con *patch clamp* en configuración *inside-out* (parte intracelular del canal), y se identificó una reducción en la corriente de TRPV1 al estimular con pulsos de temperatura consecutivos, por lo que se sugirió un fenómeno de inactivación.

El concepto de inactivación es casi sinónimo de desensibilización, ambos son procesos donde en presencia del estímulo que activa al canal, éste entra a un estado cerrado estable, denominado estado inactivado o estado desensibilizado. No obstante, la inactivación se ha usado de manera clásica en canales activados por voltaje, y la desensibilización en canales activados por ligando (Zagotta, 2015).

Ahora bien, en el caso de TRPV1 existe desensibilización por calcio. Las células no toleran altos niveles de calcio intracelular, por lo que tienen mecanismos para regresar a niveles normales, uno de esos mecanismos es la desensibilización. En TRPV1, en condiciones fisiológicas, su activación por diversos estímulos (calor, protones, capsaicina) genera la entrada de calcio, puesto que presenta una gran permeabilidad al mismo, y dicha entrada en sí misma señala la reducción de actividad del canal (Gordon, 2015).

El proceso consiste en la entrada de calcio, con la subsecuente activación de la fosfolipasa C (una enzima que rompe fosfolípidos), la cual degrada a PIP_2 , y si se considera que es un activador de TRPV1 (puesto que aún hay controversia en cuanto a su papel activador o inhibidor en TRPV1), entonces hay desensibilización del canal (Zagotta, 2015; Gordon 2015).

También, existe la desensibilización por calcio mediada por calmodulina en lugar de PIP_2 . La calmodulina es una proteína que tiene 4 sitios de unión a calcio, y en el caso de TRPV1 ejerce un efecto inhibitorio sobre el gating del canal. Se ha sugerido que cuando TRPV1 es activado por estímulos repetidos de capsaicina se genera desensibilización con dos componentes, el componente rápido está mediado por la unión de calcio a la calmodulina, la cual se halla constitutivamente asociada al canal en un sitio de unión del C terminal, la unión del calcio permite que la calmodulina ejerza su función inhibitoria sobre el canal. El componente lento está mediado por calmodulina con independencia de calcio, puesto que sólo la calmodulina se une al N terminal de TRPV1 (Zheng, 2013).

En esta tesis, la reducción en la corriente de TRPV1 al ser estimulado con pulsos sucesivos de temperatura, se considera un fenómeno de inactivación puesto que los experimentos son llevados a cabo en ausencia de calcio. Sin embargo, en los antecedentes directos de la tesis se usan ambos conceptos, e incluso se utiliza el de taquifilaxis. La taquifilaxis es un

concepto farmacológico en el que después de administrar un fármaco de manera repetida, la respuesta al mismo disminuye (Diccionario médico, 2015).

Pero, es importante resaltar que la inactivación o desensibilización se generan cuando el estímulo activador se presenta de manera sostenida por un periodo largo de tiempo, o bien cuando se estimula de manera repetida y se varía el intervalo de tiempo entre la estimulación (se suele decir que la taquifilaxis se presenta sólo cuando se dan varios pulsos repetidos a cierto intervalo de tiempo (Schwarz, Greffrath, Busselberg & Treede, 2000)).

En 1996, Cesare y McNaughton publicaron un artículo en el que mostraron que un cultivo de neuronas DRGs de rata (cuya corriente aumenta considerablemente después de 42°C, correspondería a TRPV1) al ser registrado con *patch clamp* en configuración *whole-cell*, era sensibilizado por bradicinina cuando se estimulaba con rampas de temperatura (25 a 49°C), al perfundir solución calentada con un Peltier; dicha sensibilización provenía de la activación de PKC, una cinasa activada por la bradicinina.

Pero además, dichas neuronas fueron estimuladas con la aplicación de calor de manera repetida, y observaron que no se sensibilizan, a diferencia de lo que sucede en neuronas *in vivo*, donde hay sensibilización. Por ello, sugieren que esta sensibilización no es intrínseca de las neuronas, sino más bien de factores externos como la bradicinina, la cual se libera en presencia de daño tisular. Los experimentos fueron llevados a cabo con calcio extracelular.

Luego, después de la clonación de TRPV1 en 1997, Tominaga, Caterina, Malmberg, Rosen, Gilbert, et al. (1998) llevan a cabo un trabajo acerca de los diferentes estímulos nocivos que activan al canal, enfatizan el efecto de los protones sobre TRPV1; y al mismo tiempo dan cuenta de cierta sensibilización del canal cuando es activado por calor.

A través de sistemas de expresión heteróloga (células HEK 293 y ovocitos de *Xenopus*), registran corrientes del canal con *patch clamp* en diferentes configuraciones, perfundiendo solución de registro caliente. Realizan un experimento en que sin calcio extracelular, estimulan dos veces con capsaicina, luego estimulan tres veces con calor (observan desensibilización, disminución de la corriente), al estimular nuevamente con capsaicina no observan corriente alguna, por lo que enfatizan la desensibilización cruzada; y al estimular con ambos estímulos registran recuperación de la corriente (Fig. 18).

Y de hecho comparan la inhibición de las corrientes de TRPV1 debido a la desensibilización, con la inhibición por antagonistas como el rojo de rutenio y la capsazepina.

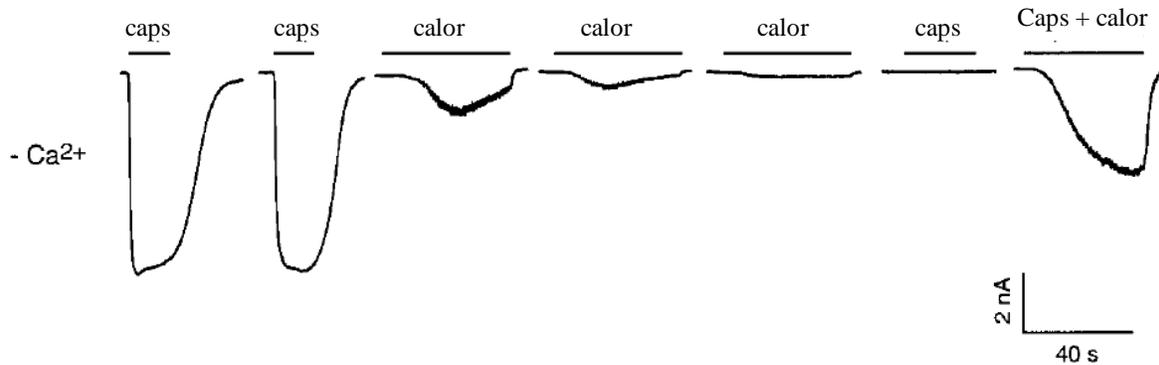


Fig. 18. Corrientes a través del canal TRPV1 transfectado en célula HEK 293, la cual es registrada mediante *patch clamp* en configuración *whole-cell* a -60 mV. La temperatura fue de 22 a 46°C y la concentración de capsaicina fue de 1 μM. El intervalo entre los estímulos es de 2 min. Tomado de Tominaga et al., 1998.

En consecuencia con el trabajo de Cesare y MacNaughton (1996), en 1999 Vyklický, Vlachová, Vitásková, Dittert, Kabát, y Orkand, realizan un estudio en el que registran mediante *patch clamp* un cultivo de neuronas DRGs, al cual le aplican rampas repetidas desde 25°C hasta 49°C, y observan que la corriente activada por calor (I_{heat}) disminuye en el segundo pulso, así como en los pulsos siguientes, además de que el umbral de activación de dicha corriente baja (Fig. 19).

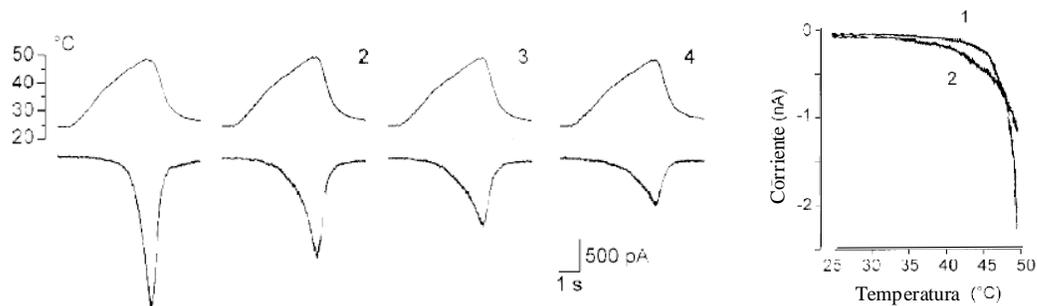


Fig. 19. Rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRGs. Rampas a 49°C cada 30 s, en la parte superior se muestra la estimulación por temperatura y en la parte inferior las corrientes a -60 mV. También se muestra la gráfica corriente vs. temperatura de la primera y segunda estimulación. Neuronas DRGs pequeñas (menos de 25 μm de diámetro) de rata, registradas mediante *patch clamp* en configuración *whole-cell*, con perfusión de solución caliente. Tomado de Vyklický et al., 1999.

Este fenómeno denominado taquifilaxis, era aún más pronunciado al activar I_{heat} con rampas de temperatura que alcanzaban los 57°C, puesto que la corriente en el segundo pulso apenas era menos del 50% de la corriente inicial, y el umbral de activación bajaba de 43°C hasta temperaturas un poco superiores a las del baño de registro.

Además, uno de los objetivos del estudio consistía en calcular el Q_{10} de I_{heat} , el cual bajaba desde 18 en la corriente inicial, hasta 4.5 en la segunda estimulación. Dicha taquifilaxis no

depende de calcio como en capsaicina, puesto que los autores realizaron experimentos sin calcio y aún fue observada.

Sugieren que un cambio tan drástico en el Q_{10} , podría deberse a un cambio irreversible en la estructura de la proteína responsable de I_{heat} , la cual en ese entonces ya se planteaba que era posiblemente TRPV1.

En ese mismo año, Caterina, Rosen, Tominaga, Brake, y Julius (1999), clonan un canal TRP, denominado TRPV1 por su similitud en secuencia con TRPV1 (actualmente denominado TRPV2), activado por rampas de temperatura superiores a 52°C , un umbral de activación muy alto; y en uno de los experimentos presentados en el estudio estimulan a TRPV1 con rampas de temperatura consecutivas, las cuales alcanzan más de 50°C ; observan que hay una sensibilización y el umbral de activación del mismo baja a temperaturas cercanas a los 40°C (Fig. 20).

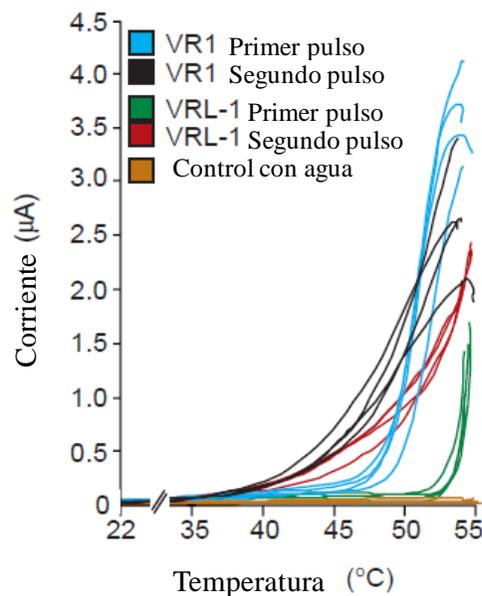


Fig. 20. Rampas de temperatura consecutivas en ovocitos de *Xenopus* que expresan TRPV1. Se muestran rampas de temperatura que alcanzan más de 50°C al aplicar calor con perfusión de solución caliente, mediante las cuales se registraron corrientes de ovocito ($n=4$) con *voltage clamp* de 2 electrodos. Tomado de Caterina et al., 1999.

Además, muestran que TRPV1 se expresa principalmente en neuronas pequeñas ($19\ \mu\text{m}$ de diámetro) de tipo C en el Ganglio de la Raíz Dorsal, por lo que este canal podría ser el receptor de dichas neuronas.

Luego, Nagy y Rang, también en 1999, en uno de sus experimentos aplican calor de forma repetida con perfusión de solución caliente (alcanzan alrededor de 50°C) a neuronas DRGs de pequeño diámetro con sensibilidad a calor, registran *single channels* (canal unitario) con

patch clamp en configuración *inside-out* a -60 mV, y muestran que el canal permanece abierto, hay una disminución en la respuesta pero no causa desensibilización.

Posteriormente, en el año 2000, Schwarz et al. realizan un estudio en el que estimulan un cultivo de neuronas DRGs de pequeño diámetro con pulsos de temperatura. Al calentar con un intercambiador de solución caliente alcanzan entre 43 y 47°C , y registran corrientes mediante *patch clamp* en configuración *whole-cell* a -60 mV. Muestran un fenómeno de inactivación al sostener el pulso de temperatura por cierto período de tiempo en las neuronas (Fig. 21).

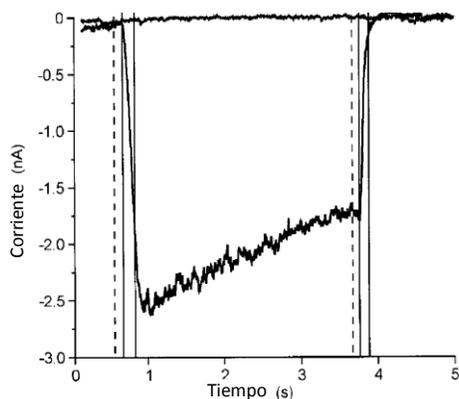


Fig. 21. Inactivación de la corriente en neurona DRG pequeña. El pulso de temperatura (35°C - 45°C) se sostuvo por aproximadamente 4 s y se observa una inactivación de la corriente. Tomado de Schwarz et al., 2000.

También, observan un fenómeno de taquifilaxis al repetir el mismo pulso de temperatura al menos tres veces (Fig. 22).

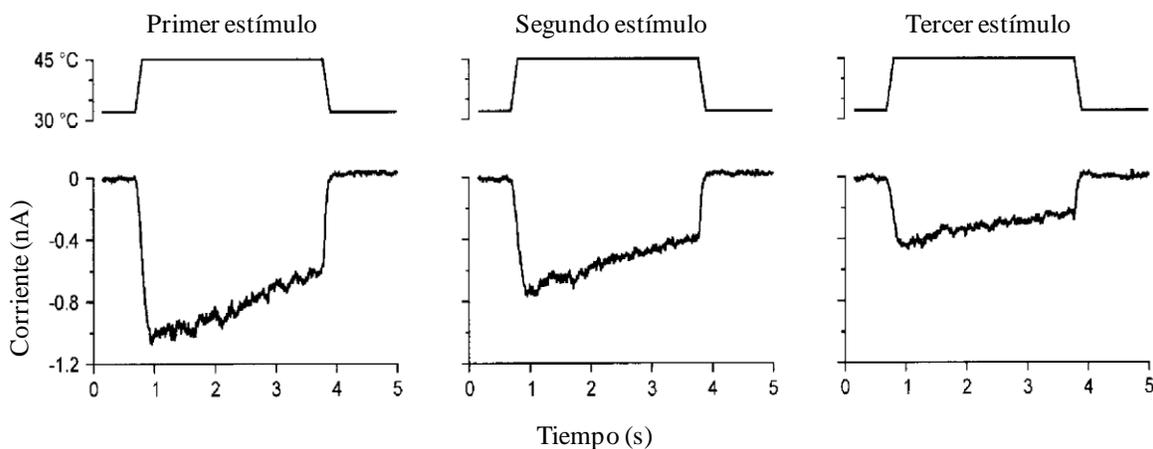


Fig. 22. Taquifilaxis en neurona DRG pequeña. Se aplican tres pulsos de temperatura con un intervalo de tiempo de aproximadamente 30 s y se observa una reducción en el pico de la corriente. Tomado de Schwarz et al., 2000.

Ambos fenómenos son independientes de calcio, puesto que además ambos experimentos fueron realizados sin calcio intracelular (uso de BAPTA) o calcio extracelular (uso de EGTA).

Los autores sugieren que los fenómenos de inactivación y taquifilaxis observados en estas neuronas DRGs pequeñas pueden dar cuenta de la adaptación y supresión, respectivamente, del disparo de potenciales de acción en neuronas de tipo C y A (tipo II) al ser estimuladas por una temperatura nociva (más de 42°C) de forma sostenida o de forma repetida *in vivo*.

Es interesante mencionar que en 2002, Jordt y Julius clonan un ortólogo de TRPV1 en aves (cVR1), dicho canal no se activa con capsaicina, pero sí por calor; y muestra desensibilización al ser activado con estímulos repetidos de temperatura como en el TRPV1 de rata (Fig. 23).

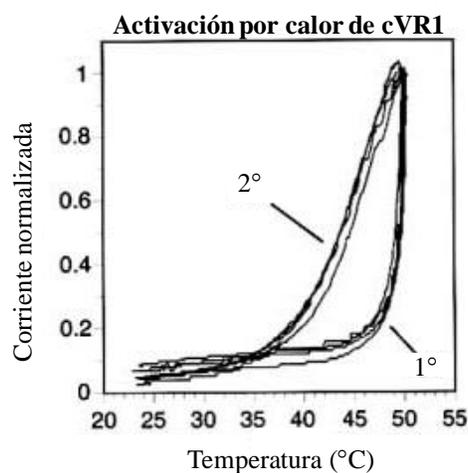


Fig. 23. Activación de cVR1 por 2 estímulos de temperatura. Cuatro ovocitos de *Xenopus* fueron inyectados con cVR1, y registrados con *voltage clamp* a -40 mV al ser activados con perfusión de solución caliente desde la temperatura ambiente a 50°C durante 20 s. La corriente fue normalizada al pico de corriente en 50°C. Tomado de Jordt & Julius, 2002.

Finalmente, en 2015 Liu y Qin publicaron un artículo en el que analizan la activación de TRPV2 por calor, para ello emplearon células HEK 293 como sistema de expresión heteróloga, registraron corrientes con *patch clamp* en configuración *whole-cell* o *inside-out* a -60 mV, y estimularon rápidamente por calor mediante un diodo láser infrarrojo. Estos autores muestran la dependencia del uso de TRPV2, pues cuando el canal es estimulado con varios pulsos de temperatura disminuye su umbral de activación, aumenta la corriente y disminuye la entalpía de activación. Al caracterizar dicho fenómeno en TRPV2 sugieren que tal vez ocurra en los demás TRPVs, así que prueban la dependencia del uso de TRPV1.

No obstante, observan que la sensibilidad a la temperatura de TRPV1 es estable, ya que al estimular al canal por calor con dos pulsos de temperatura no observan cambios significativos en ambas respuestas. Si bien, es importante notar que hay una disminución en

la corriente del segundo pulso, el canal se comienza a activar a temperaturas inferiores a 42°C, su umbral de activación y la entalpía de activación baja ligeramente (Fig. 24). Los experimentos fueron llevados a cabo sin calcio, usaron EGTA, un quelante de calcio.

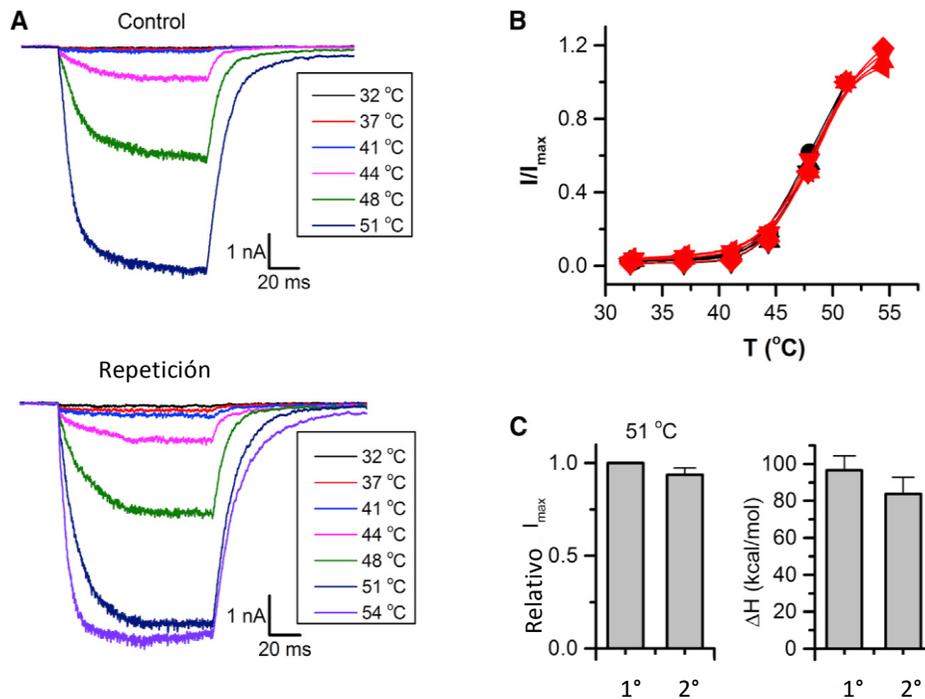


Fig. 24. La sensibilidad a temperatura de TRPV1 es estable cuando es estimulado por pulsos de temperatura varias veces. Se observan los pulsos de temperatura de la primera estimulación (control) y los de la segunda (repetición). Así como las curvas I/I_{max} vs. temperatura de la primera estimulación (negro) y la segunda (rojo). Además se muestra la comparación de la corriente máxima (I_{max}) y la entalpía de activación de ambas estimulaciones. Promedio de 10 experimentos en configuración *inside-out* a -60 mV. Tomado de Liu & Qin, 2016.

De esta forma, anteriormente ya se había identificado un fenómeno de inactivación, desensibilización o taquifilaxis en TRPV1, principalmente en neuronas DRGs, pero también en células de expresión heteróloga. No obstante, no se abordó en detalle como un fenómeno propio de TRPV1, en esta tesis se caracteriza la inactivación de TRPV1 por temperatura al ser expresado heterológamente en células HEK 293 y ser estimulado por un microcalentador.

Caracterizar la inactivación de TRPV1 por temperatura es importante porque da cuenta de un fenómeno en el que el canal se inhibe, lo cual se relaciona con las cadenas de señalización celular en las que el canal participa.

También, puede dar idea sobre el mecanismo mediante el cual TRPV1 sensa la temperatura, puesto que si la inactivación disminuyera, podría relacionarse con la detección de temperatura del mismo.

Además, la caracterización de este fenómeno también proporciona información sobre la activación de TRV1 por calor, tales como su umbral de activación, su forma de enfriamiento, la relación entre la activación por temperatura y voltaje, o temperatura y capsaicina.

Objetivos

General

Caracterizar la inactivación por temperatura del canal iónico TRPV1 expresado en células HEK 293, mediante el uso de un microcalentador fabricado previamente en el laboratorio.

Particulares

- Establecer si la inactivación por temperatura depende del tiempo en que se estimula al canal.
- Establecer la dependencia de la inactivación de la temperatura con que se estimula al canal.
- Probar la reversibilidad de la inactivación al enfriar el baño de registro.
- Probar la reversibilidad de la inactivación al activar con capsaicina.
- Caracterizar el proceso de inactivación con pH 9 intracelular.
- Caracterizar el proceso de inactivación en presencia de ATP intracelular.

Hipótesis

Si se estimula a TRPV1 con pulsos de temperatura consecutivos mediante el microcalentador, entonces se caracterizará la inactivación del canal en células HEK 293, un proceso dependiente del uso y de la temperatura, además, estos resultados permitirán entender el mecanismo molecular de su activación por temperatura.

Métodos

I. Cultivo celular

Se empleó como modelo experimental la expresión heteróloga de TRPV1 en células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney cells* por sus siglas en inglés), una línea celular inmortalizada caracterizada por presentar pocos canales iónicos endógenos. Las células provienen de un vial inicial y se resiembran o pasan a una caja nueva dos veces por semana desde entonces.

El pase de células consiste en succionar el medio de cultivo DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal de bovino, penicilina-estreptomicina 1%, con un pH de 7, de la caja donde está el cultivo de células, y agregarles 1 ml de tripsina-EDTA, esto para que se despeguen del fondo de la caja, pues dichas células se caracterizan por adherirse al sustrato. Una vez que se incuban de 3 a 5 min, se les agrega 1 ml de medio de cultivo, y se procede a despegarlas con una micropipeta al cargar y descargar 1 ml de células, hasta que se observan pocos conglomerados celulares. Posteriormente, se siembran alrededor de 200 μ l de la suspensión celular en una caja de plástico nueva de 100 mm x 20 mm (Corning Industries) con 10 mL de medio. En el caso de las cajas pequeñas para registro electrofisiológico de 35 mm x 10 mm, se colocan alrededor de 10 vidrios esterilizados, los cuales son cortados al tamaño de un cubreobjetos, y se siembran de 50 a 100 μ L de la suspensión celular en 2 ml de medio según el porcentaje de confluencia de las células.

Las cajas son incubadas a 37°C con 5.2% de CO₂ (Forma Scientific Inc) hasta que se emplean en el registro electrofisiológico.

II. Transfección

Un día después del pase de células se lleva a cabo una cotransfección de TRPV1 WT (de rata) en el plásmido pcDNA3 y la proteína verde fluorescente (GFP) en el plásmido EGFP-N1. Para ello se realiza una mezcla con 800 ng-1 μ g de TRPV1, 600-800 ng de eGFP y 100 μ l de NaCl. En otro tubo Eppendorf, se emplea como agente de transfección JetPei (PolyPlus), por lo que se agregan 4 μ l del mismo más 100 μ l de NaCl; y finalmente, se agrega la mezcla del tubo con JetPei al tubo con TRPV1. Dicha mezcla se deja incubar por 30 min, después de los cuales se agrega a la caja pequeña que contiene las células HEK 293 para registro electrofisiológico, una vez que se ha cambiado el medio de ésta.

Aproximadamente, de 24 a 48 horas después se toma uno de los vidrios de la caja pequeña transfectada, se monta sobre la cámara de registro electrofisiológico, y mediante un microscopio de epifluorescencia se observa si las células fluorescen, aquellas que emiten

luz verde expresan GFP y muy probablemente también TRPV1, por lo que son las células que se usan para la fijación de voltaje en microáreas de membrana.

III. Soluciones

Solución o baño de registro. Contiene 130 mM de NaCl, 10 mM de HEPES (amortiguador de pH), 5 mM de EGTA y 5 mM de KCl, ajustada a un pH de 7.2 con NaOH.

Solución de registro con ATP. A la solución de registro antes mencionada se le agregó 10 mM de ATP y se ajustó el pH a 7.2.

Solución de registro a pH 9. La solución de registro es ajustada a un pH de 9 con NaOH.

Capsaicina. La solución con capsaicina se preparó a una concentración de 4 μ M en solución de registro, a partir de una solución stock de capsaicina 4 mM en etanol.

Reactivos obtenidos de Sigma Aldrich.

Según la modalidad *inside-out* en *patch clamp*, la pipeta y el baño de registro son simétricos en cuanto a la solución de registro, y en el caso de los experimentos con ATP o a pH 9, sólo se agregó la solución de registro con ATP o a pH 9 en el baño de registro, la pipeta contenía el baño de registro sin ATP y a pH 7.2.

IV. Fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*)

Con el fin de registrar la corriente que fluye a través de un canal iónico al ser activado con cierto estímulo, se emplea la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch clamp*.

Se emplearon pipetas de borosilicato que fueron jaladas mediante un estirador (P-97 Sutter Instrument), con un filamento en forma de caja. Posteriormente, dichas pipetas fueron pulidas con calor, y su resistencia final fue aproximadamente de 3-7 M Ω .

Las pipetas fueron llenadas con solución de registro, que es igual a la del baño y se empleó un micromanipulador (Sutter Instrument) para controlar los movimientos de la pipeta.

Entonces, se usaron las configuraciones de *cell-attached* e *inside-out* para el registro electrofisiológico, con ésta última se tiene acceso al medio intracelular del canal (Fig. 25).

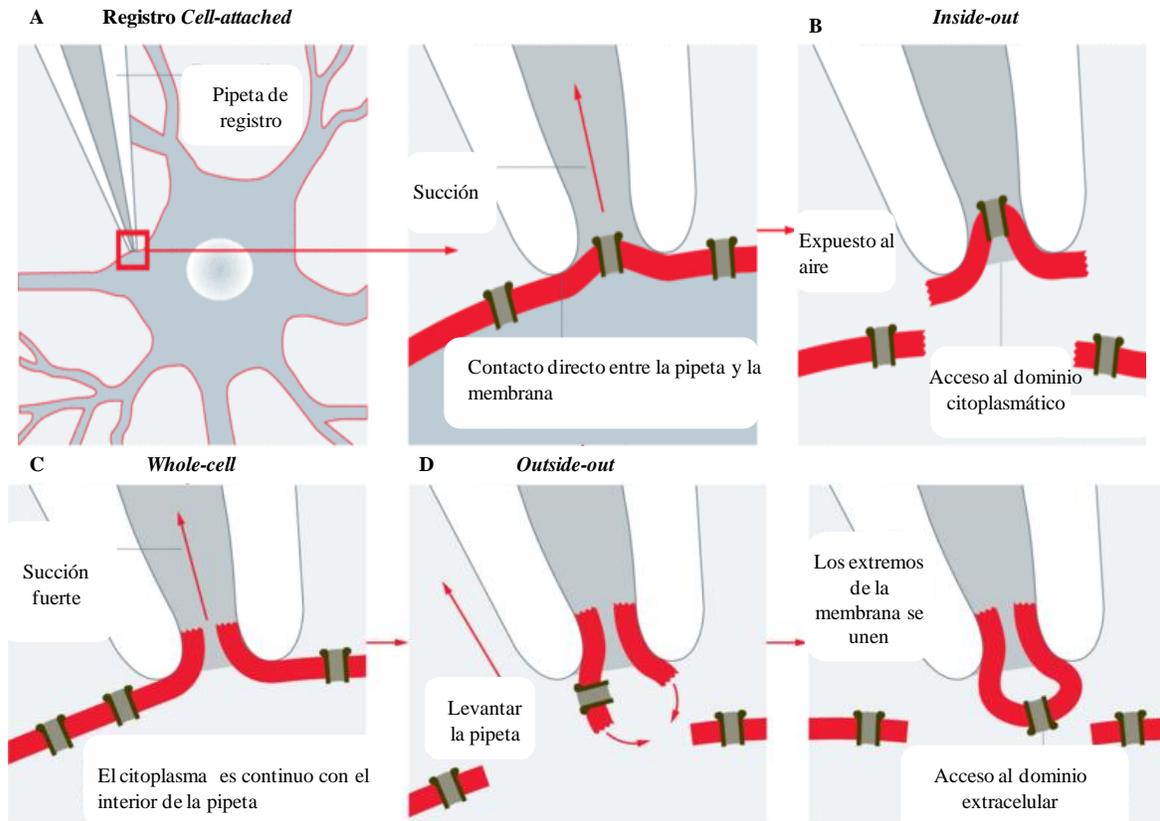


Fig. 25. Configuraciones de *patch clamp*. A) Se observa la pipeta en contacto con la membrana de la célula, forma un gigasello al aplicar succión en la misma, el cual aún está unido a la célula (*cell-attached*). B) Al separar la pipeta de la célula, ésta se lleva un pedazo de membrana, la cual puede contener uno o varios canales iónicos, se tiene así acceso a su dominio citoplásmico (*Inside-out*). C) A partir de la configuración *cell-attached*, se puede aplicar succión nuevamente y al romper el pedazo de membrana que formaba el gigasello, ahora se tiene acceso al citoplasma de la célula completa (*whole-cell*). D) En la configuración *whole-cell*, se puede levantar la pipeta y tomar un trozo de membrana cuyos extremos vuelven a unirse, y entonces se tiene acceso al dominio extracelular (*outside-out*). Modificado de Veitinger, 2011.

V. Microcalentador

Se había fabricado un microcalentador previamente en el laboratorio (Islas et al., 2015), cuyo principio de funcionamiento es el calor producido al administrar una corriente eléctrica por un cable conductor (calentamiento resistivo). El que se usó en esta tesis presenta algunas modificaciones. Consiste en un cable de cobre despojado del barniz que lo cubre haciendo pasar por él una corriente suministrada por una fuente de poder (Matrix model: MPS-3010L-1). Este alambre es colocado dentro de un capilar de borosilicato (el mismo que se usa para hacer pipetas de registro) y es jalado con el estirador (Sutter Instrument) hasta que el cable queda adherido al vidrio. Después, es doblado en el centro con calor aplicado mediante un soplete, de tal manera que se le da forma de horquilla (Fig. 26).

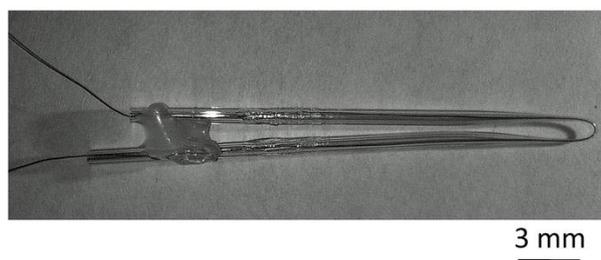


Fig. 26. Microcalentador en forma de horquilla

Posteriormente, se le agrega pegamento epóxico (Henkel) para que los dos brazos del calentador queden unidos; se soldan los extremos de alambre a dos terminaciones en forma de banana para que el calentador pueda ser conectado a una fuente de poder Agilent E3631A, sin olvidar colocar los tubos térmicos que cubren los alambres expuestos del calentador.

Para emplear el microcalentador en el registro electrofisiológico fue montado sobre un micromanipulador, de tal forma que se pudiera mover de manera precisa.

VI. Calibración de temperatura

La temperatura que alcanza el microcalentador varía en función del voltaje y corriente con que se programa a la fuente de poder (Agilent E3631A), el voltaje que se empleó fue siempre de 5 Volts (V) y con base en éste se regularon distintas corrientes. Para conocer dicha temperatura se efectuaron dos experimentos.

Primero, debido a que la resistencia de una pipeta abierta cambia según el cambio de temperatura (mientras la temperatura aumenta la resistencia disminuye), se trató de encontrar una función que relacionara ambos parámetros. Para ello, se colocó una cámara de registro unida a un peltier, el cual fue controlado por una fuente (PTC npi) que le indicaba la temperatura que debería alcanzar (en este caso 50°C). La temperatura fue medida mediante un termistor (Warner Instruments), y la corriente por el electrodo de registro cubierto con una pipeta abierta.

Entonces, con el amplificador (Axopatch 200B, Axon Instruments) en el programa PatchMaster (HEKA Elektronik) el canal uno registró la corriente y el dos la temperatura, se empleó un protocolo con tres pulsos cuadrados de 10 mV separados por uno de 0 mV y se obtuvieron las dos curvas: corriente y temperatura. Mediante la ley de Ohm se obtuvo el cambio en la resistencia a partir de la corriente y el voltaje ($V=RI$ luego entonces $R=V/I$) y se relacionó con el cambio en la temperatura. Además, se realizó un ajuste a un polinomio de tres términos con ambos ejes, y se obtuvo una ecuación que relaciona la resistencia con la temperatura (Fig. 27).

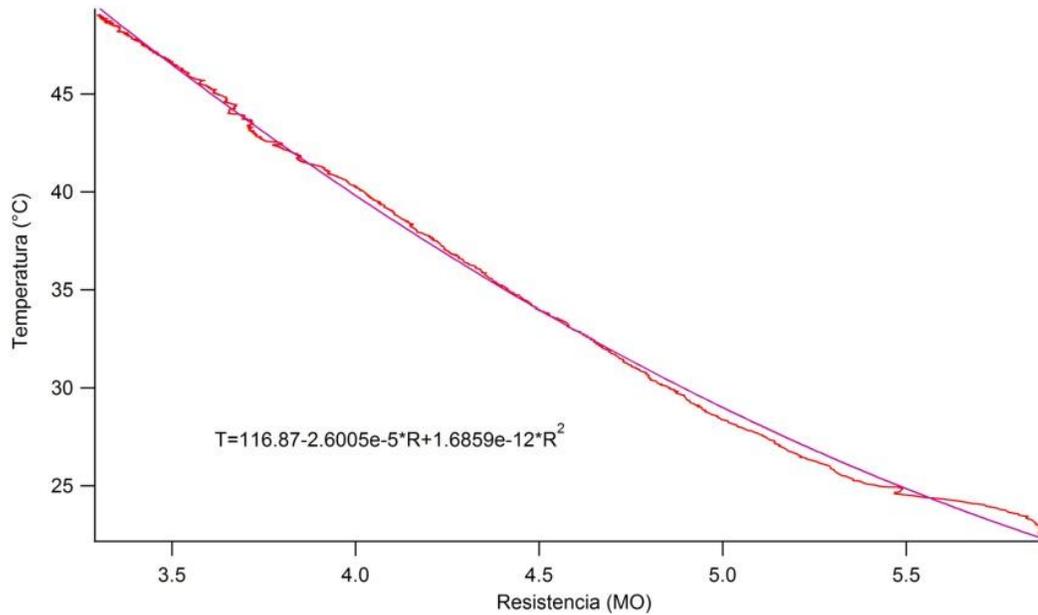


Fig. 27. Relación entre la temperatura y la resistencia de una pipeta abierta (línea roja), así como el ajuste a un polinomio de tres términos que da lugar a una ecuación que relaciona ambos parámetros (línea morada).

El segundo experimento consistió en colocar una pipeta abierta a cierta distancia del microcalentador, administrarle cierta corriente al microcalentador programada en la fuente de poder, entonces la corriente que detecta el electrodo en la pipeta abierta es registrada con PatchMaster, convertida a resistencia por la ley de Ohm y finalmente a temperatura con la ecuación obtenida en el ajuste (Fig. 27). Es importante tomar en cuenta la temperatura del baño de registro al realizar el ajuste. Así, se pueden programar diversas corrientes en la fuente de poder y se calcula la temperatura a la que equivalen.

VII. Activación por temperatura

Antes de iniciar el registro electrofisiológico se calibra la temperatura que alcanza el microcalentador según la corriente que se programa. Una vez que se tiene el parche en configuración *inside-out*, éste se coloca a una distancia aproximada de 27.58 μm del microcalentador (Fig. 28) y se procede a dar los pulsos de temperatura.

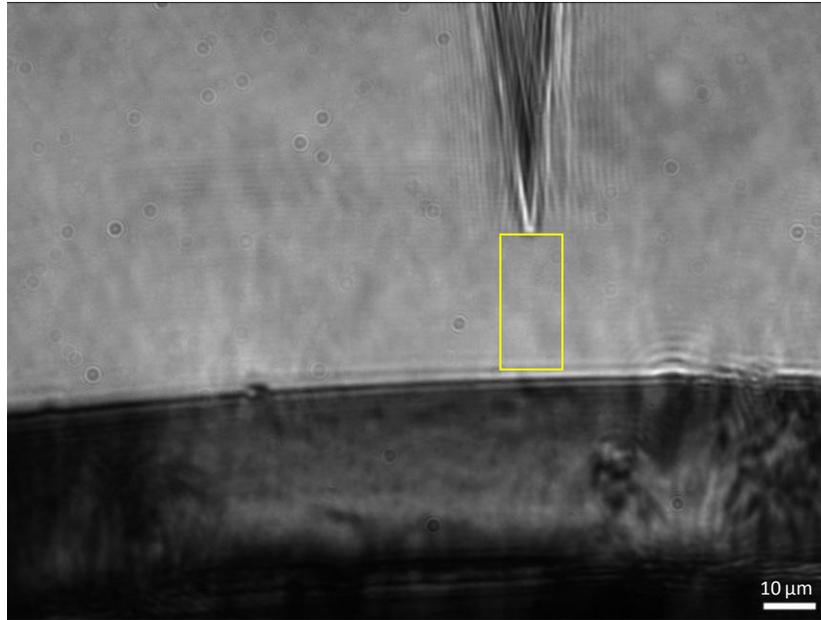


Fig. 28. Imagen obtenida con la cámara Micromanager 1.3 (Scion Corporation), muestra al microcalentador (debajo) y la pipeta (arriba) separados a una distancia aproximada de $27.58 \mu\text{m}$ con el objetivo de 40X (recuadro amarillo o ROI, realizado con el programa Image J).

Para aplicar los pulsos de temperatura se empleó un microcontrolador Arduino Uno, el cual controla la ejecución de la fuente de poder que administra corriente al microcalentador. Dicho microcontrolador tiene dos puntas, una que va a tierra y otra a la punta digital 7. A su vez es controlado por el programa Spider (programado con Python 2.7), con el cual se programó una rampa simétrica llamada *tooth*, en ésta la fuente de poder aplica 20 pulsos consecutivos progresivos desde 0 Amperes (A) hasta la corriente deseada espaciados por 0.09 s, esto es: 0, 0.5, 1 y así sucesivamente hasta la corriente que se requiera; la rampa simétrica dura 2 s de subida y 2 s de bajada (desde la corriente requerida hasta 0 A, mismo proceso).

Al mismo tiempo, el Arduino está acoplado con PatchMaster. PatchMaster representa la corriente registrada por el amplificador mediante un osciloscopio. En los pulsos de temperatura se utilizó un protocolo tipo *continuous* que consiste en un pulso continuo de 60 mV (en la calibración es de 10 mV por la saturación del amplificador) durante 11.3 s. Por el canal 1 se registra la corriente y por el dos se controla el acoplamiento entre PatchMaster y Arduino, de tal manera que en el segundo 2 del *continuous* se enciende la fuente de poder, se ejecuta la rampa simétrica, y se apaga en el segundo 6.

VIII. Perfusión de solución fría

En el experimento de enfriar el baño de registro se empleó un sistema de perfusión conectado a la cámara de registro. Para enfriar la solución, el frasco que la contenía fue sumergido en hielo, al cual se le agregó NaCl para bajar el punto de fusión del agua, y se

trató de acelerar el suministro de la perfusión colocando presión a través de una jeringa de 60 ml; al mismo tiempo, se colocó una manguera de succión en la cámara para evitar fugas. La temperatura que alcanzó la solución fue medida con el termistor.

IX. Activación con capsaicina

Se empleó un sistema de tubos montados en un motor de pasos, el tubo que perfundía la solución con capsaicina se colocó frente a la pipeta con el sello en configuración *inside-out*, se activó un protocolo en PatchMaster tipo *continuos* con dos pulso cuadrados, uno a +60 mV y otro a -60 mV para registrar la corriente basal, y posteriormente la pipeta se introdujo en el tubo con capsaicina, se abrió la llave de paso de la perfusión y se registró el cambio en la corriente.

X. Análisis de datos

El análisis de los datos se realizó en los programas Igor Pro 6.37 y Microsoft Office Excel 2007.

Resultados

I. Identificación de la inactivación por temperatura de TRPV1

Uno de los primeros protocolos que se emplearon para activar a TRPV1 por calor mediante el microcalentador fue un secuencia de pulsos, es decir, se programaba una serie de pulsos de intensidad progresiva en la corriente de la fuente de poder, desde la temperatura del baño de registro, 23°C (0 A) hasta 48°C (4 A), donde después de cada pulso se regresaba a 23°C (0 A). De esta forma, la respuesta del canal comenzaba con poca corriente en los primeros pulsos, y dicha corriente aumentaba conforme la temperatura alcanzada en cada pulso aumentaba (fig 26).

No obstante, en el último pulso, donde se alcanzaba la temperatura máxima de los pulsos, la corriente obtenida del canal disminuía con respecto al penúltimo pulso (Fig. 29), este comportamiento se observó en cinco experimentos.

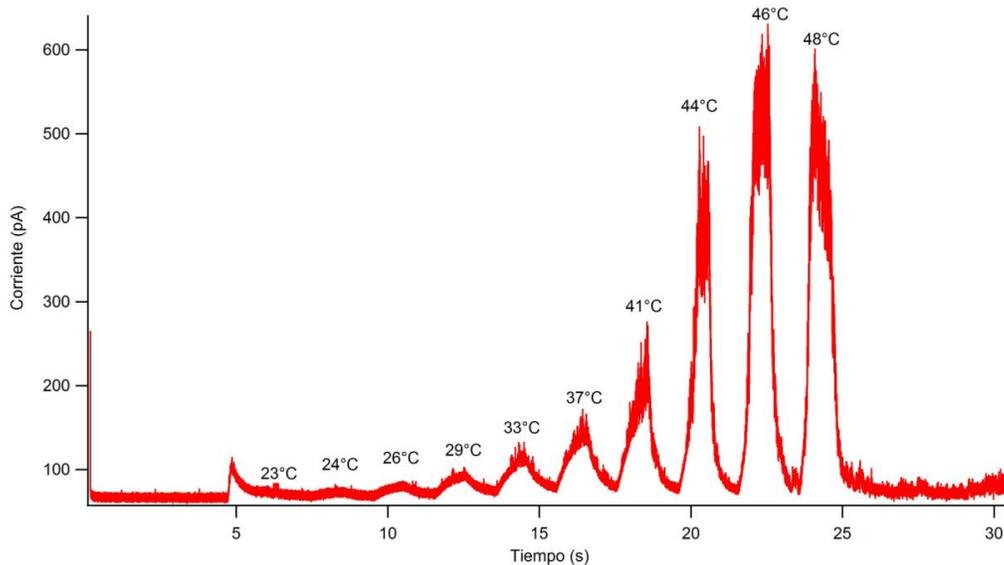


Fig. 29. Primera observación de la inactivación de TRPV1 por temperatura. Corriente obtenida a través de los canales TRPV1 al aplicar un secuencia de pulsos progresivos en cuanto a la intensidad de la corriente (desde 0 A hasta 4 A) y por ende temperatura (desde 23°C hasta 48°C), corresponde a un parche de célula HEK 293 en configuración *inside-out* que fue estimulado a +60 mV.

II. Caracterización de la inactivación por rampas simétricas

Lo anterior sugería un fenómeno de inactivación posterior a la activación de TRPV1 por temperatura, así que se empleó un protocolo específico para caracterizar dicha inactivación. A partir de una rampa simétrica de 2 s de subida y 2 s de bajada, se mide la corriente iónica del canal en cada punto de tiempo según la temperatura aplicada (Fig. 30), y se estimula de manera repetitiva a TRPV1 (dependencia del uso) mediante una serie de rampas simétricas consecutivas.

Cada 30 s se aplica una rampa idéntica a la primera, y se observa una disminución considerable de la corriente conforme se aplican las rampas (Fig. 30b). Esto se observó en 15 experimentos con diferentes células. Es importante mencionar que la inactivación parece ser distinta en cada parche, según el porcentaje de corriente que se obtiene con respecto a la primer rampa, que correspondería a la corriente máxima.

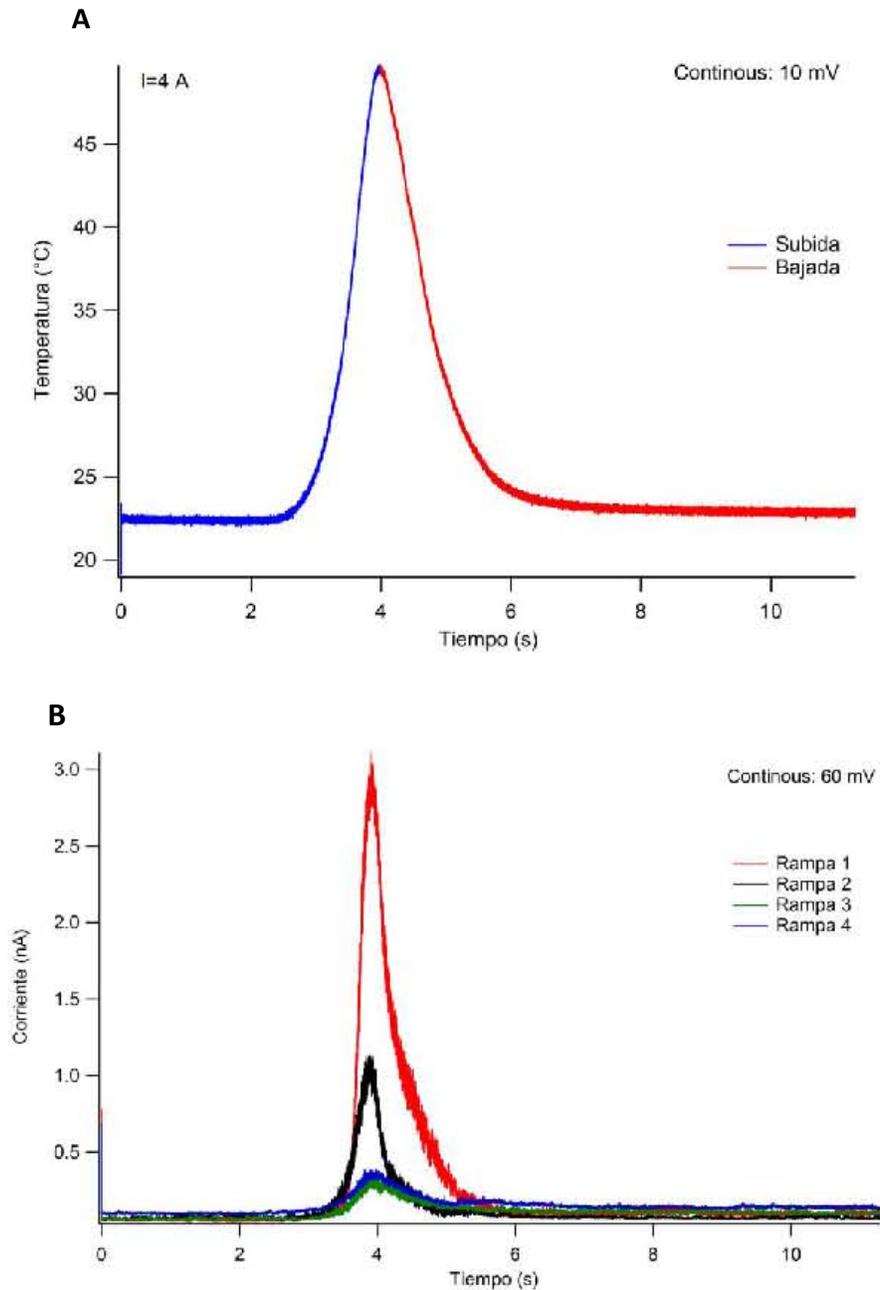
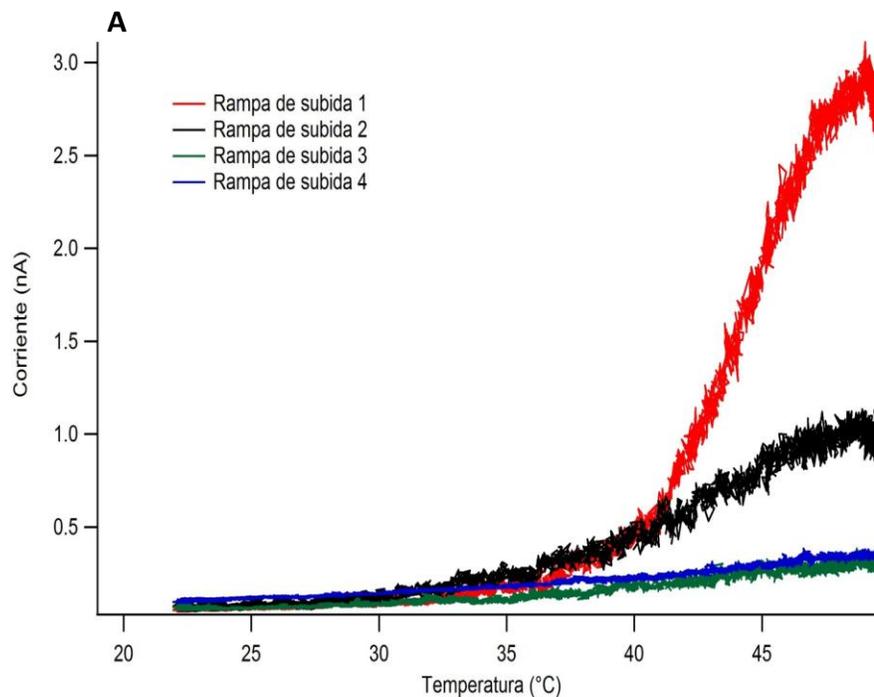


Fig. 30. Inactivación por temperatura de TRPV1 al aplicar rampas simétricas cada 30 s. A) Calibración típica de una rampa simétrica con 2 s de subida y 2 s de bajada en una pipeta abierta, se aplicó una corriente (I) de 4 A y la temperatura máxima es de 49.5°C, el pulso continuo es de 10 mV. B) Respuesta en corriente de

TRPV1 a las rampas de temperatura; la misma rampa con la que se calibró se aplica varias veces y cada una de ellas se aplica con 30 s de diferencia. Parche de célula HEK 293 en configuración *inside-out* a 60 mV.

Como parte del análisis de las rampas simétricas, se realizaron curvas corriente vs. temperatura, con este tipo de curvas se observa la temperatura a la que se empieza a activar TRPV1, su pendiente de activación, la forma de enfriamiento, entre otras características (Fig. 31a). A través de éstas, se puede notar que desde la primer rampa de temperatura se observa ya cierta inactivación, pues antes de que la rampa alcance la temperatura máxima, la corriente comienza a disminuir (Fig. 31a).

Cuando se traslapan las corrientes generadas durante las rampas de subida y bajada de temperatura, se observa que la curva de bajada (durante el enfriamiento) es distinta a la curva de la rampa de subida (Fig. 31b).



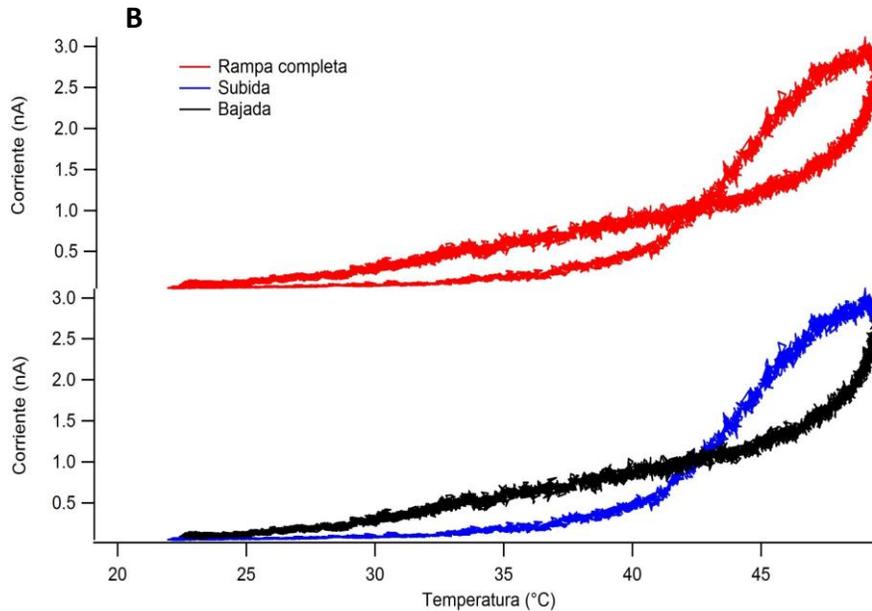


Fig. 31. Las curvas corriente vs. temperatura muestran características importantes de la inactivación de TRPV1 por temperatura. A) Curvas corriente vs. temperatura que muestran la corriente iónica en función de la temperatura aplicada en la rampa de subida. La rampa simétrica completa es cortada hacia la temperatura máxima de la calibración para obtener las rampas de subida y bajada. B) Curvas corriente vs. temperatura en las que se muestran la subida y bajada de la rampa simétrica, así como la rampa simétrica sin ser cortada (completa). Estas rampas fueron obtenidas a partir del análisis de las corrientes obtenidas en el parche de la figura 30.

Muy interesantemente, la pendiente de las curvas se modifica entre el primer pulso y los pulsos subsecuentes de las rampas de subida, lo cual se relaciona con las distintas temperaturas a las que el canal comienza a activarse en dichas rampas. Por ello, se realizó un cálculo de la entalpía y entropía asociadas a la activación de TRPV1 por temperatura.

A través de un modelo alostérico, se emplearon 7 parámetros para ajustar la ecuación obtenida en el modelo a la curva corriente vs. temperatura. Los parámetros incluyen: dos factores de escala que ajustan las corrientes máxima y mínima del parche con la probabilidad de apertura del canal, la constante L o constante de equilibrio intrínseca del gating del canal cuando es activado sin ningún estímulo (cuyo valor es fijado en 0.001), el parámetro C del acoplamiento entre la constante de equilibrio del sensado de la temperatura y la del gating del canal, que es fijado en 834.4 (sólo en la primer rampa, después se deja libre) según un cálculo anterior (Jara-Oseguera e Islas, 2013); la constante de equilibrio J de la activación del canal cuando es estimulado por temperatura, cuyo valor depende de la entalpía y entropía; la entalpía asociada al proceso a calcular, la entropía a calcular, y dos parámetros más que se refieren al estado inactivado del canal, pero como en este modelo no se toma en cuenta la inactivación, esos parámetros valen cero (Fig. 32).

Este modelo es el modelo alostérico más simple, puesto que no toma en cuenta la activación del sensor de voltaje del canal, es un modelo bidimensional de 4 estados (de los 8 estados que lo constituyen según la proposición de Latorre et al., 2007) (Fig. 32).

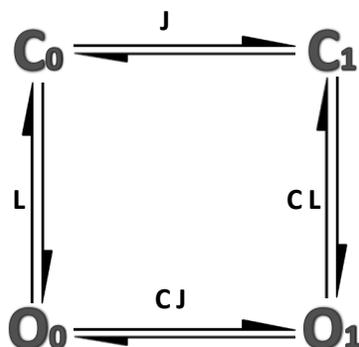
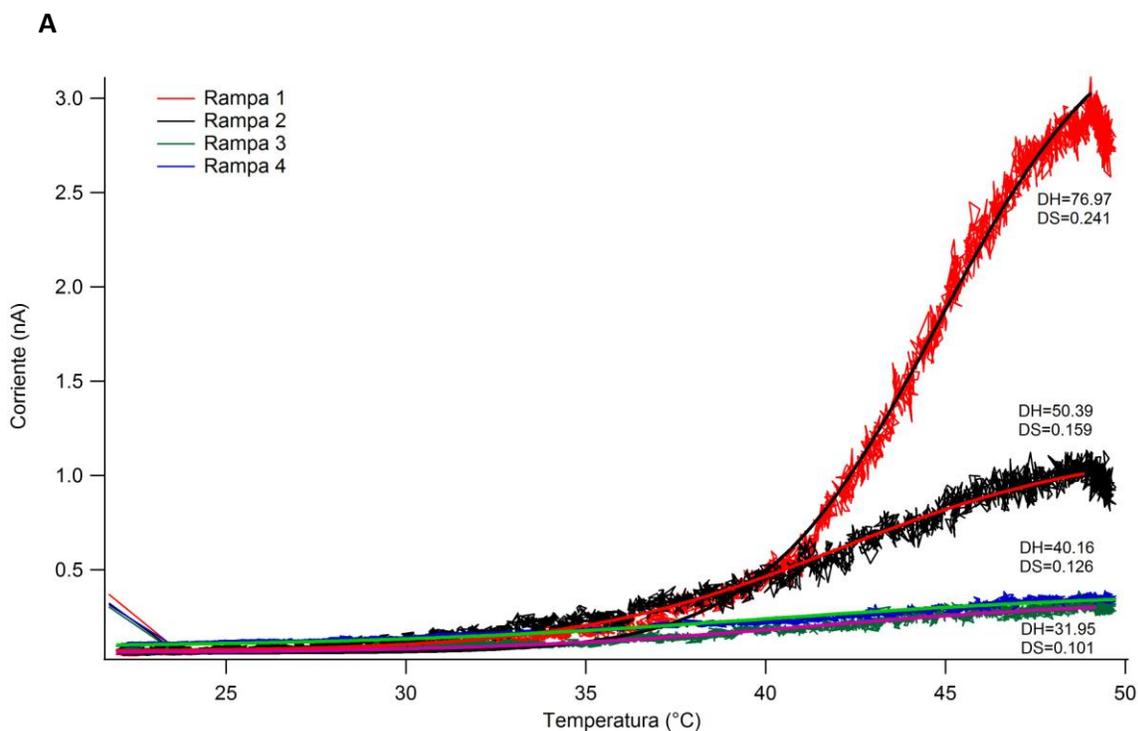


Fig. 32. Esquema del modelo alostérico de 4 estados empleado en el ajuste para calcular la entalpía y entropía de las rampas de subida.

Y se obtiene que ambos parámetros, entalpía y entropía disminuyen en las rampas subsecuentes con respecto a la primer rampa (Fig. 33a), lo cual se observó en prácticamente todos los experimentos en los que se realizó el ajuste (Fig. 33b). Además de que ambos parámetros se compensan, pues forman una línea recta, dando lugar así a una energía libre de Gibbs pequeña (Ecuación 2).



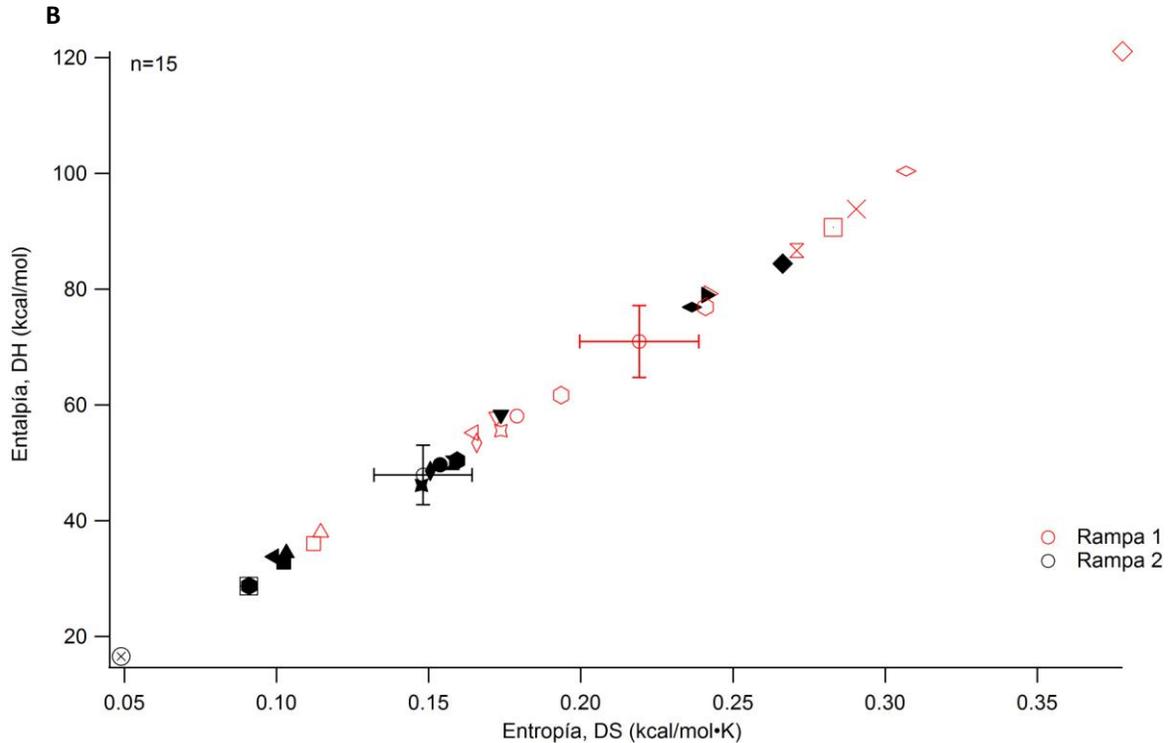


Fig. 33. La entalpía y entropía de las rampas subsecuentes con respecto a la primer rampa disminuyen en la inactivación de TRPV1 por temperatura. A) Parche representativo del ajuste del modelo alostérico (líneas) a las rampas de subida corriente vs. temperatura. B) Gráfica entalpía vs. entropía de 15 parches en los que se muestran los puntos de la primer rampa y la segunda, con la media y el error de todos los experimentos.

III. Dependencia de la inactivación en el tiempo entre los estímulos

Entonces, una vez que se observó dicha inactivación en varios parches, se probó la dependencia de la misma en el tiempo entre los estímulos.

Dado que aumentar el intervalo de tiempo entre la aplicación de los estímulos es una forma típica mediante la cual se recupera la corriente cuando existe inactivación (Hille, 1992), se aplicaba una primera rampa, luego se esperaba 3 minutos para dar una segunda rampa, y así sucesivamente hasta que el parche se rompiera (Fig. 34b).

Sin embargo, no se observó ningún cambio con respecto a la respuesta de TRPV1 cuando fue estimulado con rampas espaciadas a 30 s y 4 A de corriente (50°C) (Fig. 34a). Lo mismo se observó al aumentar aún más el intervalo de tiempo entre las rampas de temperatura a 5 minutos (Fig. 34c). De esta manera, se puede decir que la inactivación de TRPV1 por temperatura no depende del tiempo entre los estímulos (Fig. 34).

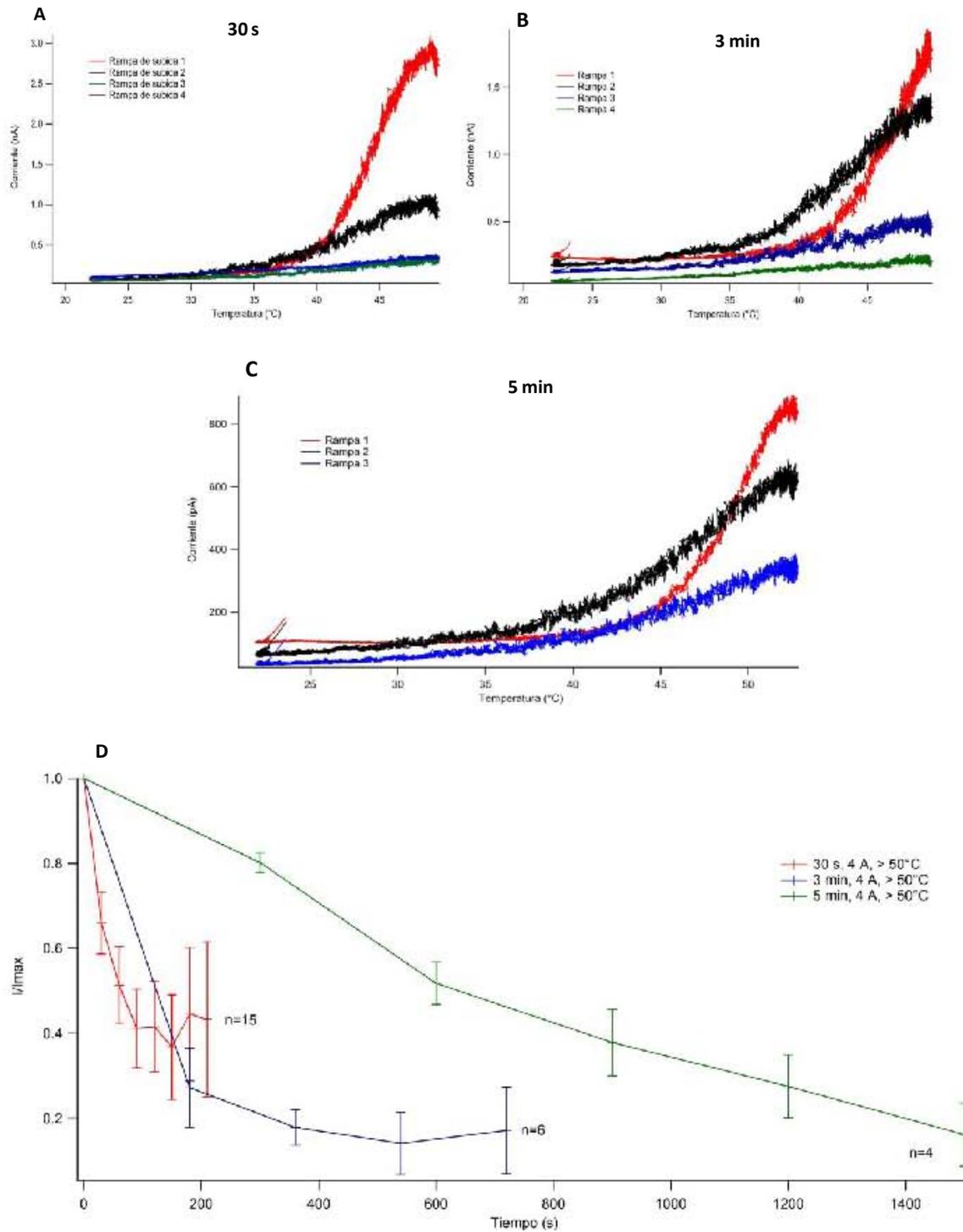


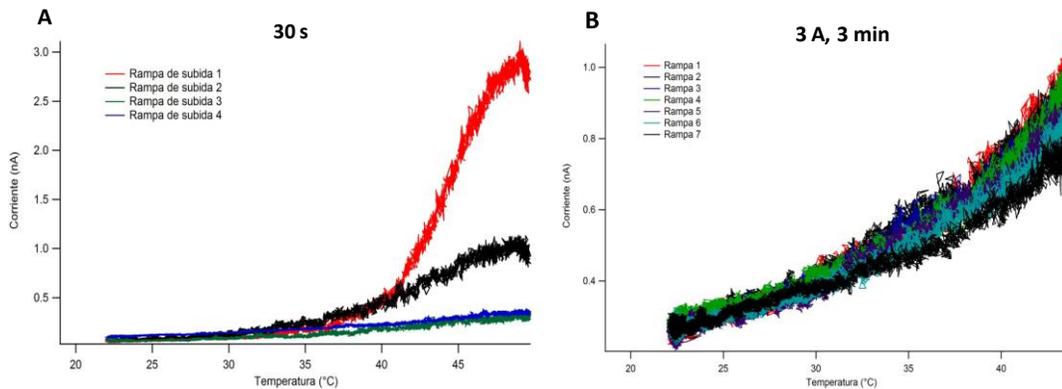
Fig. 34. La inactivación de TRPV1 por temperatura no depende del intervalo de tiempo entre los estímulos. A) Rampas de subida representativas espaciadas a 30 s. B) Rampas de subida representativas espaciadas a 3 min. C) Rampas representativas espaciadas a 5 min. D) Curva I/I_{max} vs. tiempo, I/I_{max} es un cociente de la corriente máxima obtenida en cada rampa, entre la corriente máxima obtenida en la primera rampa; cada punto representa un promedio de las I/I_{max} de las rampas obtenidas en cierta posición (2, 3,

4...) de la serie de experimentos, con su respectiva barra de error. A la corriente máxima se le resta el *leak* del parche o corriente de fuga.

IV. Dependencia de la inactivación en el pulso de temperatura

Por consiguiente, se probó la dependencia de la inactivación del pulso de temperatura a la que se estimulaba a TRPV1. Para ello, se disminuyó la corriente del pulso de temperatura suministrado a 3 A, por lo que la temperatura alcanzada fue menor, entre 41 y 43°C. Al aplicar rampas espaciadas por 3 minutos (dado que el tiempo no es un factor), se observó que la corriente no disminuye como en las rampas a 4 A de corriente, a más de 50°C (Fig. 35a), ya que la corriente apenas disminuye entre las rampas, e incluso puede aumentar, la pendiente de las curvas corriente vs. temperatura aparentemente no cambia, se requieren más pulsos para generar cierta inactivación, y por lo tanto las rampas se traslapan (Fig. 35b).

Si se comparan las curvas I/I max vs. tiempo de los pulsos espaciados a 30 s, 3 min, 5 min y con 3 A de corriente, se observa que las curvas de intervalo de tiempo no presentan gran cambio en la inactivación del canal, en cambio la curva con 3 A espaciada a 3 min presenta menos inactivación (Fig. 35c).



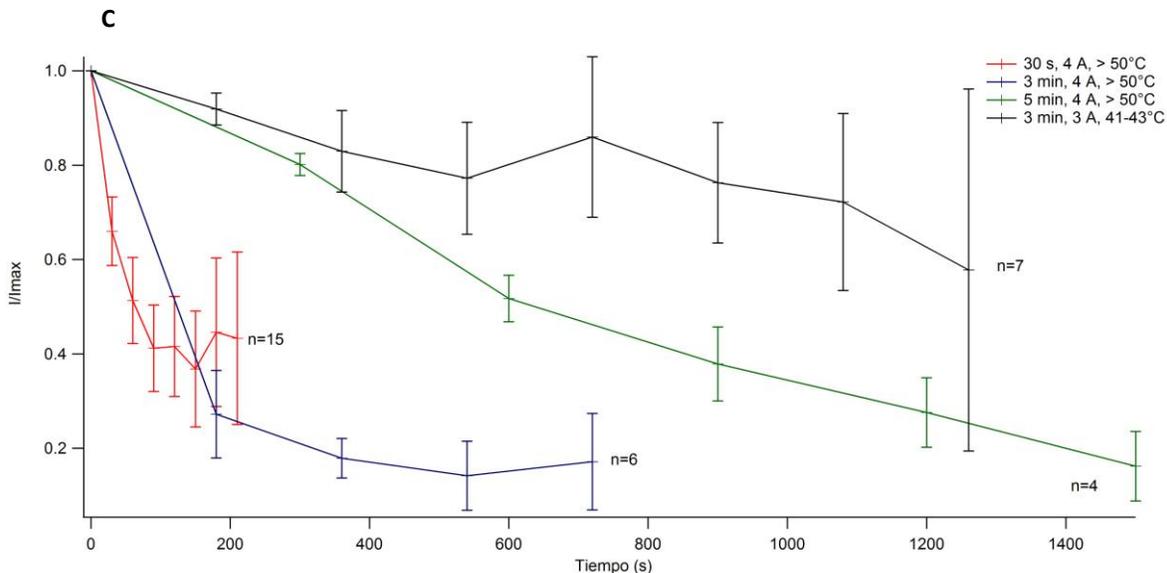


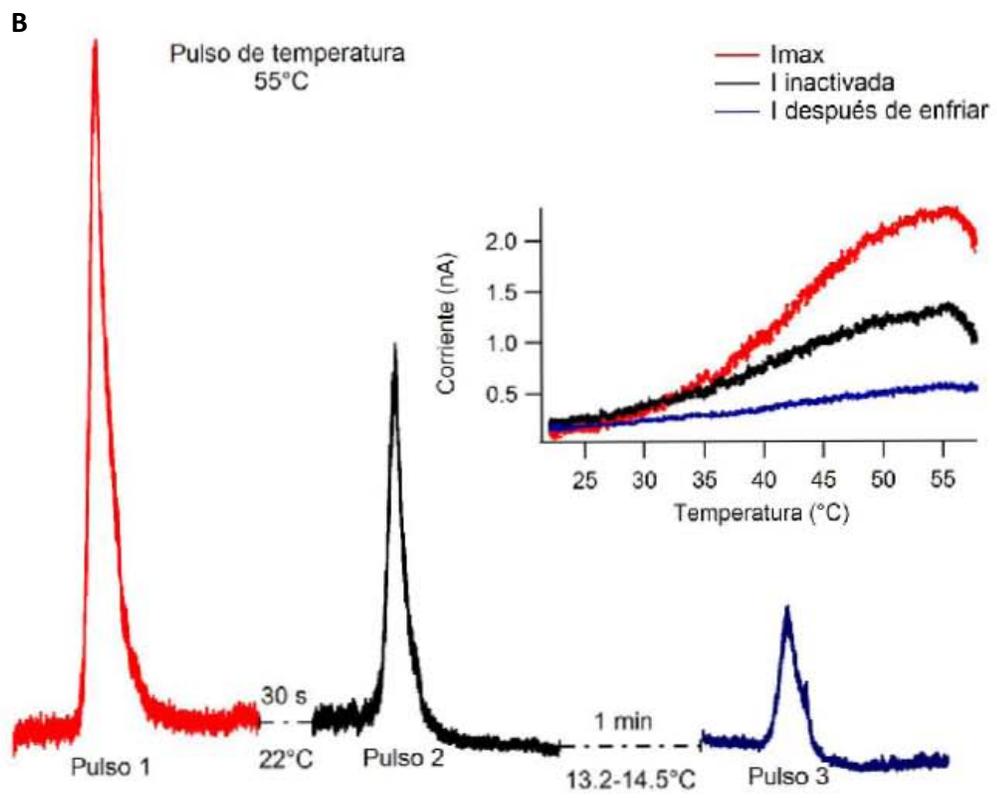
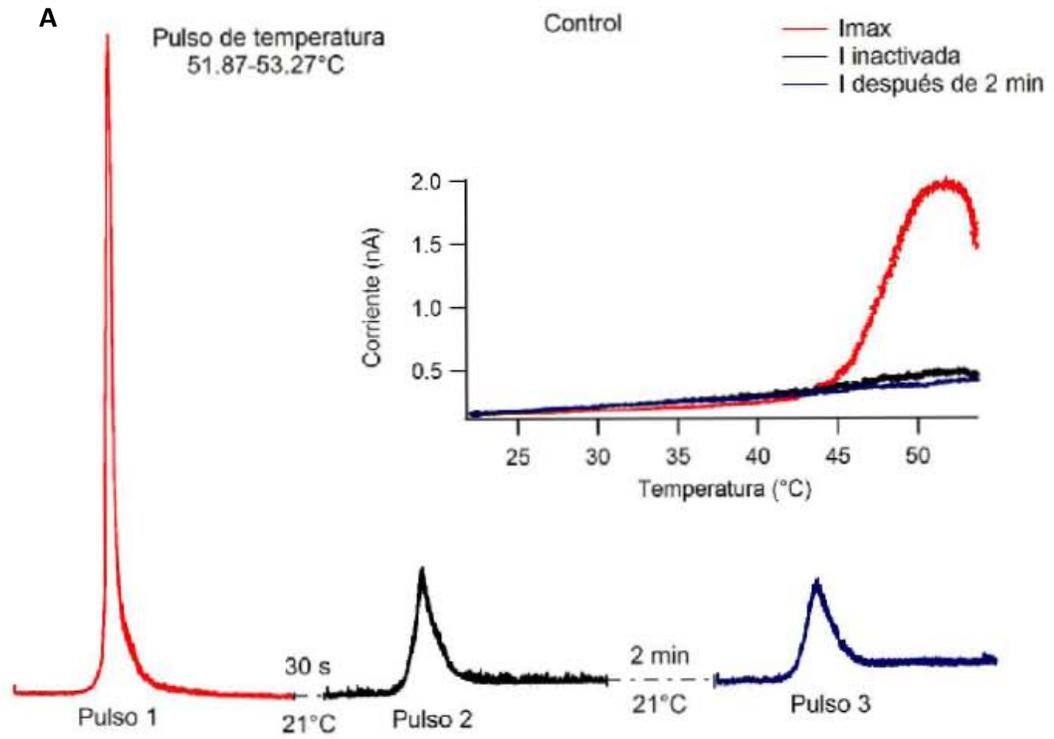
Fig. 35. La inactivación de TRPV1 por temperatura depende de la temperatura de estimulación. A) Rampas representativas espaciadas a 30 s con 4 A de corriente. B) Rampas representativas espaciadas a 3 min con 3 A de corriente. C) Curvas I/I_{max} vs tiempo de los distintos intervalos de tiempo y una corriente distinta.

V. Irreversibilidad de la inactivación por enfriamiento del baño de registro

Después de caracterizar la inactivación de TRPV1 por temperatura, se probó si es un fenómeno reversible, es decir, si la corriente se puede recuperar. Para ello se enfrió el baño de registro, pues éste es calentado por el microcalentador. El experimento consistió en aplicar una primera rampa simétrica a 4 A, desde la cual ya se observa cierta inactivación, luego aplicar una segunda rampa y comprobar la corriente que conserva TRPV1.

A través de un sistema de perfusión, se intercambió el baño de registro a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) por solución de registro fría, aproximadamente a 10°C, por un periodo de 1 min, tratando de mantener la temperatura fría en ese intervalo, la medición de la temperatura fue monitoreada por un termistor colocado en el baño de registro. Finalmente, se aplicaba una última rampa a temperatura ambiente nuevamente, y se obtuvo que la corriente no se recupera con respecto al control (Fig. 36b, 37a). El control consistió en realizar el mismo experimento, pero sin perfundir solución fría (Fig. 36a, 37a).

Incluso se intentó aumentar el tiempo de enfriamiento a 2 minutos, sin embargo tampoco se halló diferencia con respecto al control (Fig. 36c, 37b).



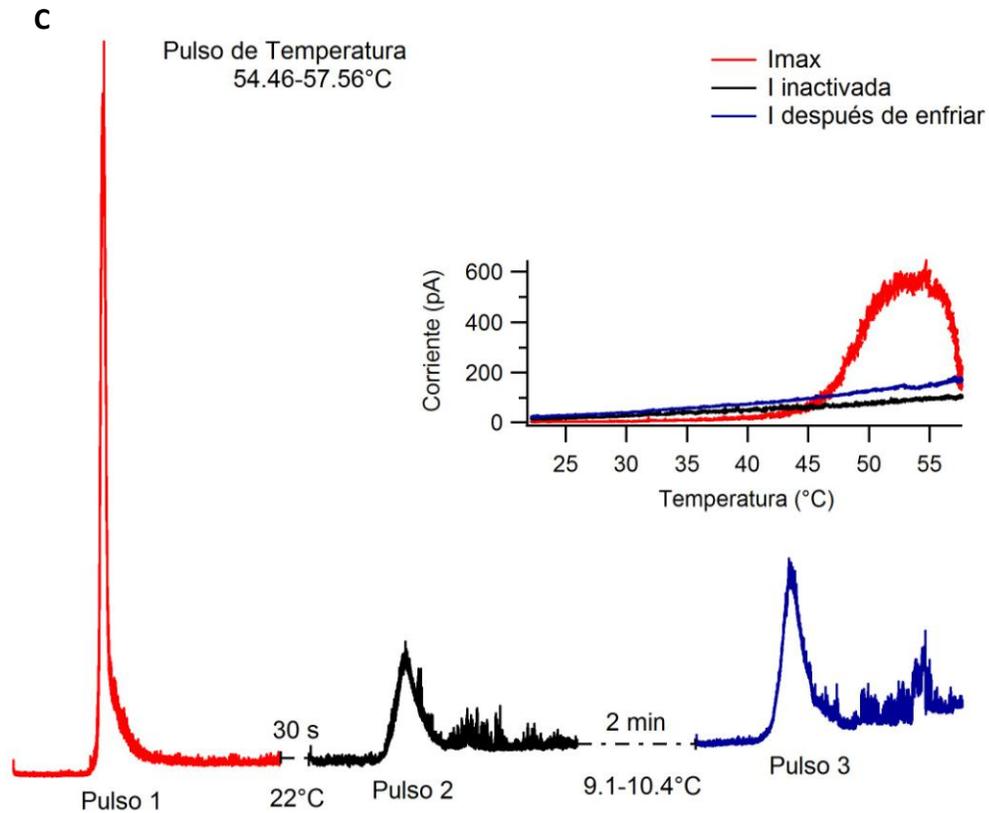


Fig. 36. El enfriamiento del baño de registro no revierte la inactivación de TRPV1 por temperatura. Gráficas representativas. A) Control. Se muestran las rampas de corriente, así como las curvas corriente vs. temperatura de subida de las mismas, sin perfundir solución fría, manteniendo a temperatura ambiente el baño de registro. B) Se observan las rampas de corriente y las curvas corriente vs. temperatura de subida, con perfusión de solución fría por 1 minuto. C) Se muestran las rampas de corriente y las curvas corriente vs. temperatura de subida, con perfusión de solución fría por 2 minutos. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con pulsos de 4 A de corriente.

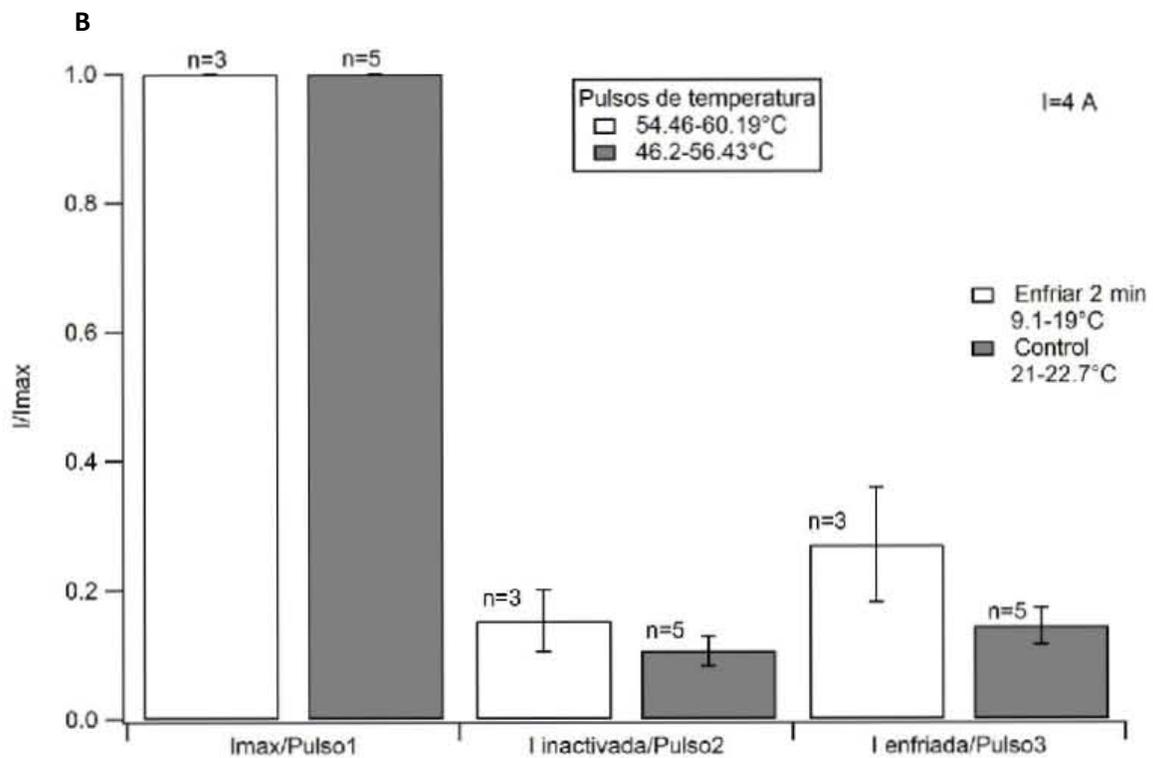
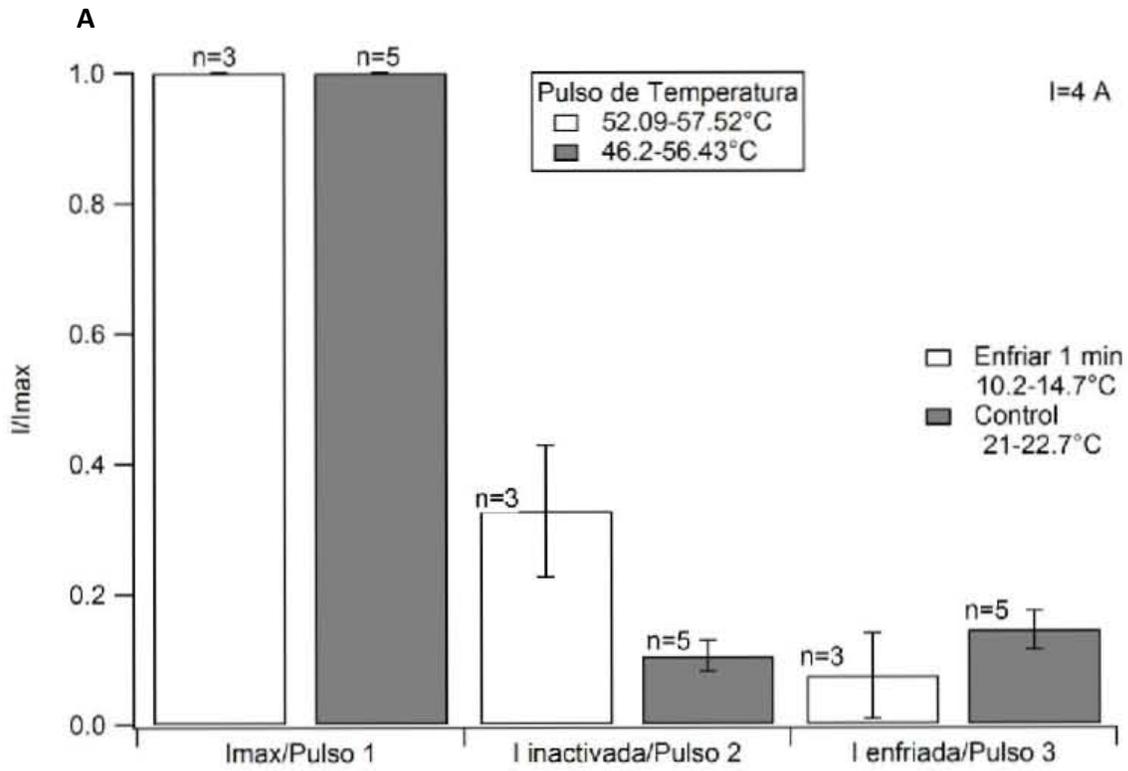
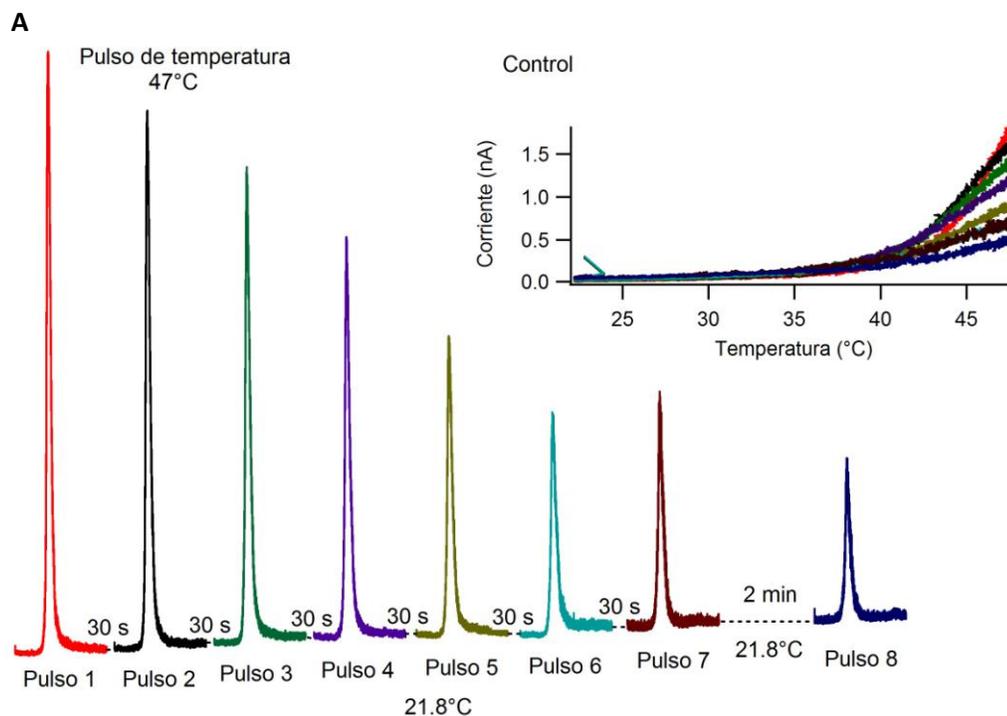


Fig. 37. El enfriamiento del baño de registro no revierte la inactivación de TRPV1 por temperatura. Promedio de los experimentos realizados. A) Promedio de los experimentos control y al enfriar durante un minuto. E) Promedio de los experimentos control y al enfriar durante 2 minutos.

Es importante mencionar que a pesar de que el pulso de 4A de corriente es el mismo en esta serie de experimentos, la temperatura varía entre los mismos, lo cual se debe a que la calibración cambia con respecto a días distintos, pues la temperatura ambiente se modifica y ello afecta el calentamiento del baño de registro por el microcalentador. Sin embargo, la temperatura se mantiene por arriba de 50°C. En cuanto a las modificaciones en la temperatura de enfriamiento entre la serie de experimentos, resultó complicado mantener una temperatura constante entre los mismos, puesto que la perfusión de solución fría no es tan rápido y se calienta en el proceso.

Continuando, si se considera que la inactivación decrece cuando se disminuye el pulso de temperatura, se trató de acortar el pulso de temperatura de 4 A (Fig. 36) a 3.5 A (Fig. 38b) y combinar dicha disminución con perfundir solución fría por 2 minutos; se esperaba que se recuperara la corriente; no obstante, aunque se requieren más pulsos de temperatura para inactivar (como en el pulso de 3 A en la Fig. 35b), después de enfriar, la corriente no se recupera, sino que sigue disminuyendo (Fig. 38b, 38c), igual que en el control (Fig. 38a, 38c), donde no hay perfusión de solución fría.



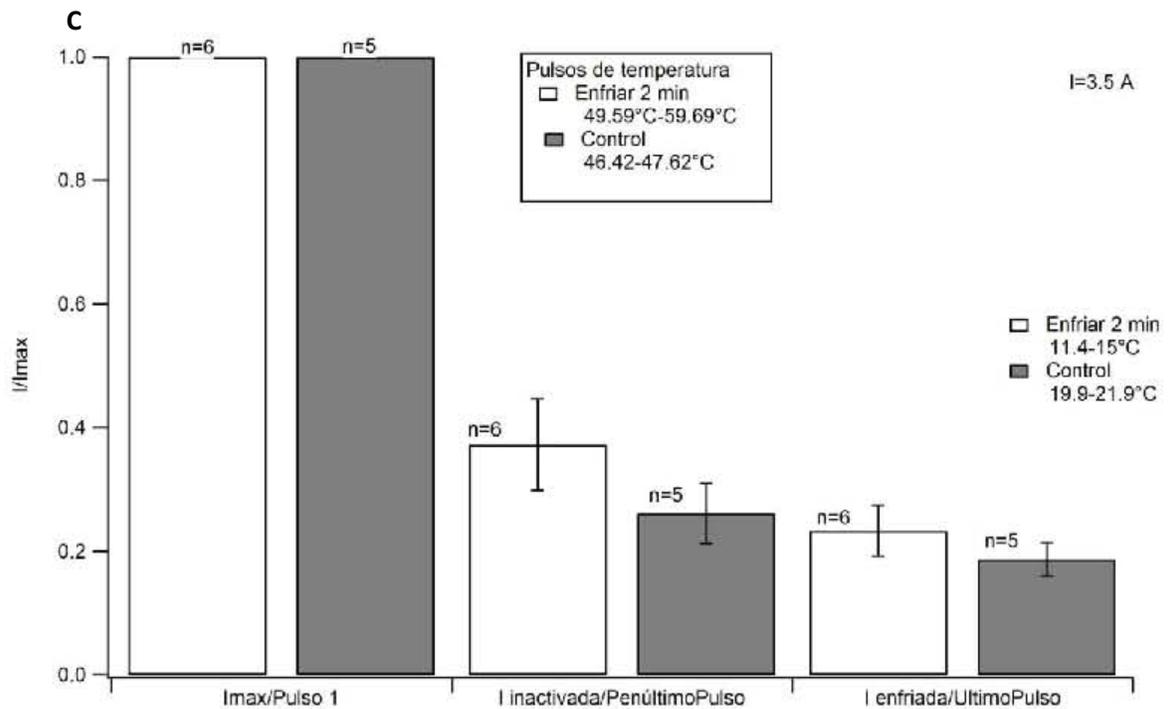
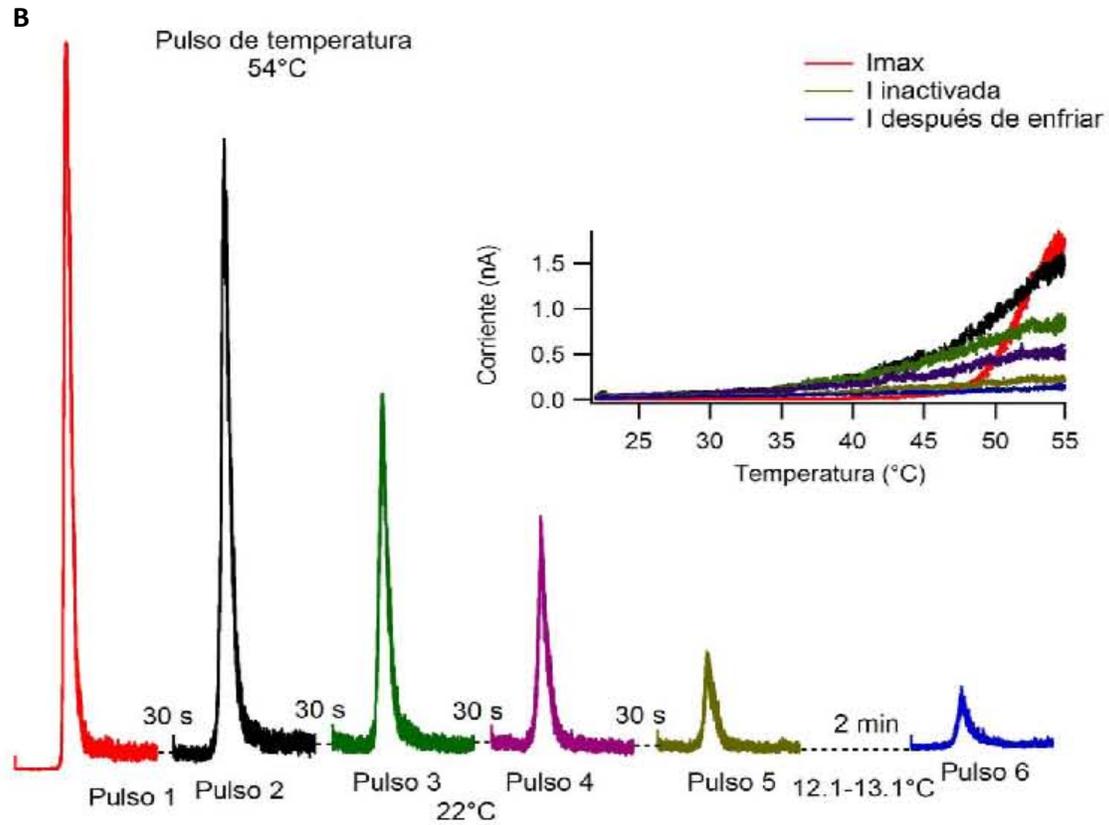
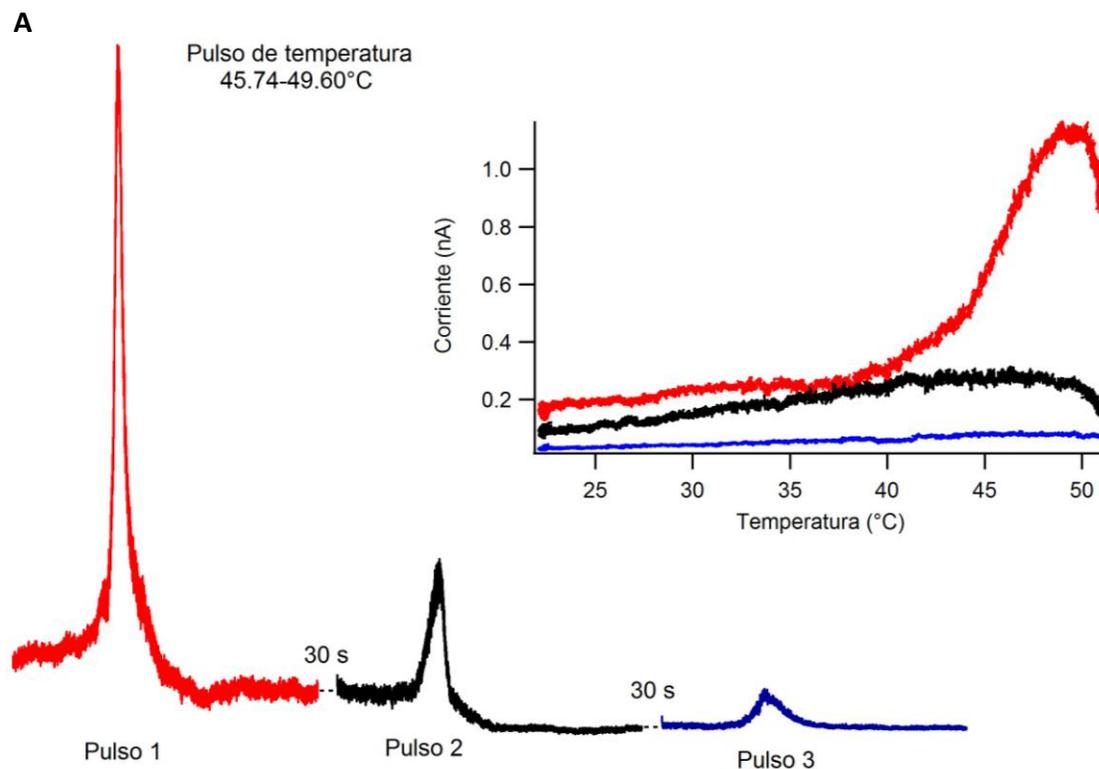


Fig. 38. La disminución del pulso de temperatura y el enfriamiento del baño de registro no remueven la inactivación de TRPV1 por temperatura. A) Control. Pulso de temperatura a 3.5 A, sin perfusión de solución fría, manteniendo la temperatura ambiente del baño de registro. B) Pulso de temperatura a 3.5 A y enfriamiento del baño de registro por 2 minutos. C) Promedio de los experimentos control y enfriamiento por 2 minutos a 3.5 A.

VI. Irreversibilidad de la inactivación al estimular con capsaicina

TRPV1 funciona como el receptor de capsaicina, un agonista que se une de forma específica al canal, por lo que se planteó la idea de que si el canal entra a un estado inactivado por temperatura, tal vez podría activarse nuevamente al estimular con capsaicina.

En ese sentido, primero se activa al canal con capsaicina (4 μ M, concentración saturante), un pulso que nos habla de la expresión y el *leak* o corriente de fuga del parche; luego se activa por temperatura, hasta que el canal haya quedado inactivado, y nuevamente se activa con capsaicina para conocer la respuesta del canal. Sin embargo, después de que la corriente se pierde por temperatura, el canal no se activa con capsaicina, pues sólo se obtiene una corriente muy pequeña parecida a la corriente de fuga del parche (Fig. 39) (la figura 39 es un experimento representativo, se realizaron 4 de ellos con resultados muy parecidos).



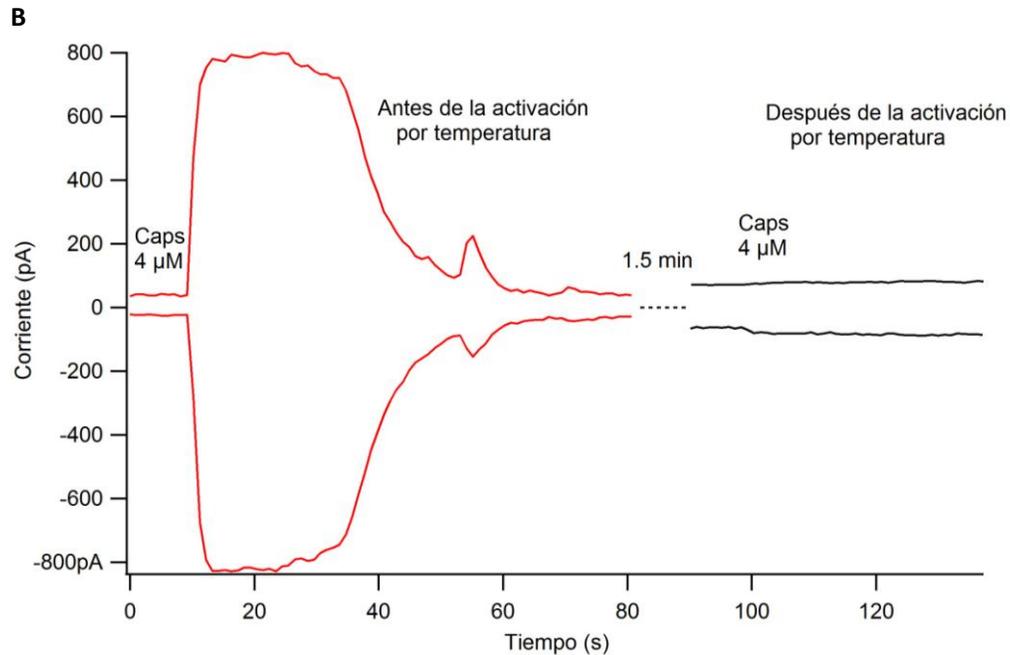


Fig. 39. La estimulación con capsaicina no logra activar a TRPV1 después de inactivar por temperatura. A) Se muestran las rampas de corriente al activar por temperatura, con sus respectivas curvas corriente vs. temperatura. B) Se muestran el primer pulso de capsaicina, y el segundo pulso después de activar por temperatura. Los pulsos de temperatura fueron dados a 4 A y la estimulación por capsaicina fue con un protocolo continuo, pulso a 60 mV y -60 mV.

Es interesante mencionar un experimento en el que mediante un pulso menor de temperatura, a 3.5 A (46°C), donde la inactivación es más lenta puesto que requiere más pulsos de temperatura para reducir la corriente, el último pulso de temperatura reporta cierta corriente, y luego cuando se vuelve a activar por capsaicina, esa corriente se mantiene (Fig. 40). Es como si se inactivara sólo una parte de la población de canales en el parche, y los que no se han inactivado pueden volver a activarse por capsaicina.

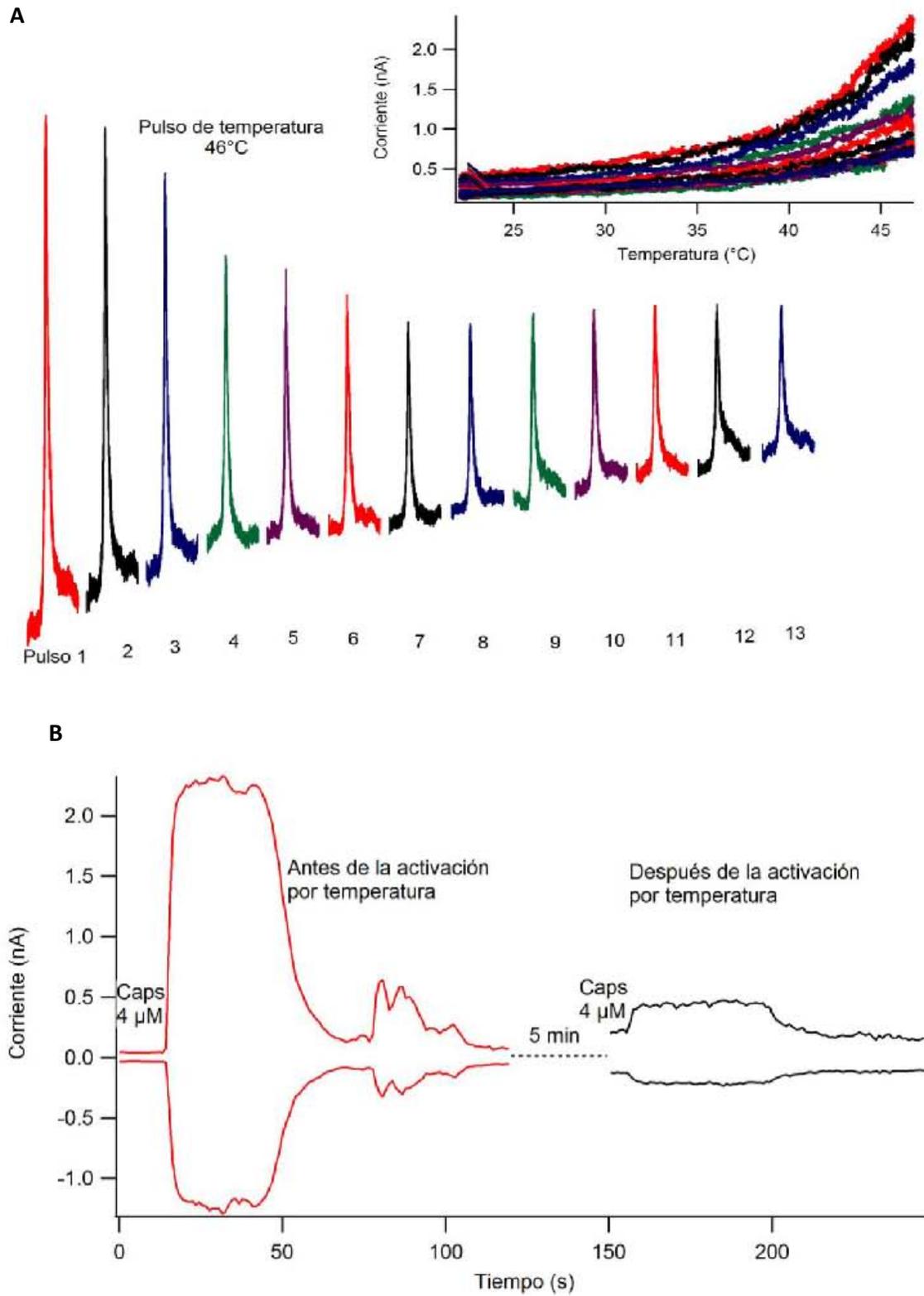


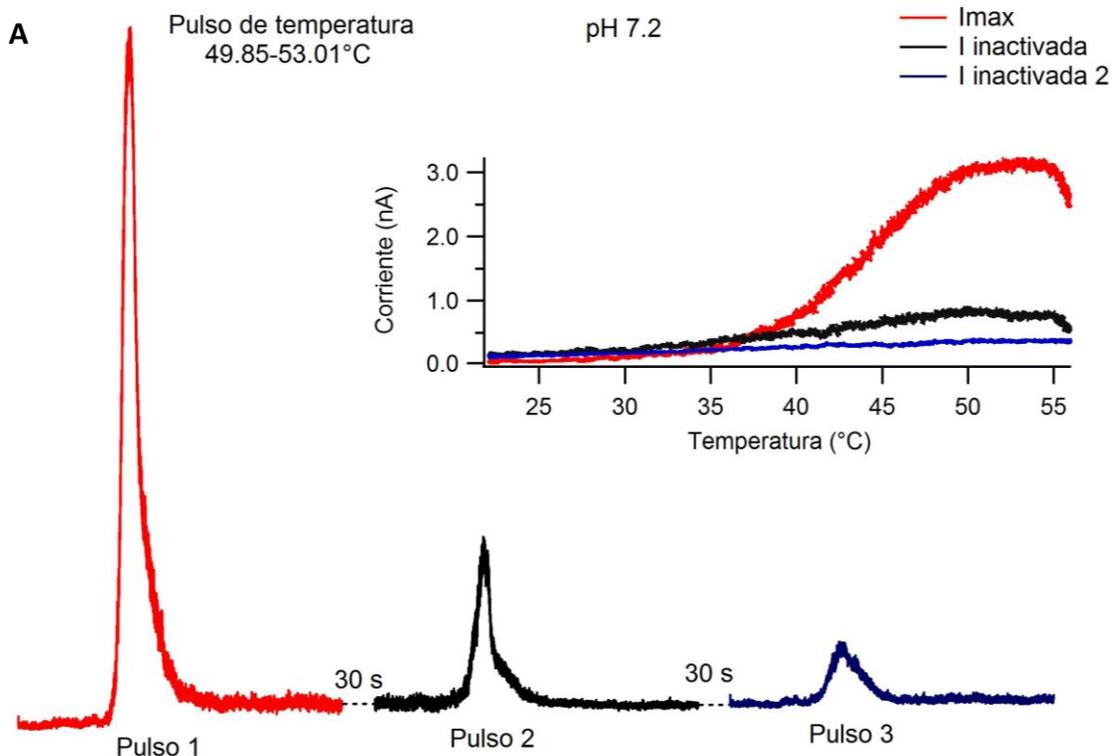
Fig. 40. Al inactivar con un pulso menor de temperatura la estimulación posterior con capsaicina retiene la corriente no inactivada. A) Se muestran los pulsos de temperatura con sus respectivas curvas

corriente vs. temperatura. B) Se muestran los pulsos de capsaicina. El pulso de temperatura fue a 3.5 A y el protocolo continuo de capsaicina a +60 mV y -60 mV.

VII. Estabilización del dominio de anquirinas

Habiendo caracterizado la inactivación de TRPV1 por temperatura, y además probado su irreversibilidad por los métodos antes mencionados, se sugirió un posible mecanismo de inactivación, el cual proviene directamente de la idea del dominio N terminal como sensor de temperatura. Se diría que el canal pasa al estado inactivado después de ser estimulado por pulsos consecutivos de temperatura, porque el N terminal, encargado de sensar la temperatura, se desnaturaliza, es decir, pierde su estructura tridimensional o terciaria y por tanto su función.

En ese sentido, el dominio de anquirinas, gran parte del N terminal, se estabiliza o su T_m (Temperatura de fusión por su denominación en inglés) aumenta, esto es, la temperatura media del rango de temperatura en que el dominio se desnaturaliza (Nelson & Cox, 2013) aumenta cuando el pH intracelular aumenta o en presencia de ATP (datos no publicados). De esta forma, se pensaría que la inactivación se reduciría o incluso se anularía con un pH alto intracelular o en presencia de ATP, por lo que se realizaron experimentos ajustando el pH del baño de registro a 9 (Fig. 41b, 41c); no obstante, las rampas de temperatura son muy similares a las rampas con pH de 7.2 (Fig. 41a, 41c).



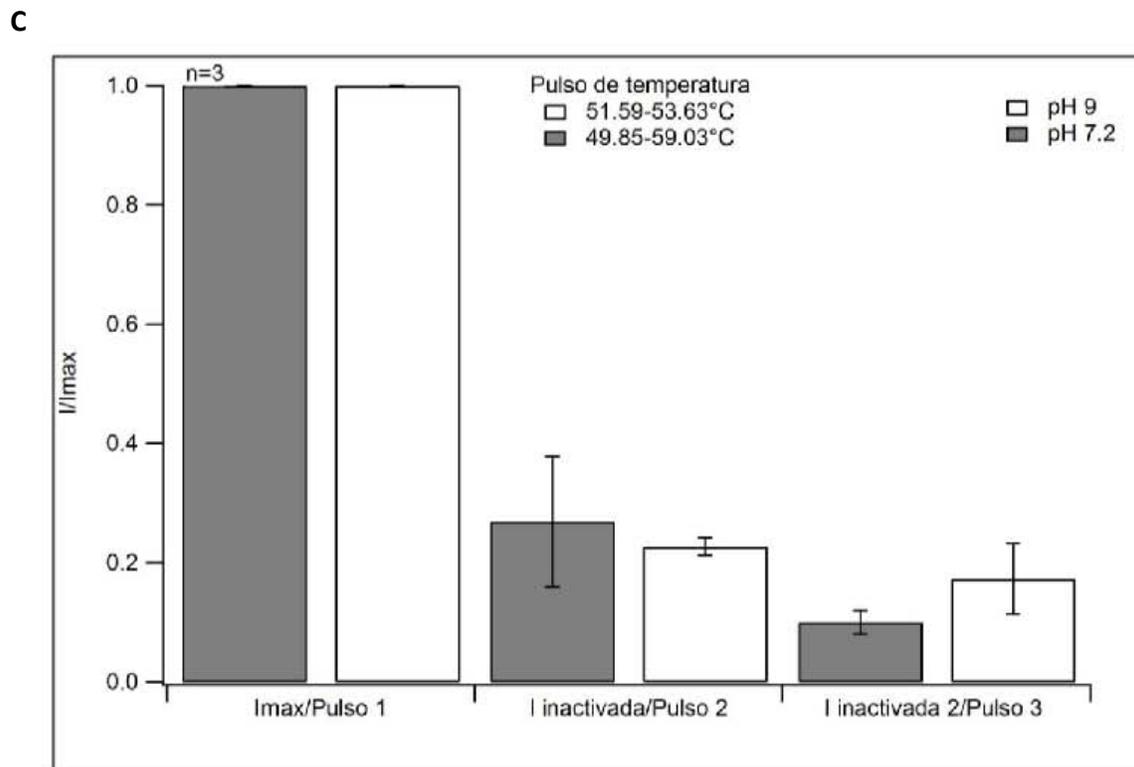
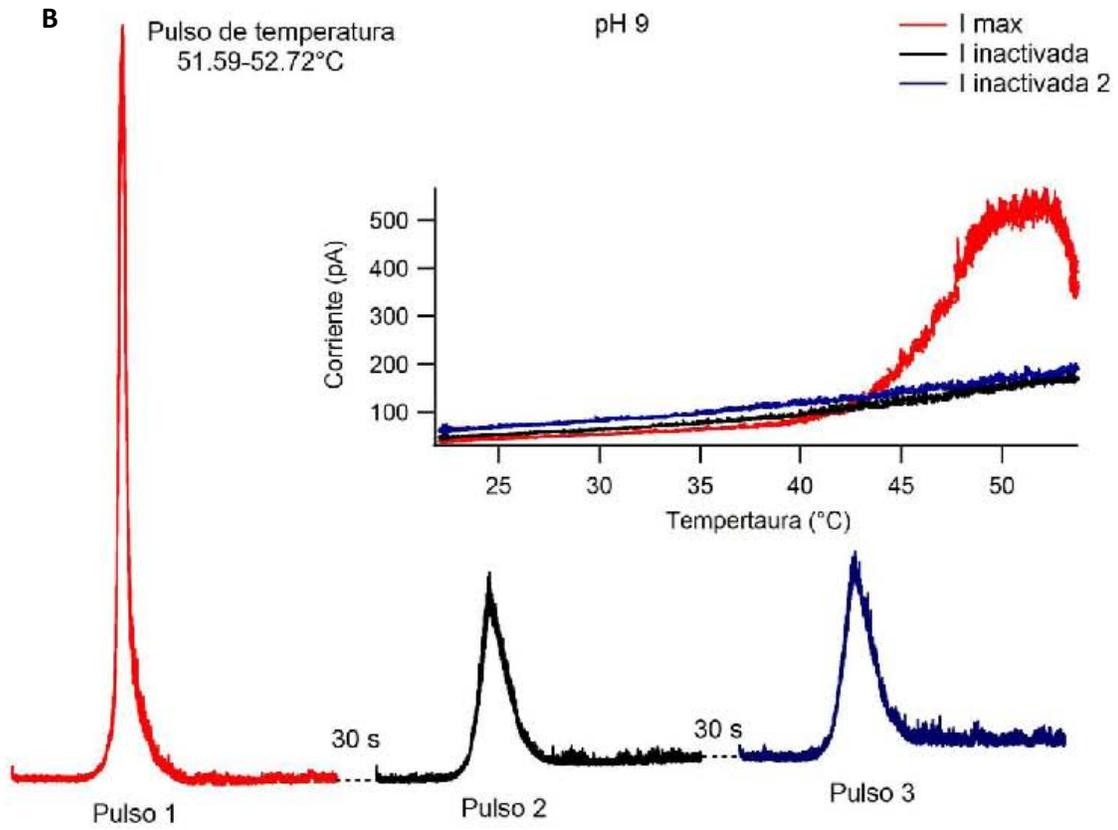
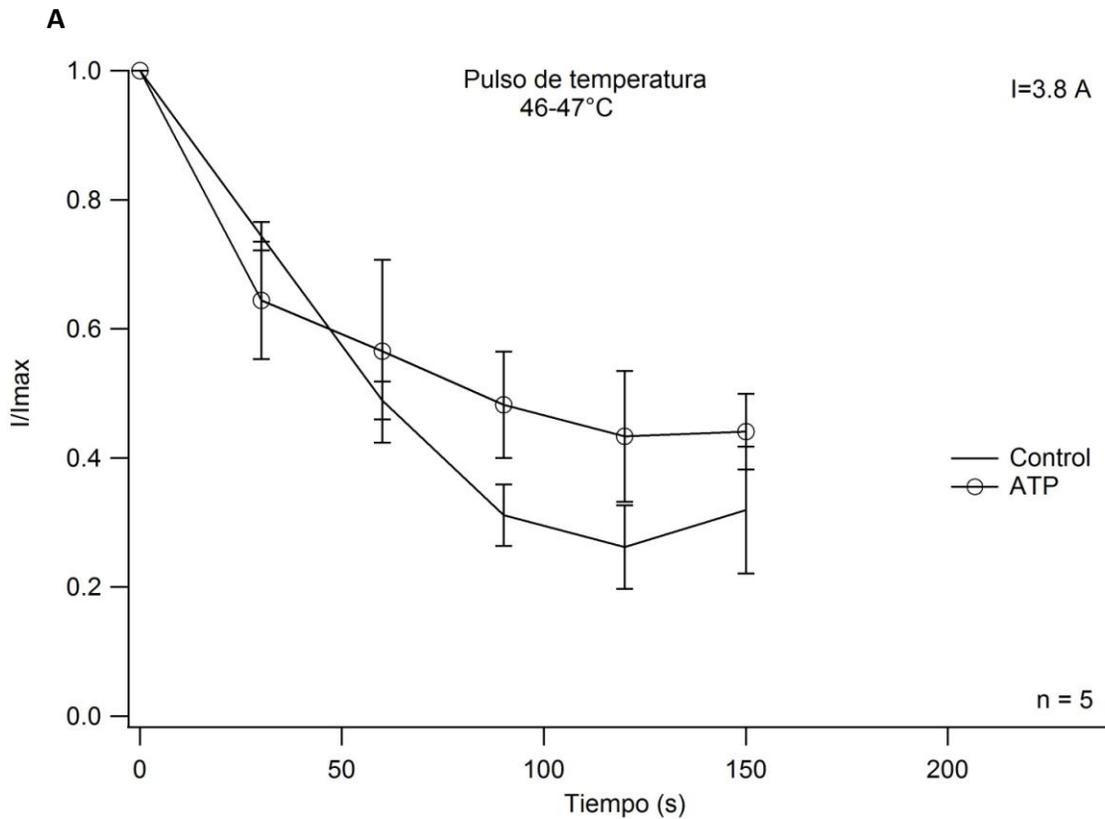


Fig. 41. Un pH de 9 en el baño de registro no revierte la inactivación de TRPV1 por temperatura. A) Rampas de corriente activada por temperatura y sus respectivas curvas corriente vs. temperatura a pH 7.2. B) Rampas de corriente activada por temperatura y sus respectivas curvas corriente vs. temperatura a pH 9. C) Promedio de los experimentos realizados a pH 9 y 7.2.

En el caso de los experimentos al agregar ATP al baño de registro (por ende cara intracelular del canal en la modalidad inside-out), tampoco muestran diferencias con respecto a experimentos llevados a cabo sin ATP (Fig. 42). Dichos experimentos se realizaron a dos temperaturas diferentes según las corrientes 3.8 A (Fig. 342a) y 4.2 A (Fig. 42b), donde la inactivación fue más ligera en el pulso de 3.8 A como ya se ha visto (Fig. 37a), pero muy parecida al control, sin ATP.



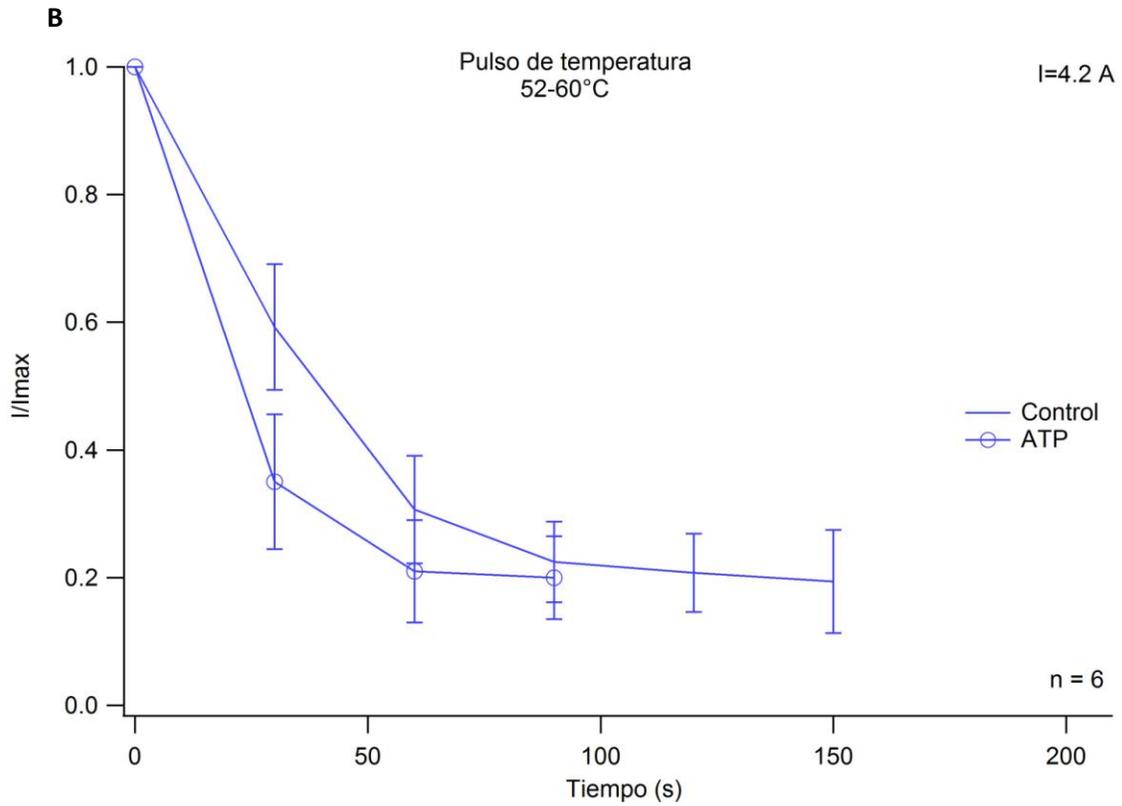


Fig. 42. La presencia de ATP intracelular no modifica la inactivación de TRPV1 por temperatura. A) Promedio de I/I_{max} vs tiempo de los experimentos sin ATP (control) y con ATP a 3.8 A. B) Promedio de I/I_{max} vs tiempo de los experimentos sin ATP (control) y con ATP a 4.2 A.

Discusión

Anteriormente, se había reportado en neuronas del Ganglio de la Raíz Dorsal (DRG) de diámetro pequeño, donde normalmente se expresa TRPV1 y cuyo umbral de activación es de aproximadamente 42°C, cierta inactivación o taquifilaxis en la corriente activada por temperatura (Vyklický et al., 1999; Schwarz et al., 2000). También, se había detectado en sistemas de expresión heteróloga cierta disminución en la corriente de TRPV1 cuando era activado con estimulaciones repetidas de temperatura (Tominaga et al., 1997; Caterina et al., 1999), así como en un ortólogo de TRPV1 en aves (Jordt & Julius, 2002), pero dicho fenómeno no se había caracterizado de forma particular.

Aquí, mediante la expresión heteróloga de TRPV1 en células HEK 293, su estimulación con temperatura a través de un microcalentador fabricado en el laboratorio, y el registro de corrientes del canal con *patch clamp* en configuración *inside-out* a +60 mV, se observó inactivación de TRPV1 al ser estimulado con rampas de temperatura repetidamente.

La disminución en la corriente de TRPV1 al ser estimulado con rampas de temperatura consecutivas se denominó inactivación, puesto que los experimentos fueron llevados a cabo sin calcio y se empleó EGTA en el baño y la pipeta de registro, por lo que se descarta desensibilización mediada por calcio como en la estimulación del canal por capsaicina (Zheng, 2013; Gordon, 2015), al igual que en los estudios anteriores en que se observó este fenómeno, pues fueron realizados en ausencia de calcio o con el uso de algún quelante de calcio (EGTA, BAPTA).

Además, dado que los experimentos se realizaron mediante *patch clamp* en configuración *inside-out*, se diría que el fenómeno es propio de la membrana e intrínseco del canal, pues no depende de componentes intracelulares, como la calmodulina (un inhibidor del canal) que tiene un sitio de unión a TRPV1 (Zheng, 2013). Y puesto que no hay calcio, la calmodulina que necesita Ca^{2+} , tampoco actuaría.

Entonces, al caracterizar la inactivación de TRPV1 por temperatura, se observa que una primer rampa de más de 50°C (4 A de corriente en el microcalentador) puede ya inactivar la corriente de TRPV1, pues antes de que se alcance la temperatura máxima la corriente comienza a descender (Fig. 31a). Si se considera que la inactivación puede deberse a un pulso de estimulación sostenido por cierto tiempo, o bien a varias estimulaciones repetidas (normalmente llamado taquifilaxis), el hecho de que la rampa de temperatura dure 2 s de subida y 2 s de bajada, puede ser comparable con la inactivación observada en neuronas DRGs pequeñas al ser estimuladas con un pulso de temperatura que dura 4 s (Schwarz et al., 2000) (Fig. 21).

Luego, las demás rampas de temperatura aplicadas cada 30 s dan cuenta de que en el segundo pulso se conserva menos del 50% de la corriente inicial de TRPV1, y en la última rampa se observa sólo la corriente de fuga del parche (Fig. 30b). No obstante, es importante

mencionar que la inactivación observada varía entre los diferentes parches registrados, lo cual podría deberse a que el parche se forma en regiones distintas de la pipeta, entonces la distancia a la que se coloca el microcalentador se modifica, y ésta es importante en cuanto a la temperatura que percibe el parche.

Ahora bien, en las gráficas corriente vs. temperatura se puede notar un cambio en la temperatura a la que se empieza a activar TRPV1, al comparar la curva del primer pulso y la del segundo (Fig. 31a) el umbral de activación baja, como ya había sido reportado anteriormente (Caterina et al., 1999; Vyklický et al., 1999; Liu & Qin, 2015).

En ese sentido, la pendiente de la curva se modifica, y al realizar un cálculo de la entalpía y entropía de la activación del canal en el primer y segundo pulso, ambas disminuyen (Fig. 33a), por lo que se dice que la sensibilidad a la temperatura de la población de canales disminuye, ya que los cambios altos de entalpía y entropía se asocian con la gran sensibilidad a temperatura de los canales TRP (canales iónicos con Q_{10} bajo tienen cambios pequeños de entalpía y entropía) (Yao et al., 2011). Y dado que ambos parámetros forman una línea recta, se compensan mutuamente, dando lugar a una energía libre de Gibbs pequeña, lo cual hace al proceso de activación de TRPV1 por temperatura un proceso espontáneo a temperaturas altas.

En este aspecto, se debe tomar en cuenta que para el cálculo de la entalpía y entropía se retoma el modelo alostérico de 4 estados, es decir, se retoma el acoplamiento entre algún módulo que sensa la temperatura y la apertura del poro, además de que se asume que el canal no presenta sólo dos estados, sino que tiene varios estados abiertos y varios estados cerrados.

Continuando, los resultados indican que la inactivación de TRPV1 por temperatura no depende del tiempo entre los estímulos (Fig. 34), pues al espaciar los pulsos de temperatura hasta 5 minutos, el canal se sigue inactivando de forma muy parecida a la inactivación con pulsos cada 30 segundos (Fig. 34a).

No obstante, la inactivación sí depende de la temperatura con que se estimula al canal, pues la inactivación a 41-43°C es considerablemente menor, la corriente disminuye poco entre los pulsos, y se requieren más pulsos de temperatura para lograr inactivar al canal (Fig. 35). Esto daría cuenta de las posibles variaciones en la inactivación de cada parche, y la discrepancia en los resultados obtenidos anteriormente en otros estudios, donde se ha estimulado de forma repetida al canal por calor y se ha concluido que no se presenta desensibilización (Cesare & McNaughton, 1996; Nagy & Rang, 1999; Liu & Qin, 2015).

En el caso del estudio de Nagy y Rang en 1999, ellos registraron canal unitario en neuronas DRGs de diámetro pequeño, y al aplicar calor de forma repetida no observan desensibilización, sólo una disminución en la respuesta; resultaría pertinente tratar de

registrar canal unitario con las condiciones aquí presentadas para observar el efecto en TRPV1.

Con respecto al estudio reciente (2015) de Liu & Qin, aún existe controversia sobre el acoplamiento entre el sensado de temperatura y el de voltaje, pues si se considera que al aumentar la temperatura TRPV1 se activa a potenciales cada vez menos despolarizantes (Latorre et al., 2007), o bien, que un canal menos sensible a voltaje es más sensible a la temperatura (Chowdhury et al., 2014), dado que Liu & Qin realizan sus experimentos a -60mV, y en esta tesis se realizaron a +60mV, la dependencia del voltaje en la estimulación por temperatura podría ser un factor que da cuenta de las diferencias entre ambos trabajos. Por añadidura, la estimulación por temperatura de TRPV1 que realizan Liu & Qin es considerablemente más rápida, en el orden de milisegundos.

Posteriormente, una vez que se caracterizó la inactivación de TRPV1 por temperatura, un fenómeno dependiente del uso y de la temperatura, se probó si es reversible. Sin embargo, al enfriar el baño de registro, el cual es calentado por el microcalentador, no se observa recuperación de la corriente (Fig. 36 y 37). Y un resultado concluyente se presenta en la figura 38b, donde incluso a un pulso de temperatura (54°C) en el que la inactivación requiere más pulsos para surtir efecto, después de enfriar, la corriente continúa disminuyendo, de tal forma que no hay recuperación de la misma.

Lo mismo se observa al estimular primero con capsaicina y luego inactivar con temperatura, cuando se vuelve a estimular con capsaicina sólo se observa la corriente de fuga del parche, el canal no vuelve a activarse (Fig. 39), se trata de un tipo de desensibilización cruzada como en Tominaga et al., 1997 (Fig. 18).

De esa forma, al describir la inactivación y además plantear que es irreversible (al menos por los métodos presentados), se sugirió un posible mecanismo de inactivación considerando que el dominio N terminal es determinante en la sensibilidad a temperatura de TRPV1. La idea es que una vez que se estimula a TRPV1 con pulsos repetidos de temperatura, el canal entra a un estado inactivado porque el dominio de anquirinas encargado de sensar la temperatura se desnaturaliza, y si es así, el ATP y el pH básico intracelular estabilizan el dominio de anquirinas, pues aumentan su T_m (datos del laboratorio de trabajo aún no publicados), por lo que la inactivación debería ser más ligera.

Con respecto al ATP, es un compuesto que se ha considerado un modulador positivo de TRPV1, el cual se libera en presencia de daño tisular o inflamación (Calixto *et al.*, 2005). En 2007, Lishko et al. reportaron un sitio de unión del ATP en el dominio de anquirinas, pues existe una discusión en cuanto a si actúa directamente en el canal o a través del metabolismo celular. Además, en sus registros electrofisiológicos muestran que la presencia de ATP intracelular inhibe la taquifilaxis por estimulaciones repetidas de capsaicina. Se

esperaría que debido a ello, tuviera algún efecto en la inactivación de TRPV1 por temperatura.

Sin embargo, los resultados indican que aún en presencia de pH 9 intracelular, la inactivación es muy similar a la inactivación en el pH de registro (7.2) (Fig. 41). Y en presencia de ATP intracelular, la inactivación no cambia con respecto al control (Fig. 42).

La idea de lograr revertir la inactivación de TRPV1 por temperatura, es importante porque podría dar cuenta del mecanismo mediante el cual el canal sensa la temperatura, puesto que si la estimulación con pulsos de temperatura repetidos no tiene efecto, entonces podría relacionarse con que el canal ya no detecta la temperatura.

En ese sentido, ciertas mutaciones en el canal, ya sea en el dominio de poro, la región N terminal o C terminal, regiones que se han considerado dominios sensores de temperatura de TRPV1 (Fig. 14) podrían revertir la inactivación del canal y relacionarse con la detección de temperatura del mismo.

Conclusiones

Se ha caracterizado la inactivación de TRPV1 por temperatura en células HEK 293, un fenómeno dependiente del uso y la temperatura, considerado además irreversible, pues no hay recuperación de la corriente al enfriar el baño de registro o activar con capsaicina. Sin embargo, aún no se ha dilucidado un mecanismo de inactivación, el cual puede dar idea de la detección de temperatura del canal.

Referencias

- Aidley, D.J. (1989). *The physiology of excitable cells* (3rd edition). Great Britain: Cambridge University Press.
- Baez, D., Raddatz, N., Ferreira, G., Gonzalez, C., y Latorre, R. (2014). Gating of Thermally Activated Channels. *Current Topics in Membranes*, 74, 51-87.
- Calixto, J. B., Kassuya, C. A. L., André, E., y Ferreira, J. (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics*, 106, 179–208.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J y Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398, 436-441.
- Cesare, P. y McNaughton, P. (1996). A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 15435–15439.
- Chang, R., y Goldsby, K. A. (2013). *Química* (undécima edición). China: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Chowdhury, S., Jarecki, B. W., y Chanda, B. (2014). A Molecular Framework for Temperature-Dependent Gating of Ion Channels. *Cell*, 158, 1148–1158.
- Clapham, D. E. y Miller, C. (2011). A thermodynamic framework for understanding temperature sensing by transient receptor potential (TRP) channels. *PNAS*, 108 (49), 19492–19497.
- Clínica Universidad de Navarra, Diccionario Médico (2015). Taquifilaxia. Obtenido el 11 de febrero de 2017 de <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/taquifilaxia>
- Cohen, M. R., y Moiseenkova-Bell, V. Y. (2014). Structure of Thermally Activated TRP Channels. *Current Topics in Membranes*, 74, 181-211.
- Curioseando. (2016) ¿Cuál es la diferencia entre potencial de acción y potencial graduado? Obtenido el 08 de febrero de 2017 de <https://curiosoando.com/cual-es-la-diferencia-entre-potencial-de-accion-y-potencial-graduado>
- Dadovits, P. (2008). *Physics in Biology and Medicine*. USA: Academic Press.
- Dhaka, A., Viswanath, V., y Patapoutian, A. (2006). TRP Ion Channels and Temperature Sensation. *The Annual Review of Neuroscience*, 29, 135-161.
- Gordon, S. Del L. (2015). *Handbook of Ion channels*. Zheng, J., y Trudeau, M. C. (Eds.). NY USA: CRC Press.

Hille, B. (1992). *Ionic channels of excitable membranes* (2nd edition). USA: Sinauer Associates Inc.

Investigación Traslacional de Arritmias Cardiacas Secundarias a Canalopatías ITACA-CM. (n.d.). Canales iónicos. Obtenida el 08 de febrero de 2017 de <https://www.itaca.edu.es/canales-ionicos.htm>

Islas, L. D., De-la-Rosa, V., Rodríguez-Cortés, B., Rangel-Yescas, G. E., y Elias-Viñas, D. (2015). A simple method for fast temperature changes and its application to thermal activation of TRPV1 ion channels. *Journal of Neuroscience Methods*, 243, 120–125.

Ito, E., Ikemoto, Y., y Yoshioka, T. (2015). Thermodynamic implications of high Q10 of thermo-TRP channels in living cells. *Biophysics*, 11, 33–38

Jara-Oseguera, A., e Islas, L. (2013). The Role of Allosteric Coupling on Thermal Activation of Thermo-TRP Channels. *Biophysical Journal*, 104, 2160–2169.

Jordt, S. y Julius, D. (2002). Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to “Hot” Chili Peppers. *Cell*, 108, 421–430.

Kadowaki, T. (2015). Evolutionary Dynamics of Metazoan TRP channels. *European Journal of Physiology*, 467 (10), 2043–2053.

Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C., y Vargas, G. (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium*, 42, 427–438.

Liao, M., Cao, E., Julius, D. y Cheng Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504.

Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., y Gaudet, R. (2007). The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron*, 54, 905–918.

Liu, B. y Qin, F. (2015). Use Dependence of Heat Sensitivity of Vanilloid Receptor TRPV2. *Biophysical Journal*, 110, 1523–1537.

Liu, B., Hui, K., y Qin, F. (2003). Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophysical Journal*, 85, 2988–3006.

Merriam-Webster Dictionary. (n.d.). Excitable. Obtenida el 08 de febrero de 2017 de <https://www.merriam-webster.com/dictionary/excitable>

Montell, C. (2005). The TRP Superfamily of Cation Channels. Obtenido el 17 de octubre de 2016 de <http://stke.sciencemag.org/>

Nagy, I. y Rang, H. P. (1999). Similarities and Differences between the Responses of Rat Sensory Neurons to Noxious Heat and Capsaicin. *The Journal of Neuroscience*, 19(24), 10647–10655.

Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2013). Lehninger *Principles of biochemistry* (Sixth edition). New York: W.H. FREEMAN AND COMPANY

O Poletini, M., Moraes, M. N., Ramos, B. C., Jeronimo, R., y de Lauro, A. M. (2015). TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. Review. *Temperature*, 2 (4), 522-534.

Palovcak, E., Delemotte, L., Klein, M. L., y Carnevale, V. (2015). Comparative sequence analysis suggests a conserved gating mechanism for TRP channels. *The Journal of General Physiology*, 146 (1), 37–50.

Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., y Viswanath, V. (2003). Thermotrp channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nature Reviews Neurosciense*, 4, 529-539.

Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A. & White, W. E. (Ed). (2012). *Neurosciense* (5th edition). USA: Sinauer Associates, Inc.

Randall, D., Burggren, W., y French, K. (2001). *Eckert animal physiology: mechanism and adaptions* (5th edition). USA: W.H. Freeman and Company

Rosenbaum, T., y Simon, S. A. Del L. (2007). *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades*. Liedtke, W. B., y Heller, S. (Eds.), TRPV1 Receptors and Signal Transduction. USA: CRC Press.

Schwarz, S., Greffrath, W., Busselberg, D., y Treede, R. (2000). Inactivation and tachyphylaxis of heat evoked inward currents in nociceptive primary sensory neurones of rats. *Journal of Physiology*, 528.3, 539—549.

Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., et al. (1998). The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron*, 21, 531–543.

Veitinger, S. (2011). The Patch-Clamp Technique. Obtenido el 11 de febrero de 2017 de <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>

Vyklický, L., Vlachová, V., Vitásková, Z., Dittert, I., Kabát, M., y Orkand, R. K. (1999). Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *Journal of Physiology*, 517.1, 181—192.

- Wang, H., y Siemens, J. (2015). TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. *Temperature*, 2 (2), 178-187
- Winter, Z., Buhala, A., Ötvös, F., Jósvey, K., Vizler, C., Dombi, G., Szakonyi, G., y Oláh, Z. (2013). Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel – an overview of the current mutational data. *Molecular Pain*, 9 (30)
- Yao, J., Liu, B., y Qin, F. (2010a). Pore turret of thermal TRP channels is not essential for temperature sensing. *PNAS*, 107 (32), 125
- Yao, J., Liu, B., y Qin, F. (2010b). Kinetic and Energetic Analysis of Thermally Activated TRPV1 Channels. *Biophysical Journal*, 99, 1743–1753
- Yao, J., Liu, B., y Qin, F. (2011). Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *PNAS*, 108 (27), 11109–11114
- Zagotta, Del L. (2015). *Handbook of Ion channels*. Zheng, J., y Trudeau, M. C. (Eds.). NY USA: CRC Press
- Zhang, X. (2015). Molecular sensors and modulators of thermoreception. *Channels*, 9 (2), 73-81
- Zheng, J. (2013). Molecular Mechanism of TRP Channels. *Compr Physiol*, 3(1), 221–242