



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio de la interacción del canal TRPV1 y
el receptor no opioide Sigma 1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Miguel Ortiz Rentería

Director de la Tesis:

Dra. Sara Luz Morales Lázaro



Ciudad Universitaria, Cd.Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

- En primer lugar, quiero agradecer a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual me brindó la oportunidad de desarrollarme tanto académicamente como por haberme permitido crecer como persona.

-Agradezco profundamente a la Dra. Sara Luz Morales Lázaro por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por dirigir siempre con paciencia y decisión este proyecto.

- A la Dra Tamara Rosenbaum por permitirme ser un miembro de su laboratorio y por desarrollar mi proyecto de licenciatura en su laboratorio.

- A los miembros del jurado a la Dra. Rocío Alcántara Hernández, Dra. Gisela Edith Rangel Yescas, Dr. Ricardo González Ramírez y al Biol. Gustavo Sánchez Chávez. Por sus correcciones y aportaciones al presente escrito.

- A la Biol. Alejandra Llorente Gil y al Laboratorista Félix Sierra Ramírez por su apoyo técnico para el desarrollo de este proyecto por su apoyo técnico.

- Al Dr León D. Islas por proporcionar la construcción TRPV1-mcherry

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

- Al Dr. Fernando García Hernández por su apoyo en el manejo del microscopio confocal y en la captura de imágenes (Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología, UNAM).

-Este proyecto fue financiado con el apoyo del Programa de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) – Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IA202717. realizado en el laboratorio BL-303 del departamento de Neurociencia Cognitiva en la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular. Bajo la dirección de la Dra. Sara Luz Morales Lázaro.

Agradecimientos Personales:

- A mi abuelo Carlos Ortíz Rodríguez a quien dedico esta tesis, quien durante su vida me dio muy buenos y sabios consejos, y que a pesar de que ya no está con nosotros lo seguimos recordando con cariño.
- A mis padres y hermanos por su cariño incondicional y por haberme apoyado en todo momento durante mi educación superior. Gracias ellos he logrado un triunfo en mi vida.
- A Emma Carolina Ortíz. Esa pequeña niña que nos vino a cambiar nuestra vida.
- A los miembros del laboratorio, a la Dra Sara Luz por haberme tenido la paciencia y haberme guiado en todo el proceso del desarrollo de la tesis, a Ale por siempre confiar en mí y brindar grandes consejos, a Félix por su honestidad (aunque a veces demasiada), a Rebe por siempre apoyarme en todo momento dentro del lab. Todos de alguna manera han aportado mucho a mi vida, por eso siempre les estaré agradecido.
- A Héctor Salas, Juan Carlos Herrera, Ricardo Gómez, Ameyalli Gómez, Aline Cruz y Karen Rodríguez por su apoyo y amistad.

A todos ellos muchas gracias...

Índice

Abreviaturas.....	1
1. Introducción.....	4
1.1 Canal TRPV1.....	5
1.2 Sensibilización y desensibilización del canal TRPV1.....	6
1.3 Regulación del canal TRPV1 por su asociación a otras proteínas.....	7
1.4 Receptor Sigma 1 (Sig-1R).....	8
2. Hipótesis.....	13
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo General.....	13
3.2 Objetivos Particulares.....	13
4. Metodología.....	13
4.1 Aislamiento del cDNA del Sig-1R y clonación en el vector.....	13
4.2 Preparación de medio de cultivo celular y cultivo de células HEK293.....	14
4.3 Transfección de cultivos celulares.....	14
4.5 Extracción de DRG's.....	16
4.6 Tratamientos para la extracción de DRG's.....	16
4.7 Cuantificación de Proteínas.....	17
4.8 Electroforesis y transferencia de proteínas a membranas (WB).....	18
4.9 Ensayos de co-localización por fluorescencia.....	22
4.10 Co-Inmunoprecipitación.....	23
4.11 Ensayos de conducta.....	24
4.12 Análisis por Densitometría y Estadística.....	25
5 Resultados.....	26
5.1 Construcción, aislamiento y clonación de Sig-1R-GFP.....	26
5.2 Evaluación de la posible existencia de una interacción entre Sig-1R y TRPV1.....	28
5.3 Co-inmunoprecipitación.....	29
5.4 El antagonismo de Sig-1R altera la nocicepción en ratones tratados con BD1063.....	31
5.5 Inhibición de Sig-1R altera los niveles de TRPV1 en DRG'S.....	32
6. Discusión.....	33
7. Conclusiones.....	36
8. Perspectivas.....	37
9. Bibliografía.....	38

Abreviaturas:

- ARMS: Proteína de membrana rica en anquirinas
- AKAP79: Proteína cinasa A de anclaje
- ARN: Ácido ribonucleico
- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- BiP: Proteína de unión a inmunoglobulinas (Binding immunoglobulin protein).
- BD1063: 1-[2-etil]-4-metilpiperazina.
- BSA: Albumina de suero bovino.
- D10: Medio DMEM (Dublecco's Modified Eagle's Medium) complementado con Suero Fetal Bovino al 10%.
- DRG: Ganglios de la raíz Dorsal (Dorsal Root Ganglion).
- GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- GABARAP (Receptores del ácido gamma-aminobutírico A)
- GFP: Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein)
- HEK293: Línea celular de riñón de embrión humano (Human Embryonic Kidney).
- IgG: Inmunoglobulinas.
- IP: Inmunoprecipitado.
- InsP3R: R receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
- NMDA: Receptor de *N-metil-D-aspartato*
- PBS: Buffer de fosfatos salino.
- PBS-T: Buffer de Fosfatos salino con Tween 20.
- PKA: Proteína cinasa A, dependiente de AMP cíclico
- PKC: Proteína cinasa C, dependiente de calcio
- PT: Proteínas totales solubilizadas.
- PVDF: Membranas de fluoruro de polivinilideno
- Sig-1R: Receptor no opioide sigma 1.
- Sig-1R-GFP: Fusión Sigma 1 Receptor con GFP

- TRP: Receptor de potencial transitorio (*Transient Receptor Potential*).
- TRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide subtipo 1 (*Transient receptor potential vanilloid 1*).
- rTRPV1: Canal TRPV1 de rata.
- KO: Knockout
- P4: progesterona

Resumen:

El canal TRPV1 es una proteína importante para la percepción de estímulos nocivos, ya que permite comunicar a la célula con el ambiente, este canal responde a estímulos tanto físicos como químicos (sensor polimodal). Su participación en el sistema sensorial, está relacionado con procesos como la inflamación y en enfermedades que presentan dolor crónico. La mayoría de los estudios sobre TRPV1 se enfocan en investigar distintos ligandos tanto agonistas como antagonistas, que regulen al canal con el fin de encontrar un tratamiento que modulen el dolor mediado por este canal. Sin embargo, hay pocos estudios en los cuales se aborde la regulación de TRPV1 mediante la interacción con otras proteínas. Sólo algunas han sido reportadas como, por ejemplo, AKAP79, la subunidad Kv β 2, y la proteína ARMS. Pero hasta el día de hoy no se ha descrito la interacción este canal o de cualquier otro canal TRP de mamífero, con proteínas que tengan función de chaperonas. El Sig-1R tiene función de chaperona, interacciona y estabiliza al receptor InsP3R, a distintos canales iónicos, así como receptores acoplados a proteínas G. Por lo anterior, se propuso a Sig-1R como un posible mediador del canal TRPV1. El objetivo del presente trabajo es demostrar si había una interacción entre TRPV1 y Sig-1R, primero se diseñó una fusión entre Sig-1R y GFP con el fin de sobre expresar los niveles de Sig-1R en las células HEK293, además de que esta fusión nos permitió observar co-localización con TRPV1-mcherry en ensayos de fluorescencia. Paralelamente, en los ensayos de co-inmunoprecipitación vimos interacción directa entre TRPV1 y Sig-1R. Además de que pretratamientos en ratones de la cepa C57BL/6J con el antagonista de Sig-1R, BD1063 provocó que los niveles de expresión de TRPV1 en DRG's disminuyeran. Al realizar este mismo procedimiento, pero en ensayos de dolor agudo hubo una disminución significativa de dolor entre los ratones tratados con BD1063 comparados con los que solo recibieron el vehículo. Por lo tanto, estos experimentos den evidencias de una posible regulación por parte de Sig-1R a TRPV1, sin embargo, aún queda elucidar dicho mecanismo.

1. Introducción

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman poros para permitir el flujo controlado de iones a través de las membranas plasmáticas o intracelulares (Hille, B, 2001). Muchos canales iónicos, por ejemplo, potasio, sodio, calcio, nucleótidos cíclicos (HCN), canales modulados por nucleótidos cíclicos (GNC) y receptores del potencial transitorio (TRP), comparten varias similitudes estructurales. Se cree que estos canales han evolucionado a partir de un ancestro común ya que muestran similitud en su secuencia (Yu FH *et al*; 2005).

Dentro de la relevancia fisiológica de los canales iónicos está su participación en la generación de potenciales de acción en las células eléctricamente excitables (Hille, 2001). Particularmente, en poblaciones específicas neuronales del sistema nervioso periférico la función de algunos canales de sodio, calcio y potasio dependientes de voltaje, así como algunos canales TRP, es llevar a cabo la percepción, transducción y transmisión de señales de daño para el organismo, proceso conocido como nocicepción (Zheng, 2013), con la subsecuente respuesta de alerta y/o percepción de dolor.

La familia de canales TRP engloba un grupo de canales catiónicos no selectivos que están involucrados en diversos procesos fisiológicos a nivel celular, (Ramsey *et al.*, 2006; Nilius y Flockerzi, 2014). Son canales polimodales, esto quiere decir que son capaces de responder a distintos estímulos de carácter térmico, químico, mecánico y osmótico (Moran, el; 2004). El primer miembro de esta familia fue identificado en mutantes de *Drosophila melanogaster*, en este sistema se observó que había canales iónicos los cuales respondían de manera transitoria al ser estimulados por la luz, de ahí se derivó el nombre de la familia (Minke, 1977). Actualmente en mamíferos esta familia se clasifica en seis subfamilias denominadas: Vaniloide (TRPV), Canónica (TRPC), Anquirina (TRPA), Melastatina (TRPM), Policistina (TRPP) y Mucolipina (TRPML) (Ward & Kalskins, 2012).

Estructuralmente, todos los canales TRP se ensamblan en un tetrámero y forman un canal funcional, cada subunidad presenta cuatro dominios en común: un extremo amino y carboxilo terminal localizados intracelularmente, una región transmembranal constituida por seis pases transmembranales y un poro de conducción iónica (Figura1; Modificado de Morales-Lázaro *et al.*, 2013).

1.1 Canal TRPV1

La subfamilia vaniloide está integrada por seis miembros (TRPV1-TRPV6), cuatro de ellos implicados en la percepción de estímulos del tipo nocivo (TRPV1-TRPV4). El canal TRPV1 es uno de los miembros de la familia TRP más estudiado, se expresa predominantemente en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (neuronas DRG) y del ganglio trigeminal (TG) y la activación de este canal está ampliamente asociada a la generación de dolor (Willis & Coggeshall, 2004).

Este canal se caracteriza por permitir preferentemente el paso de iones Ca^{+2} a través de su poro de conducción iónica y su naturaleza catiónica no selectiva le permite también cierta permeabilidad a Na^+ , Mg^{+2} y K^+ (Figura 1; Ward & Kalskins, 2012).

El canal TRPV1 es activado por estímulos químicos y térmicos. Los estímulos químicos pueden ser de naturaleza exógena como el compuesto vaniloide denominado capsaicina, este compuesto de características hidrofóbicas interacciona con aminoácidos específicos localizados entre los segmentos transmembranales S3 y S4 del canal, (Zheng Jie et al. 2015), esta interacción permite que el canal abra su poro de conducción para el paso de iones, fisiológicamente esto se traduce como una sensación de picor. Otra forma de activación del canal TRPV1 es por medio de temperaturas de $\geq 42^\circ\text{C}$ y por pH extracelular ácido o intracelular básico (Morales-Lázaro S, et al. 2013).

Existen también compuestos químicos producidos endógenamente que activan al canal, por ejemplo, compuestos liberados durante el proceso de daño tisular o inflamación tales como la anandamida, el ácido lisofosfatídico (LPA), productos derivados de la lipooxigenasa (ácido 12-Hidroxicicosatetranoico, la hepoxilina A3), el ATP, el diacilglicerol y el PIP_2 (Morales-Lázaro S, et al. 2013). Para algunos de estos compuestos se ha identificado la unión directa al canal TRPV1, y esto permite su activación (Figura 1).

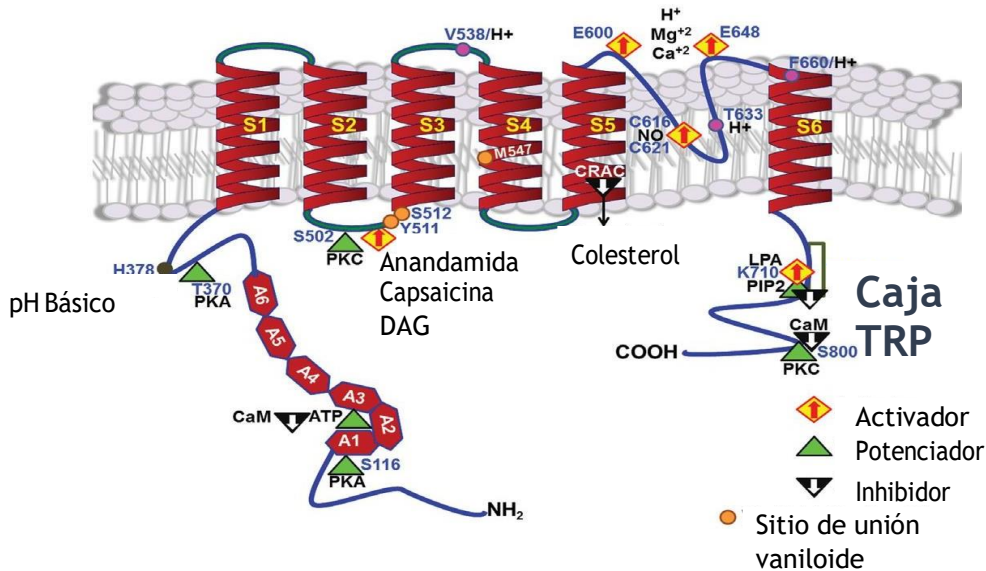


Fig. 1 Representación de la estructura de una subunidad del canal TRPV1 con sus diferentes sitios de unión a ligando y sitios de fosforilación. La subunidad tiene seis dominios transmembranales y el poro formado en la región S5 y S6 del canal, la forma funcional del canal TRPV1 está dada por un tetrámero. (Modificada de Morales-Lázaro, et al. 2013).

1.2 Sensibilización y desensibilización del canal TRPV1

Dos mecanismos importantes para la regulación del canal TRPV1 son la sensibilización y la desensibilización del canal. **La sensibilización**, típicamente se desarrolla como consecuencia de la lesión de tejidos o por inflamación, se define como una reducción en el umbral de activación del canal y un aumento en la magnitud de una respuesta a la estimulación causada por un ligando (Gold, M, et al; 2010). Las fosforilaciones se producen por medio de la proteína cinasa “C” (PKC), la proteína cinasa “A” (PKA) y la Ca²⁺/calmodulina cinasa II (CaMKII) (Szallasi *et al.*, 2007; Btsh *et al.*, 2015; Samelson *et al.*, 2015, Rosenbaum & Simon, 2007). Los residuos importantes para **la sensibilización** del canal TRPV1 son serina 502 (S502) localizada en el asa intracelular entre los dominios transmembranales S2-S3, así como la serina 800 (S800) localizada en el carboxilo terminal, ambos residuos son blanco de la PKC (Winter *et al.*, 2013). Estas fosforilaciones, permiten

que el canal se active fácilmente a temperaturas menores de 42°C y a concentraciones bajas de capsaicina, además de que también lo sensibiliza a protones (Liedtke & Heller, 2007)

La PKA por su parte, fosforila a otros residuos que se encuentran en la región amino terminal los cuales son: S116, T144, S502 y T370. Al igual que las fosforilaciones por PKC, las fosforilaciones mediadas por PKA sensibilizan al canal para activarse a temperaturas menores de los 42°C y a menor concentración de capsaicina, (Numazaki et al., 2002; Tominaga et al., 2001), pero además estas fosforilaciones reducen la desensibilización dependiente de calcio causada por capsaicina, permitiendo que el canal prolongue su activación aún en con el aumento de calcio intracelular (Bhave, G; et al 2002).

Por otra parte, **la desensibilización** es causada por un estado refractario que presentan los canales después de su activación, ya que no hay respuesta del canal incluso en presencia de agonistas, este estado es reversible (Szallasi y Blumberg, 2007). La **desensibilización** del canal TRPV1 esta mediada por la interacción de la calmodulina (CaM) en el amino terminal (residuos 189-222) y carboxilo terminal (residuos 767-801) (Liedtke & Heller, 2007). La calmodulina es un sensor del calcio que pasa a través del canal TRPV1, esto permite la activación de la calcineurina 2B (Proteína fosfatasa 2B de serina-treonina) que se encarga de desfosforilar al canal (Por E. D., 2010).

Estos dos mecanismos que regulan la función del TRPV1 son ocasionados por la activación de vías de señalización que generalmente producen cambios en la fosforilación del canal. Esta fosforilación de ciertos aminoácidos incrementa la sensibilidad del canal a los estímulos químicos y térmicos.

1.3 Regulación del canal TRPV1 por su asociación a otras proteínas

A la fecha existen pocos estudios acerca de la interacción del canal TRPV1 con otras proteínas y la repercusión en la función y/o expresión del canal. Por ejemplo, se ha reportado la interacción del canal con la proteína GABARAP, esta interacción favorece la unión del carboxilo terminal del canal con tubulina, propiciando el mantenimiento del canal en la membrana plasmática (Lainez, S, et al; 2010). También se ha reportado la interacción de TRPV1 con la subunidad $\beta 2$ de los canales de K^+ dependientes de voltaje ($Kv\beta 2$), lo cual

permite un mayor tráfico del canal hacia la membrana plasmática y una mayor sensibilidad a la capsaicina (Bavassano *et al.*, 2013).

De manera interesante se ha descrito que algunos mediadores de la inflamación como la prostaglandina E2 o la bradiquinina causan hiperalgesia mediante la activación de cinasas que fosforilan a TRPV1, un proceso dependiente de la interacción del canal con la proteína de andamiaje AKAP79, esta interacción recluta a las cinasas hacia los sitios a fosforilar en el canal TRPV1 (Zhang *et al.*, 2008).

Tanto AKAP79, la subunidad Kv β 2, GABARAP y la proteína de membrana rica en anquirinas (ARMS) (Peter *et al.*, 2017) actúan con TRPV1 mediante la formación de un complejo multiprotéico.

1.4 Receptor Sigma 1 (Sig-1R)

En los últimos años se ha descrito una chaperona con características particulares, de alta expresión en neuronas sensoriales y está asociada con la respuesta de dolor, dicha proteína es el Receptor Sigma 1 (Sig-1R) (Alonso, G; *et al.*; 2000). Este receptor inicialmente fue clasificado dentro de la familia de los receptores opiodes (Martin *et al.*, 1976), sin embargo, estudios posteriores demostraron que el Sig-1R no presenta afinidad por ningún compuesto del tipo opioide (Su, 1982; Matsumoto, 2007).

El Sig-1R es una proteína transmembranal que cuenta con 223 aminoácidos (Hanner, M. *et al.* 1996), se localiza en el retículo endoplasmático (ER) y está altamente enriquecidos en la interfase del ER y la mitocondria (Hayashi y Fujimoto, 2010; Su, *et al.*, 2010). También se ha reportado su localización en la membrana plasmática (Roth, M.D. *et al.* 2005).

En total se han propuesto cuatro tipos de topologías de este receptor. El primer modelo de Sig-1R señala que los extremos amino y carboxilo son citosólicos con dos dominios transmembranales (Aydar *et al.*, 2002). El segundo modelo es similar solamente que los extremos amino y carboxilo se encuentran en el lumen del retículo, (Hayashi y Su 2007) (Figura 2). Para el tercer modelo un análisis de Sig-1R mostró un segmento hidrofóbico sencillo localizado en el amino terminal con una pequeña región en el lumen y se propuso que el resto de la proteína se encontraba en el lado citosólico, unido a la membrana del Retículo (Moebius, *et al.*, 1997) (Figura 3). Esto ha sido recientemente confirmado con la

obtención de la proteína cristalizada, revelando que Sig-1R posee un solo dominio transmembranal, localizado en el amino terminal que comprende de los residuos 8 a 32 (Schmidt, et al; 2016). El resto de la estructura forma un dominio simple, con el sitio de unión a ligando localizado en el centro. Es importante mencionar que esta cristalografía se obtuvo con Sig-1R asociado a ligandos, en donde se observó que el receptor existe en un arreglo trimérico, con los protómeros asociados en forma de un triángulo plano (Figura 2), con un dominio transmembranal en cada esquina, este dominio es altamente hidrofóbico lo cual explica su inserción en la membrana. En este estudio el carboxilo terminal es la parte abultada de la proteína, y corresponde al dominio citosólico abarcando del residuo 33 al 223, en su centro contiene estructuras de β -barril, las cuales constituyen el sitio de unión a ligando (Figura 3) (Schmidt, et al; 2016).

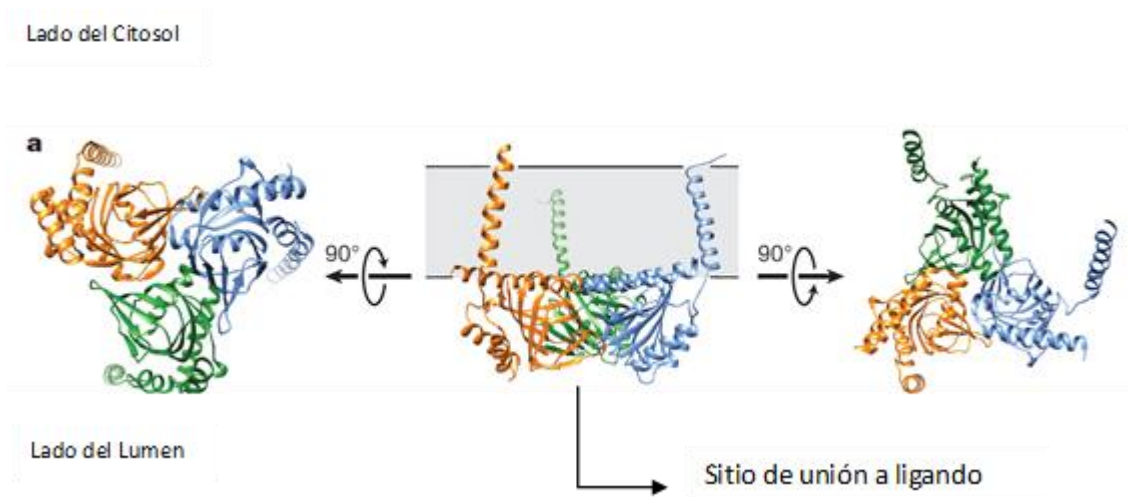


Fig. 2 Modelo de la estructura cristalizada de Sig-1R. Modelo de Sig-1R es un trímero que consta de un solo pase transmembranal y está formado por el amino terminal de cada protómero, el carboxilo terminal forma el resto de la proteína teniendo una parte hidrofóbica incrustada en la membrana, mientras que el resto se encuentra en el citosol la cual está formada por barriles- β en el cual se encuentra el sitio de unión a ligando (Modificado de Schmidt, *et al.*, 2016).

El cuarto modelo se obtuvo a partir de un análisis por medio de microscopía electrónica de transmisión que confirmó la estructura de Sig-1R corresponde a un homotrímero con un solo pase transmembranal, sin embargo este estudio realizado en sistemas celulares de expresión endógena del receptor (neuronas DRGs) mostraron una orientación inversa al observado por estudios cristalográficos, teniendo su carboxilo terminal hacia el lado del lumen y la pequeña porción del amino terminal en el lado del citosol (Mavylutov T, et al, 2017), topología que está más en acorde con la propiedad de este receptor de ser chaperona en el retículo endoplasmático (figura 2).

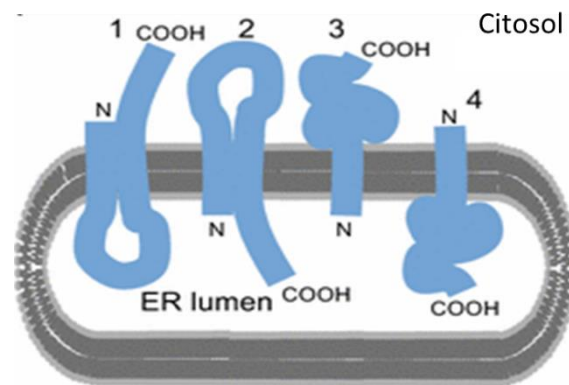


Fig. 3 Distintas topologías de Sig-1R A) Se han propuesto cuatro topologías de Sig-1R en la membrana de retículo. 1. Los extremos N y C son citosólicos con dos dominios TM (Aydar et al., 2002), 2. Ambos extremos N y C son luminales con dos dominios transmembranal (Hayashi y Su 2007), 3. N- término en el lumen con un dominio TM (Schmidt et al., 2016), y 4. Una topología novedosa con término N en el citosol con un dominio transmembranal (Mavylutov T, et al, 2017) (Modificado de Mavylutov T, et al, 2017).

El Sig-1R tiene función de chaperona, interacciona y estabiliza al receptor InsP3R, esta interacción permite modular el calcio intracelular para liberar el calcio del retículo (Hayashi, et al. 2001). Otra característica del Sig-1R es su gran movilidad dentro del retículo y hacia otros compartimentos como la envoltura nuclear y la membrana plasmática (Fujimoto y Hayashi, 2011). Sig-1R se encuentra en el retículo endoplásmico en condiciones basales junto con otras chaperonas, y participa en el plegamiento adecuado de las proteínas (Soriani, O. et al. 1999); si este plegamiento no se realiza adecuadamente, se puede desencadenar la respuesta de proteína mal plegadas con la subsecuente degradación proteica por medio del proteosoma (Lecker et al., 2006). Particularmente, Sig-1R es la única chaperona reportada

hasta la fecha, que puede ser regulada por diversos ligandos, como esteroides, antipsicóticos, antihistamínicos o antidepresivos. Algunos de estos compuestos pueden actuar como agonistas o inhibidores de Sig-1R, en algunos casos no se ha determinado la función del ligando. Por ejemplo, la progesterona es un inhibidor endógeno del Sig-1R, a diferencia de la N, N, dimetil triptamina que es un agonista del Sig-1R.

El Sig-1R regula diversos canales iónicos como los canales de potasio, calcio, sodio y NMDA. Es probable que la función de chaperona de Sig-1R esté estrechamente relacionada con la regulación de un canal iónico funcional al proveerle un andamio para el tráfico intracelular (Su T.P. et al. 2010). Se ha comprobado que Sig-1R juega un papel muy importante en la nocicepción y que se encuentra expresado en áreas encargadas del control del dolor, del sistema nervioso central como periférico (Alonso et al., 2000; Kitaichi et al., 2000)

Se ha reportado que en ratones KO (Sig-1R^{-/-}) y el antagonismo farmacológico de los receptores de Sig-1R produce un efecto antinociceptivo en pruebas con formalina, que está asociada con una reducción en la fosforilación de la subunidad 1 del receptor NMDA (pNR1). También se comprobó que los agonistas del receptor Sig-1R aumentaron el dolor agudo inducido por NMDA. Debido a la importancia de la fosforilación del receptor NMDA en la sensibilización central de las neuronas de la vía del dolor, se ha sugerido que Sig-1R puede estar implicado en el proceso de sensibilización central a través de la modulación de los receptores NMDA (Ulfenius C, et.al 2006).

Además, en un modelo inducido de migraña por capsaicina en ratas de la cepa Sprague-Dawley, se observó que al pre-tratar por diez minutos a las ratas con el antagonista de Sig-1R, BD1047, su respuesta al dolor disminuía conforme se iba aumentando la concentración de este compuesto (10, 30 y 100nM). Lo anterior nos sugiere una relación entre Sig-1R y TRPV1, es posible que exista una interacción en forma directa del Sig-1R y el canal. En otro caso se reportó que en ratones KO (Knock out) para Sig-1R o por medio de varios antagonistas (BD1047, BD1063 y NE-100) de este, se es posible disminuir la hipersensibilidad mecánica causada por capsaicina a través de un estímulo punzante (Entrena, J.M et.al 2009).

En nuestro grupo de trabajo previamente se determinó que la inhibición de Sig-1R atenúa la respuesta de dolor ante capsaicina (el agonista del canal TRPV1), este efecto se debe a que disminuye la cantidad de canales TRPV1 a nivel de proteína total y de membrana. Sin embargo, en ese estudio no se demostró el efecto agudo de inhibición de Sig-1R y tampoco se demostró si estas proteínas interaccionan.

2. Hipótesis:

El Sig-1R regula los niveles de expresión del canal TRPV1 por medio de una interacción directa. Al reducir esta interacción por medio de antagonistas del Sig-1R disminuye la expresión del canal TRPV1 y se atenúa el dolor producido por medio de este canal.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General:

Determinar la interacción entre el canal TRPV1 y el receptor Sigma 1(Sig-1R).

3.2 Objetivos Particulares

- Diseño y construcción de un vector de expresión con la secuencia codificante de Sig-1R fusionado a GFP.
- Realizar de ensayos de expresión Sig-1R-GFP en la línea celular HEK293 por medio de transfección transitoria.
- Co-expresión del canal TRPV1-mCherry y Sig-1R-GFP para determinar si presentan una co-localización por medio de microscopía confocal.
- Evaluar la posible interacción entre el canal TRPV1 y Sig-1R por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación.
- Determinar la relevancia fisiológica del antagonismo del Sig-1R sobre la respuesta de dolor a capsaicina.

4. Metodología

4.1 Aislamiento del cDNA del Sig-1R y clonación en el vector

Para la construcción del vector pSig1R-GFP, el cADN para Sig-1R se amplificó por PCR a partir de ARN total aislado de células HEK293 (de acuerdo al protocolo del proveedor) con el reactivo TriZol (Invitrogen). La reacción de transcripción reversa (RT-PCR) se llevó a cabo utilizando 2.5 µg de ARN total, 100 ng de oligonucleótidos aleatorios y 200U de SuperScripIII (Invitrogen). La reacción de PCR se llevó a cabo el con el buffer de reacción que contiene HercII Fusion 1X, dNTPs 0,25 µM, 1,0 µl de cADN, oligonucleótidos 0,25 µM (oligo directo 5'-ATGCAGTGGGCCCGTGGGC-3', oligo inverso 5' TAGGGTCCTGGCCAAAGAG), 5% (v/v) de DMSO, y 5 U de HercII fusión ADN-polimerasa (Agilent). La PCR se realizó de la siguiente manera: desnaturalización a 94 ° C

durante 1 min, seguido por 30 ciclos (desnaturalización: 20 s a 95°C, alineamiento: 20 s a 55°C y polimerización: 30 s a 68°C), y finalmente por 5 min. extensión a 68 ° C. Después de la PCR, el producto se clonó en el vector pCDNA3.1 / CT-GFP-TOPO de acuerdo con el protocolo de Thermofisher Scientific. La identidad de la secuencia clonada se verificó mediante secuenciación del ADN.

4.2 Preparación de medio de cultivo celular y cultivo de células HEK293

Para nuestros cultivos celulares se utilizó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de alta glucosa (4.5g/L) complementado con penicilina (1000µg/ml), estreptomina (1000µg/ml) y con 10% de suero fetal bovino (SFB), a este medio lo denominamos D10.

Se trabajó con la línea celular HEK293 adherente (*Human Embryonic Kidney*) realizando sub cultivos por medio de la disociación de la monocapa con tripsina-EDTA al 0.05%, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm, durante cinco minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla celular fue homogeneizada en 1 ml de medio D10. Las células se sembraron a una confluencia del 50% en medio de cultivo celular D10 para ser transfectadas al día siguiente. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C, con una atmósfera de CO₂ al 5%.

4.3 Transfección de cultivos celulares

La transfección es un procedimiento que introduce ácidos nucleicos en las células, con el fin de producir células modificadas que expresen alguna proteína. Los materiales genéticos introducidos en las células pueden expresarse de dos maneras ya sea de manera estable o transitoria, en este caso se utiliza la transfección transitoria, en la cual las proteínas de interés se expresan solamente durante un período limitado de tiempo (esto depende del tipo de transfección y la cantidad de ADN) y no se integran en el genoma (Kim, T. K., & Eberwine, J. H. 2010).

Para nuestros ensayos de transfección usamos un agente policationico (Jetpei), el cual forma un complejo con el ADN para su incorporación al interior de las células por medio de endocitosis. Para los fines de este trabajo se transfectaron los plásmidos pcDNA3.1DNA rTRPV1 ó pcDNA3.1 rTRPV1-Cherry y también el pcDNA3.1 Sig-1R-GFP . Las mezclas de reacción se prepararon por separado de acuerdo a la siguiente tabla (Tabla 1).

TRANSFECCIÓN PARA ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN	
Compuesto (Mezcla 1)	Volumen (Caja P100)
pcDNA3.1 Sig-1R-GFP	2µg
pcDNA3.1DNA rTRPV1	1µg
NaCl (150 mM)	500 µl
Compuesto (Mezcla 2)	Volumen (Caja P100)
JetPei	5ul
NaCl (150 mM)	495 µl
TRANSFECCIÓN PARA ENSAYOS DE FLUORESCENCIA	
Compuesto (Mezcla 1)	Volumen (Por pozo)
pcDNA3.1 SIG-1R-GFP	500ng
pcDNA3.1 rTRPV1-Cherry	500ng
NaCl (150 mM)	100 µl
Compuesto (Mezcla 2)	Volumen (Por pozo)
JetPei	3µl
NaCl (150 mM)	100 µl

Tabla 1. Mezclas de reacción para transfectar cultivos.

Las mezclas por separado se agitaron vigorosamente y la mezcla 2 se agregó a la mezcla 1 para formar los complejos ADN-agente policationico. La mezcla resultante se agitó vigorosamente y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación la mezcla de transfección fue agregada a los cultivos celulares, a los cuales previamente se les cambio el medio de cultivo. 16 horas post-transfección se realiza el

cambio del medio de cultivo y el cultivo se incubó por otras 24 horas para permitir la expresión de la construcción del ADN incorporado.

4.5 Extracción de DRG's

En este procedimiento primero se decapita al ratón lo más cercano al cráneo, una vez decapitado se baña perfectamente el cuerpo con etanol y se coloca en una base de unicel boca abajo estirando cada extremidad asegurándolos con una aguja. Una vez asegurado se expone la columna hacia arriba, se corta la piel desde la base del cuello hasta la base de la cola. De cada mitad de piel se corta el tejido conectivo y se pliega la piel sobre los costados sobre los cuales se coloca papel con etanol para evitar que el área expuesta se llene de pelo. Se retira el exceso de grasa y tejido muscular que tenga sobre y cerca de la columna vertebral esto con el fin de acceder a la misma con facilidad.

Ya limpia el área de trabajo se corta a lo largo toda la columna en un ángulo de 90° y posteriormente se hacen dos cortes a 0° y se retiran los restos de la columna, con las pinzas se quita la médula esto con el fin de que el canal quede limpio y exponer los ganglios, los cuales se extraen únicamente del área lumbar. Una vez extraídos los ganglios se colocan en una caja petri con 2ml de solución PBS 1X frío con 80 µl de Complete 25X (Al final queda a una concentración de 1X), esto sirve como un primer lavado con el cual se retira sangre u otro tipo de desecho.

Los ganglios se pasan un tubo eppendorf con 1ml de solución PBS 1X (Con NaF 100mM y Complete 25X (Inhibidor de proteasas)) frío y se centrifugan a 7500 rpm por 1 minuto se retira la solución salina PBS 1X y se repite este proceso una vez más con el fin de que los ganglios queden lo más limpios posible. Después se añaden 120 µl de buffer de lisis 1X se homogenizan mecánicamente con un pistilo hasta que el líquido se torne de un color turbio, se centrifuga a 13200rpm por tres minutos y se recupera el sobrenadante.

4.6 Tratamientos para la extracción de DRG's

Los tratamientos consistieron en inyectar de manera intraescapular a ratones machos adultos (8 a 10 semanas) de la cepa C57BL/6J con 32 mg/kg del antagonista de Sig-1R, BD1063. Después de media hora se extraen los ganglios de la raíz dorsal (DRG's) del animal.

Buffer de Lisis 5X		
Compuesto	Concentración Stock	Concentración final
Tris Cl pH 8	250mM	50mM
NaCl 5M	750mM	150mM
Triton	5%	1%

Tabla 2. Componentes del buffer de lisis 5X

Buffer de Lisis 1X	
Compuesto	Volumen
Buffer de lisis 5x	200µl
Complete 25x (1X final)	40µl
NaF 100mM (2.5mM final)	25µl
H ₂ O	735µl

Tabla 3. Componentes del buffer de lisis 1X

4.7 Cuantificación de Proteínas

Para la cuantificación de las proteínas totales provenientes de las células a las que se les dieron tratamientos o a las DRG's se usa la técnica del ácido bicinonínico (BCA). Este método combina la reducción del Cu⁺² a Cu⁺¹ en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu⁺¹ utilizando el ácido bicinonínico. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion Cu⁺¹.

La curva de las diferentes concentraciones de BSA y las muestras problema fueron cargadas por duplicado y se utilizó la solución de trabajo de ácido bicinonínico la cual consta de 50 partes de ácido bicinonínico y 1 parte CuSO₄ (9 mL de ácido bicinoninico y 180µl de

CuSO₄) y se agregaron 160µl de la solución por pozo. Se incubó por 30 minutos a 37°C y posteriormente se lee a una longitud de onda de 562nm por medio del lector ELx808 Bio Tek.

Concentración	Volumen
2 µg/µl	Stock de Albúmina Sérica Bovina BSA
1.5µg/µl	45µl del Stock de BSA + 30µl de H ₂ O
1.0µg/µl	30µl de 1.5 µg/µl de BSA + 30µl de H ₂ O
0.75 µg/µl	30µl de 1.5 µg/µl de BSA + 30µl de H ₂ O
0.50 µg/µl	30µl de 1 µg/µl de BSA + 30µl de H ₂ O
0.25 µg/µl	30µl de 0.50 µg/µl de BSA + 30µl de H ₂ O

Tabla 4 La curva patrón se realiza a partir de un stock de 2 µg/µl y contiene las siguientes concentraciones a un volumen final de 60µl, a cada pozo se le agregan 10 µl de cada una de las concentraciones de la curva más 10µl de buffer de lisis 1x.

4.8 Electroforesis y transferencia de proteínas a membranas (WB).

El Western Blot es una técnica que permite separar una mezcla de distintas proteínas de acuerdo a su peso molecular (KDa), y posteriormente la detección con anticuerpos específicos de la proteína que se estudia. La técnica utiliza tres elementos para realizar esta tarea: La primera es la separación por tamaño, la segunda es la transferencia a un soporte sólido, y tercero el marcado de la proteína diana utilizando un anticuerpo primario y secundario adecuado para poder visualizarla (Mahmood, T., & Yang; P-C, 2012).

La proteína total se preparó de acuerdo a la cuantificación para cargar en el gel los microgramos necesarios de proteína, después se añadió el volumen necesario de buffer de carga 6X (Tabla 5) para que al final quede a una concentración de 1X y se agregó agua para complementar a un volumen final de 36 o 48µl.

Buffer 6X Componente	Concentración
4x Tris Cl/SDS pH 6.8	0.35M
DTT	0.6M
Glicerol	30%
SDS	10%
Azul de Bromofenol	0.012%

Tabla 5. Composición del buffer de carga 6X (utilizado al 1X)

La separación electroforética de las proteínas se realiza en geles de poliacrilamida al 10% (Tabla 6):

Gel Separador (10% Acrilamida)	
Solución	Volumen
30% acrilamida/8% bisacrilamida	7.5ml
4x Tris Cl/SDS pH 8.8	5.6ml
10% (w/v) persulfato de amonio	75µl
TEMED	30µl
H ₂ O	9.37ml
Gel Concentrador (3.9% Acrilamida)	
Solución	Volumen
30% acrilamida/8% bisacrilamida	1.3ml
4x Tris Cl/SDS pH 6.8	2.5ml
10% (w/v) persulfato de amonio	50µl
TEMED	20µl
H ₂ O	6.1ml

Tabla 6 Compuestos y volumen que conforman al gel separador al 10% y también al gel concentrador al 3.9%.

Se realizó electroforesis en buffer de corrida 1X (Tabla 7) a 20mA constantes por cada gely a un máximo voltaje (300V) durante dos horas. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF por un sistema semi seco, mediante una cámara TE70XP (Hoefer), con buffer de transferencia 1X (Tabla 8), las condiciones utilizadas fueron una corriente de 220 mA por 2 h. Las membranas posteriormente fueron bloqueadas con leche al 6% en PBS-T, después se lavan tres veces por 10 minutos con la solución PBS-T, al final de los lavados se incuban las membranas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (Tabla 9).

Buffer de electroforesis 5X Componente	Concentración
SDS	0.5%
Glicina	0.96M
Tris base	0.125M

Tabla 7 Composición del buffer de electroforesis 5X

Buffer de transferencia Componente	Concentración
Glicina	39 mM
Tris base	48 mM
SDS	0.037%
Metanol	20%

Tabla 8 Composición del buffer de transferencia

Anticuerpos Primarios						
Proteína	Anticuerpo	Peso (KDa)	Dilución	Condiciones	Marca	Epítotope
TRPV1	Policlonal de Cabra	95	1:1000 en leche al 3% con PBS-T	Incubar toda la noche a 4°C	Santa Cruz (P19)	N-terminal
SIG-1R	Policlonal de Cabra	26	1:1000 en leche al 3% con PBS-T	Incubar toda la noche a 4°C	Santa Cruz (S18)	C-terminal (aa 140-200)
GAPDH	Policlonal de Conejo	36	1:5000 en PBS-T	Incubar toda la noche a 4°C	Cell Signaling (14C10)	C-terminal
Actina	Monoclonal de Ratón	42	1:500 en PBS-T	Incubar toda la noche a 4°C	CINVEST AV	C-terminal

Tabla 9 Anticuerpos primarios con sus características y condiciones.

Al día siguiente se retiran los anticuerpos primarios y se realizan tres lavados por 10 minutos con la solución PBS-T (0.1%), posteriormente se incuba por una hora con el anticuerpo 2rio (Tabla 10), se realizan tres lavados y se adiciona el sustrato para la peroxidasa de rábano (Immobilon-Western) que está asociada al anticuerpo secundario, la señal quimioluminiscente liberada se capta con una placa radiográfica. Las placas se digitalizaron y procesaron con el programa ImageJ, mismo con el que se calculó el valor del área de bajo la curva de cada señal. Por último, se llevó a cabo normalización de la señal de TRPV1 respecto a los niveles de GAPDH, como control de carga.

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

Tabla 10 Anticuerpos secundarios con sus características y condiciones.

4.9 Ensayos de co-localización por fluorescencia

Esta técnica se utiliza para visualizar la localización de una proteína de interés fusionada a una proteína fluorescente. Para estos ensayos se prepararon cubreobjetos que fueron sumergidos en etanol al 70% para su flameado y secado, estos fueron colocados dentro de cajas Petri de 35 mm. Una vez que se secaron los cubre objetos se incubaron toda la noche a 4°C con poli D- lisina (1mg/ml), compuesto sintético que permite mayor adhesión por parte de las células al vidrio, al día siguiente se lavó 3 veces con Agua Mili Q estéril, se secaron y se realizó una exposición de 15 min en presencia de luz UV. Posteriormente se cultivaron las células sobre estos vidrios tratados, una vez adheridas las células fueron transfectadas con rTRPV1-cherry y Sig-1R-GFP. Al día siguiente sólo se les cambió el medio de cultivo.

A las 48 hrs post-transfección se retiró el medio de cultivo y se dieron tres lavados por cinco minutos con 2ml de PBS 1X. Una vez que concluyeron los lavados se agregó 1.5 ml a cada pozo de paraformaldehído al 4% en PBS y se incubó durante 15 minutos. a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados con 2ml de PBS 1X. El primer lavado solo sirve para quitar rápidamente el paraformaldehido, los últimos dos lavados son por 5 minutos. Después de los lavados, se montan las muestras sobre porta objetos con 10 a 15 µl

con medio de montaje Vectashield. (En todos los lavados se protegieron las muestras de la luz). Para la detección de las señales fluorescentes, las células fueron analizadas por microscopia confocal (La visualización celular se llevó a cabo usando un microscopio de escaneo láser confocal (ZEISS LSM 800) de la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología celular) empleando un objetivo de inmersión en aceite Neo Fluor 63x Plan (NA = 1,4).). Para la detección de la fluorescencia de la fusión rTRPV1-mCherry se usó un láser que excitó a la muestra con una longitud de onda de 587nm y la emisión fue observada a 610nm (que corresponde a color rojo) y para Sig-1R-GFP se usó un láser con longitud de onda de 475nm para excitar y la emisión es midio a 509nm (que corresponde a color verde). De cada muestra se realizaron cortes ópticos en Z para poder localizar las señales fluorescentes a nivel de membrana y de retículo endoplasmático.

4.10 Co-Inmunoprecipitación

La Co-inmunoprecipitación es un método que permite purificar o concentrar una proteína de interés, a través de unirla a un anticuerpo específico que está acoplado en un complejo anticuerpo-proteína A/G- perlas de agarosa. Por medio de este método podemos observar si hay interacción proteína-proteína. Se lavaron las perlas de PGA (Perlas de agarosa con la proteína G acoplada) para a eliminar interacciones inespecíficas, se realizó dos lavados agregando a 100ul de PGA, buffer de lavado (buffer de lisis 1X sin Complete Roche y sin 100mM de NaF, llevado a un volumen de 1 ml) y se centrifugó por 3 minutos a 7500. Posteriormente la PGA paso por un pre-equilibrio con buffer de lisis 1X con BSA al 2% (200µl de buffer de lisis 5X+200µl de BSA al 10% en H₂O + 600µl de H₂O), esta incubación se llevó a cabo por dos horas a 4°C (se repitieron los lavados con buffer de lisis 1x). Después del pre-equilibrio de la PGA, el lisado celular paso por un proceso de pre-clarificación por dos horas a 4°C con 50µl de PGA preequilibrada (PGA se llevó a un volumen final de 500 µl con buffer de lisis 1X) el preclarificado permite que aquellas proteínas con afinidad a la PGA se unan a esta, así se evita alguna unión inespecífica. Se centrifugó por 3 minutos a 7500 rpm y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente este sobrenadante se dividió en 2 tubos, a cada tubo se agregó el volumen necesario equivalente a la cantidad de proteína en µg que se requirió cargar (en este caso 2mg por tubo) se llevó cada muestra a volumen final de 1ml con buffer de lisis 1x. Se añadió en el primer tubo el anticuerpo que reconoce a la proteína de interés (IP) y el segundo tubo la inmunoglobulina irrelevante (IgG), ambas son

del mismo origen animal. Se utilizarón 2µg del anticuerpo que reconoce a Sig-1R (Anticuerpo policlonal de cabra, Santa cruz) o TRPV1 (Anticuerpo policlonal de conejo, Alomone Labs) (IP) y 2µg de IgG. Se incubaron con los anticuerpos a 4°C por una hora, y posteriormente se añadió 25µl de PGA a cada tubo y se dejó incubar toda la noche a 4°C con agitación. Al día siguiente se centrifugó por 2 minutos a 7500 rpm y se desechó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados en frio por cinco minutos con 1ml buffer de lisis 1X, en cada lavado se centrifugo por 2 minutos a 7500 rpm. Se realizaron otros lavados con 1ml de PBS 1X, y de igual manera se centrifugó por 2 minutos a 7500 rpm y se desechó el sobrenadante. Por último, se agregan 50ul de buffer de carga 1X. Antes de cargar en el gel de electroforesis las muestras se calientan 90°C por 5 minutos se agitan en el vortex y se centrifugan por un minuto a 3000 rpm, se toman 40µl de cada muestra para cargar teniendo cuidado de no tomar las perlas de PGA.

4.11 Ensayos de conducta

Este ensayo fue realizado en ratones machos adultos (8 a 10 semanas) de la cepa C57BL/6J silvestre, se midió el tiempo de lámido por diez minutos al inyectar capsaicina o su vehículo en la pata delantera. Se utilizaron tres grupos de trabajo:

- 1) El primer grupo (control 1) se inyectó en el lomo del ratón el vehículo de BD1063 (volumen de agua equivalente a 32mg/kg de peso del ratón) media hora antes del ensayo, transcurrida la media hora se inyectó en la pata delantera el vehículo de capsaicina (volumen de etanol equivalente a 2.8 µg de capsaicina proveniente de un stock de 10 µg/ µl cual se llevó a un volumen final de 10µl en solución salina).
- 2) El segundo grupo (control 2) se inyectó en el lomo del ratón el compuesto BD1063 (32mg/kg de peso del ratón) media hora antes del ensayo, transcurrido dicho tiempo se inyectó en la pata delantera el vehículo de capsaicina (volumen de etanol equivalente a 2.8 µg de capsaicina proveniente de un stock de 10 µg/ µl, la cual se llevó a un volumen final de 10µl en solución salina).
- 3) Y por último el tercer grupo (problema) se realizó inyectando en el lomo del compuesto BD1063 (32 mg/kg de peso del ratón) media hora antes del ensayo. Posteriormente se inyectó en la pata delantera 2.8µg de capsaicina (proveniente de un stock de 10 µg/ µl, la cual se llevó a un volumen final de 10µl en solución salina).

4.12 Análisis por Densitometría y Estadística.

Al haber obtenido al menos 3 experimentos independientes de cada uno de los tratamientos, se realiza la cuantificación de cada una de las bandas obtenidas de las placas de WB (densitometría) mediante el uso del programa ImageJ, se realizan los cálculos de normalización (señal de la banda del canal TRPV1 dividida entre la señal de GAPDH o Actina) y se realiza un análisis estadístico denominado prueba de T con el fin de establecer si existen diferencias significativas entre los tratamientos dados. Las gráficas de tratamientos contra niveles de expresión relativa, los cuales son el resultado de los promedios de los tres experimentos independientes de cada uno de los tratamientos dados. Todo esto mediante el uso del programa GraphPad Prism 5.0.

5 Resultados:

5.1 Construcción, aislamiento y clonación de Sig-1R-GFP

Reportes previos han demostrado la interacción de Sig -1R con distintos canales como por ejemplo Kv1.2, Kv1.3, Kv2.1, hERG, Nav1.5 y ASIC (Balasuriya et al., 2014; Balasuriya et al., 2012; Kinoshita et al., 2012; Kourrich et al., 2013; Mavlyutov et al., 2010), pero no ha sido descrita para algún canal TRP. Con el fin de abordar la incógnita de si la regulación de los niveles de TRPV1 se debe a una interacción proteína-proteína con Sig-1R, se procedió a aislar la secuencia codificante del Sig-1R para diseñar una fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) y realizar ensayos de co-localización por inmunofluorescencia y co-inmunoprecipitación.

Para ello, la secuencia codificante del Sig-1R se aisló a partir de ARN obtenido de la línea celular HEK293. El ARN total fue amplificado por medio de la técnica RT-PCR. Una vez obtenido el cDNA se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en este caso se amplificó la región correspondiente a Sig-1R de interés mediante el uso de primers específicos (Figura 4). El producto se clonó en el vector pCDNA3.1/CT-GFP-TOPO y posteriormente fue secuenciado para verificar que la fusión se encontrara en marco de lectura para ambas proteínas fusionadas (Sig-1R y GFP). Corroborado esto, el vector con la fusión se utilizó para ensayos de co-transfección con el vector pcDNA3.1-rTRPV1 en células HEK293 para distintos experimentos.

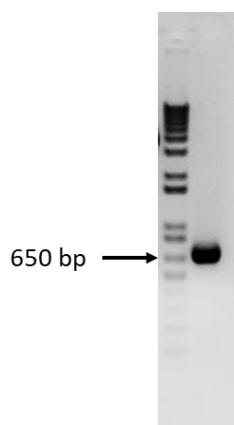


Fig. 4 Amplificación Sig-1R-GFP. En el gel de agarosa se observa la amplificación por PCR la secuencia codificante para Sig-1R.

Para comprobar la expresión adecuada de la proteína de fusión, en células HEK293 transfectadas con la construcción pcDNA3.1-Sig-1R-GFP se realizaron ensayos de WB se determinó la presencia de la proteína fusionada Sig-1R-GFP mediante el uso de un anticuerpo que reconoce un epítipo del Sig-1R. El primer carril corresponde a un cultivo sin transfectar, mientras que en el segundo carril se muestra un cultivo transfectado con la fusión Sig-1R-GFP, que genera una proteína con un peso molecular aproximadamente 52 kDa. GAPDH fue utilizado como control de carga en ambos carriles (Figura 5). Como se observa la fusión se expresa a la altura del peso molecular esperado y sólo se observa en las células transfectadas.

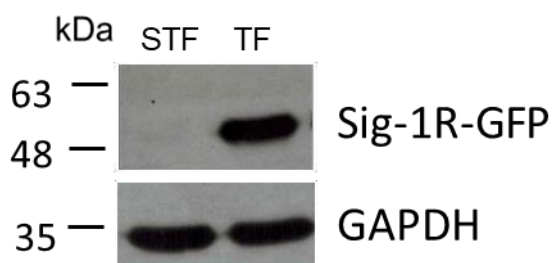


Fig. 5 Sobre expresión de la fusión Sig-1R-GFP. Carril 1 se muestra el WB de proteína derivada de un cultivo sin transfectar (STF) y el carril 2 muestra la señal de la fusión Sig-1R- GFP (proteína de células transfectadas, TF). El peso molecular esperado de la proteína de fusión corresponde a 52 kDa, señal que se observa claramente en el segundo carril. La inmunodetección de GAPDH se realizó como control de carga (n=2).

Confirmada la expresión adecuada de la proteína de fusión, ésta se usó esta para sobre-expresar los niveles Sig-1R en las células HEK293, y realizar experimentos de co-inmunoprecipitación y co-localización por fluorescencia.

5.2 Evaluación de la posible existencia de una interacción entre Sig-1R y TRPV1

Para determinar si hay una interacción entre Sig-1R con TRPV1 nuestro primer acercamiento fue co-expresar rTRPV1-mCherry y Sig-1R-GFP (ambas proteínas fluorescentes se encuentran fusionadas los carboxilos terminales de estas proteínas) en células HEK293 para ver si se encontraban en los mismos sitios intracelulares. Y se realizó un análisis de microscopía confocal. Sig-1R-GFP se excita a 395nm y emite a 509nm, y TRPV1-mCherry, la cual se excita a 587nm y emite a 610nm.

Los resultados muestran co-localización entre ambas proteínas, ya que hay una señal perinuclear la cual sugiere que TRPV1 y Sig-1R co-localizan con mayor intensidad en el retículo endoplásmico y menos en la membrana plasmática (Figura 6).

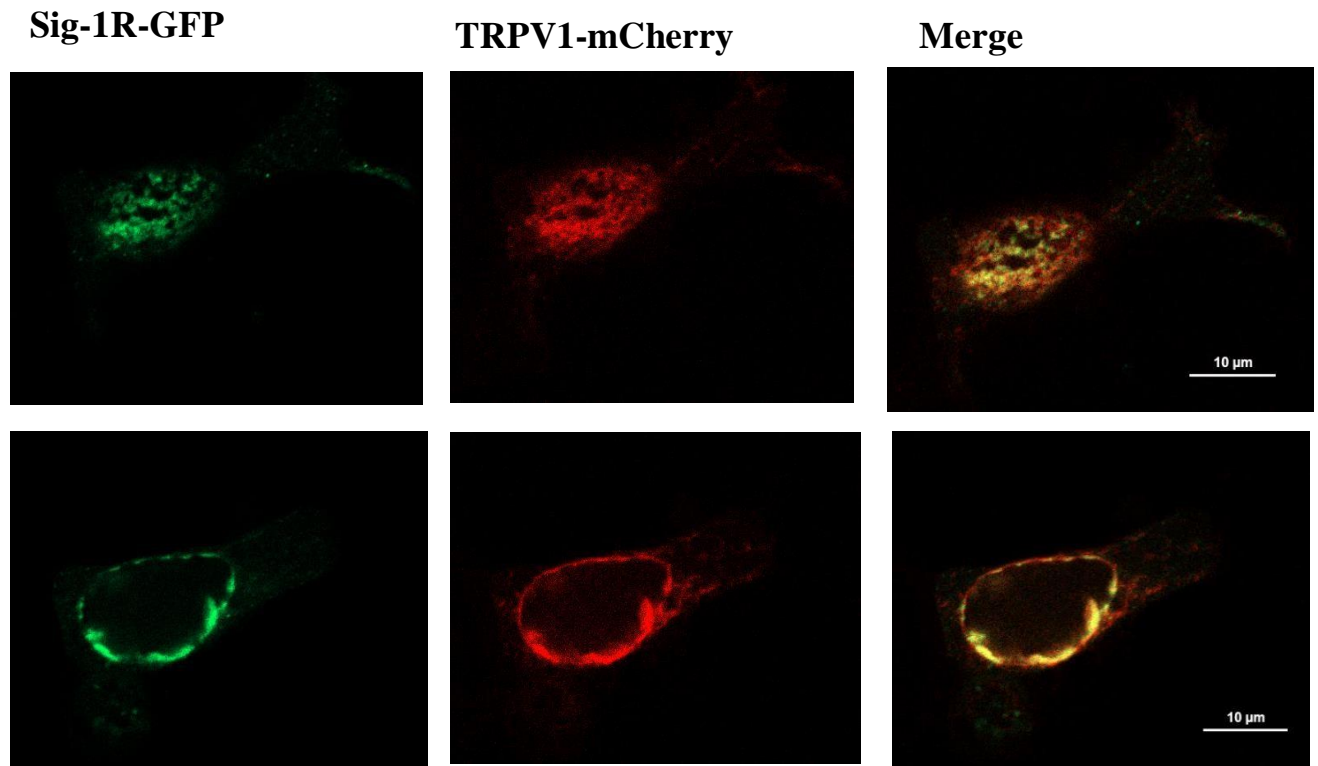


Fig. 6 Ensayos de fluorescencia Co-localización de TRPV1 y Sig-1R. Imágenes confocales (corte superior y medio) de células HEK293 con co-expresión transitoria de proteínas TRPV1-mCherry (rojo) y Sig-1R-GFP (verde). Merge (amarillo) muestra una fuerte co-localización de ambas proteínas alrededor del núcleo y menos en la membrana plasmática

5.3 Co-inmunoprecipitación

Una vez que se estableció que Sig-1R y TRPV1 co-localizan intracelularmente, se procedió a buscar una posible interacción entre ambas proteínas mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Este ensayo nos permite demostrar si hay una interacción entre TRPV1 y Sig-1R., por medio de esta técnica se inmunoprecipitó a Sig-1R o TRPV1 y por medio de Western Blot, con los anticuerpos específicos para cada una, se evaluó si había interacción entre ambas proteínas. Se obtuvieron extractos de proteína total de la línea celular HEK293 transfectadas de forma transitoria con rTRPV1 y Sig-1R-GFP. Se inmunoprecipitó a Sig-1R (Figura 7, panel inferior izquierdo, carril 2) y en el complejo protéico se observa que co-inmunoprecipita una banda con el peso correspondiente a TRPV1 sugiriéndonos una interacción entre ambas proteínas (Figura 7, panel superior izquierdo, carril 2). Esto se confirmó al realizar la inmunoprecipitación cruzada, inmunoprecipitando a TRPV1 (Fig 7, panel superior derecho, carril 2) y también se observa la co-inmunoprecipitación de la proteína Sig-1R-GFP en carril correspondiente al IP (Fig 7, panel inferior derecho, carril 2).

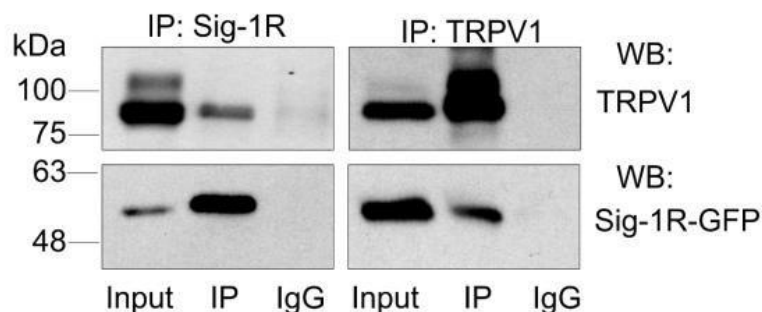


Fig 7. Ensayos de Co-inmunoprecipitación. Inmunoprecipitación de Sig-1R (izquierda) e inmunodetección de TRPV1 (arriba, izquierda) y Sig-1R (abajo, izquierda). Inmunoprecipitación de TRPV1 (derecha) e inmunodetección para TRPV1 (arriba, derecha) y Sig-1R (abajo, derecha). IP: inmunoprecipitado, IgG: control negativo.

Para descartar que la interacción observada entre TRPV1 y Sig-1R-GFP mostrada en el co-inmunoprecipitado anterior fuera mediada por la proteína verde fluorescente (GFP), se realizó un co-inmunoprecipitado en células HEK293 transfectadas de forma transitoria con TRPV1 y GFP (Figura 8).

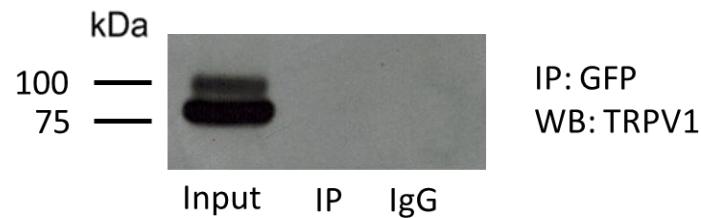


Fig 8 Co-Inmunoprecipitación de Sig-1R. En este ensayo se inmunoprecipitó a GFP, para posteriormente preguntar si en este complejo se encuentra TRPV1 interaccionando. En este caso se puede observar que en el IP (segundo carril) no aparece TRPV1 por lo tanto la interacción esta mediada por Sig-1R y no por GFP.

En el IP no aparece TRPV1 esto nos indica que la interacción no está mediada por GFP si no de forma directa con la chaperona Sig-1R.

5.4 El antagonismo de Sig-1R altera la nocicepción en ratones tratados con BD1063

Finamente evaluamos la repercusión fisiológica de la interacción entre Sig-1R y TRPV1.

Para ello, utilizamos un antagonista del Sig-1R, el BD1063, el cual evita su asociación con sus proteínas blanco. Este compuesto se inyectó a los ratones C57BL/6J (32 mg/ kg) (Nieto et al., 2014) intraescapularmente 30 minutos antes de la inyección de capsaicina (2,8 μ g) en una de sus patas y se evaluó el tiempo total de lamido de la pata durante un período de 10 min. Los resultados de estos experimentos (Figura 9) muestran que, el pretratamiento con BD1063 produjo una disminución significativa (22.7 ± 3.13 s) en la respuesta al dolor asociada a capsaicina (similar al grupo control que solo recibió los vehículos de ambos compuestos que fue de 20.13 ± 1.78 s) comparada con el grupo que solo recibió el vehículo de BD1063 y capsaicina en las patas (65.00 ± 5.86 s), estos resultados muestran que el antagonismo de Sig-1R modifica la respuesta nociceptiva dependiente de TRPV1.

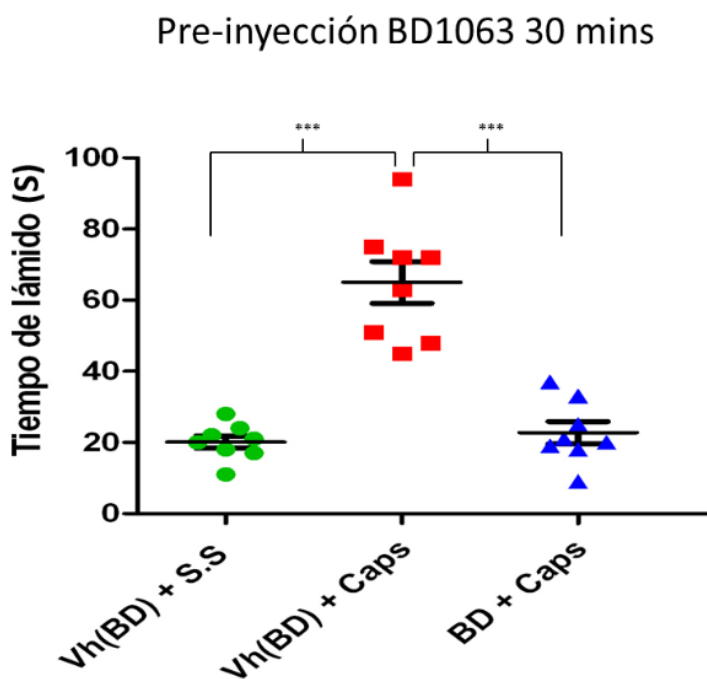


Fig 9 Conducta de dolor en animales tratados con BD1063 30 minutos antes. En la gráfica se muestra a cada animal utilizado en la distinta prueba, representado por puntos. En cada grupo se muestra su media y error estándar. Se registró menor dolor en el grupo 1 (20.13 ± 1.78 s) el cual consta de los controles (BD1063 y capsaicina). En el grupo dos que consta de una inyección subcutánea del vehículo de BD1063 y una intradérmica de capsaicina presentó una gran cantidad de dolor (65.00 ± 5.86), comparado con el grupo 3 que recibió la inyección subcutánea de BD1063 (32mg/Kg) media hora antes de la inyección intradérmica de capsaicina presento poco dolor. Se utilizaron 8 animales por grupo y se aplicó la prueba de t-student con un valor de $***p < 0.05$.

5.5 Inhibición de Sig-1R altera los niveles de TRPV1 en DRG'S

Con los resultados anteriores en el cual el dolor agudo disminuye por efecto de los tratamientos con BD1063, se indagó en que le sucedía al canal TRPV1. Por lo tanto, los tratamientos con el antagonista de Sig-1R se repitieron y se extrajeron los ganglios de la raíz dorsal 30 minutos después del tratamiento.

Hubo una disminución significativa en la expresión del canal de un 60.2% comparada con el control. Esto nos confirma que el compuesto BD1063 es un agente que puede disminuir la expresión del canal TRPV1, a través de la inhibición de la proteína Sigma 1 receptor; lo cual termina por señalar la relación que existe entre TRPV1 y Sig-1R (Figura 10).

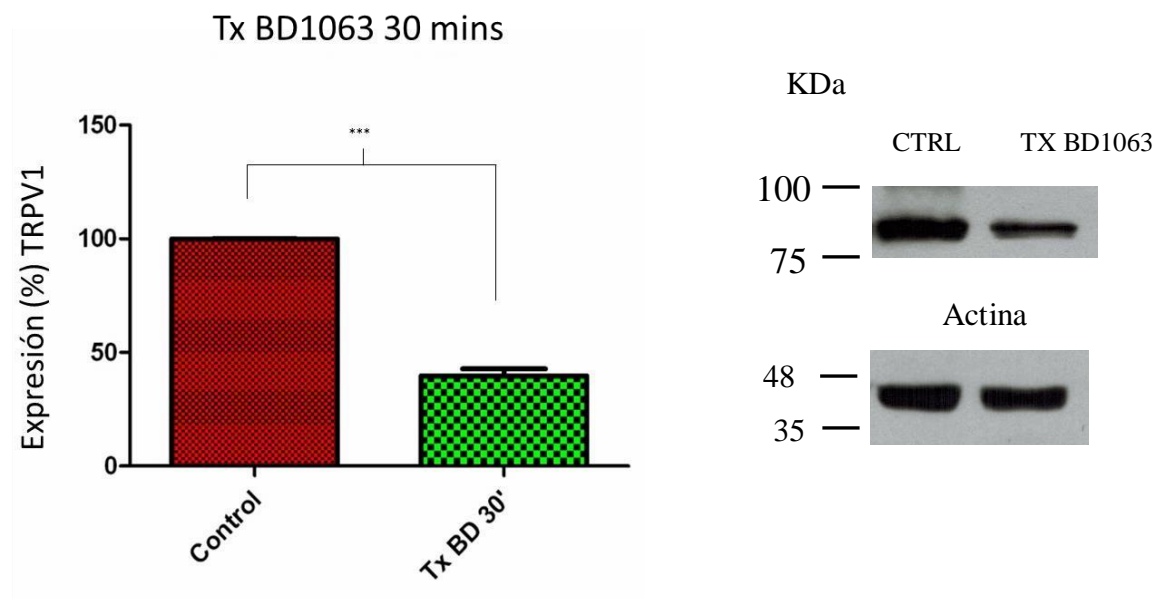


Fig 10. En la gráfica se muestran los tratamientos con BD1063 por 30 minutos, la media de los ratones tratados es de 39.72 ± 3.06 , indicando que hubo una disminución de más de un 50% en la expresión del canal TRPV1 (n=4). Se aplicó la prueba de t-student con un valor de $***p < 0.05$

6. Discusión

El canal TRPV1 es una proteína fundamental en la detección de estímulos nocivos. Es un canal polimodal, ya que puede ser activado por diferentes vías, ya sea por diferentes compuestos químicos exógenos, o por medio de estímulos físicos como temperatura, y de manera endógena por pH extracelular ácido o compuestos liberados durante la inflamación (Revisado en Morales-Lázaro S, et al. 2013). Por sus funciones en la nocicepción, TRPV1 es de gran importancia en la generación de dolor en distintos tipos de neuropatías tales como la neuropatía diabética, la irritación intestinal, la artritis y el cáncer (Nilius y Flockerzi, 2014) por lo que se le considera un blanco para inhibir o atenuar el dolor.

El canal TRPV1 se puede regular por dos maneras. La primera es cambiando la probabilidad de apertura del canal y la segunda manera es controlando el número de canales disponibles en la membrana plasmática de las células. Ambos procesos pueden dar como resultado una disminución de la excitabilidad de los nociceptores y la reducción del dolor. La probabilidad de apertura de TRPV1 puede ser disminuido por algunos reguladores naturales como por ejemplo el ácido oleico, el cual estabiliza el estado cerrado del canal (Morales-Lázaro, et al. 2016). Por otro lado, el número de canales disponibles puede reducirse eliminando los canales de la membrana plasmática por las proteínas que afectan el tráfico del canal. Sin embargo, hasta la fecha, las interacciones de TRPV1 con proteínas tales como chaperones que potencialmente podrían regular el tráfico hacia la membrana plasmática, así como las implicaciones fisiológicas de esta regulación, no han sido descritas.

Ha incrementado el interés en las proteínas intracelulares implicadas en la regulación de TRPV1. En este proyecto se propuso a la chaperona Sig-1R por sus distintas funciones a nivel intracelular y por su regulación por distintos ligandos. Por otra parte, gracias a la caracterización del Sig-1R (Martin et al., 1976; Su, 1982), se ha demostrado que este receptor está implicado en diversos procesos biológicos y patológicos, por lo que también ha sido considerado como un blanco terapéutico en muchas enfermedades del sistema nervioso central en seres humanos (Maurice and Lockhart, 1997; Maurice et al., 2002; Maurice and Su, 2009). El Sig-1R, es un factor importante en distintos procesos de nocicepción, ya que diversos experimentos muestran que antagonistas de este receptor ayudan a atenuar el dolor (Ultenius C, et.al 2006, Entrena, J.M et.al 2009, Kwon, Y et.al 2009), por otra parte se sabe

también que agonistas del mismo pueden tener una función opuesta, ya que son capaces de generar dolor (Xiao-Fei *et al.*, 2012; Zamanillo *et al.*, 2013) por todo lo anterior en los últimos años esta chaperona se ha vuelto un blanco importante para tratar patologías que involucran dolor crónico (Cobos *et al.*, 2008; Zamanillo *et al.*, 2013).

La construcción de la fusión Sig-1R y la proteína GFP (figura 4), permitió sobre expresar a Sig-1R. Se ha reportado que Sig-1R y TRPV1 no interactúan entre ellos ya sea por ensayos de co-inmunoprecipitación e inmunocitoquímica (Juárez R, 2016), ya que a pesar de que Sig-1R se expresa de manera endógena en la línea celular HEK293 (Cobos *et al.*, 2008; Crottès *et al.*, 2013) sus niveles de expresión no son suficientes para observar una interacción con TRPV1.

Después de haber obtenido la fusión, se transfectaron células HEK293, en las cuales se confirmó la presencia de la fusión (52KDa) (figura 5). Además, que la integración de la GFP, permitió la visualización o detección del receptor sigma 1 en los ensayos de fluorescencia. En estos ensayos se observa co-localización entre el Sig-1R y la fusión TRPV1-cherry, indicándonos que Sig-1R y TRPV1 se encuentran en los mismos sitios celulares, como se muestra en el traslape (figura 6), y se encuentra alrededor del núcleo en la parte que corresponde al retículo endoplasmático y muy poco en la membrana. Este resultado coincide a que haya una mayor presencia de Sig-1R y TRPV1 en el retículo, ya que en los canales hERG, Sig-1Rs potencia la transposición de las subunidades de los canales que se encuentran el retículo y luego al aparato de Golgi (Balasuriya *et al.*, 2014), lo que conduce a un aumento en el número de canales funcionales en la membrana plasmática.

Una vez observada la colocación, se procedió a realizar ensayos de co-inmunoprecipitación. Al inmunoprecipitar a Sig-1R si hay interacción con TRPV1 ya que precipitan en el mismo complejo, lo mismo se observa cuando se inmunoprecipita a TRPV1 y se inmunodetecta a Sig-1R (figura 7). Para comprobar que esta interacción es realmente entre TRPV1 y Sig-1R; y no entre TRPV1 y el GFP de la fusión, se realizó la inmunoprecipitación de GFP donde se muestra que no hay interacción con TRPV1 (figura 8). Lo cual resulta interesante ya que se reportó (Su Tsung Ping, *et al.* 2016) una lista de las distintas proteínas reportadas que se encuentran asociadas o que por sus características

podrían estar asociadas a Sig-1R, lista en la que cabe resaltar que no se había reportado al canal TRPV1.

Una vez que se comprobó la interacción entre estas proteínas surgió la pregunta de lo que podría suceder con esta interacción entre Sig-1R y TRPV1, pero ahora usando un antagonista de Sig-1R el cual bloquea su actividad de chaperona (Hayashi y Su, 2007). Por lo tanto, se procedió a inyectar a ratones el compuesto BD1063 y media hora después se extrajeron las DRG's. Los resultados muestran que hay una disminución del canal TRPV1 en más de un cincuenta por ciento (figura 9). Esta disminución se debe a que el compuesto BD1063 promueve a que haya una mayor interacción entre Sig-1R y BiP (Hayashi y Su, 2007) esta interacción da como resultado el bloqueo de la actividad de chaperona Sig-1R, esto explicaría que TRPV1 no sea asistida por Sig-1R y no obtenga un plegamiento adecuado y esto promueva su degradación, ya que los polipéptidos mal plegados o incompletamente procesados son expulsados del retículo y degradados por la vía del proteosoma 26S (Merulla et al., 2013). Además, mientras que los agonistas de Sig-1R promueven las conformaciones de monómeros y/o dímeros que permiten las interacciones de la chaperona con otras proteínas, los antagonistas tales como BD1063 y P4 promueven una forma oligomérica de la proteína que no permite que lleve a cabo sus funciones (Mishra AK, et al. 2015).

Una vez determinada esta disminución de canales TRPV1, esto podría representar un proceso clave a nivel fisiológico, sobre todo en la nocicepción. Para esclarecer este proceso se realizaron ensayos de dolor agudo a tiempos cortos, en el cual los ratones recibieron una inyección con el antagonista BD1063 y media hora después fueron inyectados en la extremidad delantera con capsaicina. Los ratones tratados con BD1063 tuvieron una disminución del dolor de forma significativa teniendo un tiempo promedio de lamido de 22.7 ± 3.13 segundos comparada con el grupo control al cual se le inyectó el vehículo de BD1063 y capsaicina teniendo un tiempo de lamido de 65.00 ± 5.86 (figura 7), indicándonos la participación directa de Sig-1R en procesos de nocicepción mediado por TRPV1. Lo cual concuerda con lo reportado por Entrena en un modelo de hiperalgesia mecánica generado por capsaicina, en el cual el antagonista de BD1047 disminuye el dolor a tiempos cortos. Pero cabe resaltar que dicho trabajo no se establece ninguna relación entre Sig-1R y TRPV1, más bien solo se enfatiza la participación de Sig-1R en procesos de nocicepción.

Poco se sabe de Sig-1R, ya que después de 20 años de su clonación hasta hace poco se logró obtener su estructura cristalográfica (Su *et al.*, 2016) y como es capaz de modular distintas señalizaciones intracelulares por medio de su asociación a distintas proteínas (Su *et al.*, 2016). Juntos, estos resultados aportan información sobre un mecanismo en el que las chaperonas, específicamente Sig-1R, pueden interactuar con TRPV1. y como los ligandos de Sig-1R pueden modificar la respuesta al dolor, lo cual en un futuro se puede traducir como un posible tratamiento para atenuar padecimientos como por ejemplo el dolor crónico.

7. Conclusiones

- En el presente trabajo se logró clonar y expresar a Sig-1R fusionado a GFP de manera exitosa en las células HEK293 al transfectarlas con el plásmido que contiene la construcción.
- Se demostró por ensayos de fluorescencia que tanto Sig-1R y TRPV1 colocalizan en el área perinuclear.
- Se demostró por medio de ensayos de Co-inmunoprecipitación se demostró la interacción entre TRPV1 y Sig-1R, y que esta interacción no está mediada por GFP.
- Se obtuvo como resultado que la expresión del canal TRPV1 disminuye en los ganglios de la raíz dorsal al pre-tratar a los ratones con el antagonista de Sig-1R BD1063.
- Por medio de ensayos de conducta de dolor agudo generado por capsaicina, al pre-tratar a los ratones con el antagonista de Sig-1R BD1063, presentaron una menor respuesta de dolor comparado con aquellos que solo recibieron el vehículo del compuesto BD1063.

8. Perspectivas

En este trabajo se abordó si existía una posible interacción entre Sig-1R y TRPV1, los ensayos de fluorescencia indican que estas dos proteínas co-localizan en un área perinuclear, además de que los ensayos de Co-inmunoprecipitación nos demuestran interacción entre TRPV1 y Sig-1R.

Además, que tratamientos a tiempos cortos con el antagonista de Sig-1R marcan un descenso en los niveles de TRPV1 además que esto tiene un efecto fisiológico ya que ayuda a disminuir la nocicepción mediada por TRPV1.

Por consiguiente, nos gustaría probar si tratamientos con distintos agonistas de Sig-1R causan que la interacción entre TRPV1 y Sig-1R disminuya, además de probar distintos dominios del canal TRPV1 y comprobar donde ocurre esta interacción. Por último, investigar si Sig-1R también interactúa con otros canales de la familia TRP, sobre todo con aquellos que también participan en procesos de nocicepción, como por ejemplo el canal TRPV4, TRPA1 y TRPM8.

9. Bibliografía

- 1.- Ho, K; Ward, N; & Kalkins, D. (2012), TRPV1: a stress response protein in the central nervous system, *Am J Neurodegener Dis*, 1(1), 1-14.
- 2.- Jie Zheng & Matthew C. Trudeau. (2015). *Handbook of ion channels*. Florida: CRC Press.
- 3.- Liedtke & Heller. (2007); *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades*, Florida: CRC Press.
- 4.- Morales-Lázaro et.al (2013), The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), *The journal of Physiology*, 591(13): 3109-3121.
- 5.- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M & Gordon SE; (2004). Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123, 53–62,
- 6.- Salazar, H; Jara-Osegura, A & Rosenbaum, T. (2009). El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor, *Revista de Neurobiología*, 48(7): 357-364.
- 7.- Darré; L, Furini; S & Domene; C. 2014. Permeation and Dynamics of an Open-Activated TRPV1 Channel. *Journal of Molecular Biology*. 427(2): 537-549
- 8.- Prescott, E & Julius, D. (2003). A modular PIP₂ binding site as a determinant for capsaicin receptor sensitivity, *Science*, 300(5623): 1284-1288.
- 9.- Lishko, P; Procko, E; Ji, X; Phelps, C & Gaudet, R.(2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*. 54, 905-918.
- 10.- Zheng J, Yarov-Yarovoy V. Song Z., Yu P., Yang W., Cheng W., Xiao X., Yang F. (2015). Structural Mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nature Chemical Biology*. 11(7): 518-524.
- 11.- Hans Heldrich & Gillian Bullock. (2004). *Routes of Administration. The laboratory mouse* (527-541). Oxford: Elsevier.

- 12.- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- 13.- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178.
- 14.- Philippeos; C, Hughes; R, Dhawan & A, Mitry; R, (2012), *Human Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 806, 1-13
- 15.- E. D., Samelson, B. K., Belugin, S., Akopian, A. N., Scott, J. D., & Jeske, N. A. (2010). PP2B/calcineurin-mediated desensitization of TRPV1 does not require AKAP150. *The Biochemical Journal*, 432(3), 549–556.
- 16.- Hanner, M. et al. (1996) Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl.Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8072–8077)
- 17.- Moebius, F.F. et al. (1997) High affinity of sigma 1-binding sites for sterol isomerization inhibitors: evidence for a pharmacological relationship with the yeast sterol C8-C7 isomerase. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1–6.
- 18.- Hayashi, T. and Su, T.P. (2001) Regulating ankyrin dynamics: roles of sigma-1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 491–496.
- 19.-Soriani, O. et al. (1999) A-Current down-modulated by sigma receptor in frog pituitary melanotrope cells through a G protein-dependent pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 321–328
- 20.- Pal, A. et al. (2007) Identification of regions of the sigma-1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe. *Mol. Pharmacol.* 72,921–933.
- 21.- Su, T.-P., Hayashi, T., M, Tangui., B, Shilpa., Ruoho, A, E (2010), The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator, *Cell press Volume 31, Issue 12, December 2010, Pages 557–566.*
- 22.- Brammer, M. K., Gilmore, D. L., & Matsumoto, R. R. (2006). Interactions between 3,4-methylenedioxymethamphetamine and σ_1 Receptors. *European Journal of Pharmacology*, 553(1-3), 141–145.
- 23.- Burry, R. W. (2011). Controls for Immunocytochemistry: An Update. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59(1), 6–12.

- 24.- Matsumoto, R. R., 2007. σ Receptors: historical perspective and background. In *Sigma Receptors* (pp. 1-23). Springer US.
- 25.- Schmidt, H. R., Zheng, S., Gurbinar, E., Koehl, A., Manglik, A., & Kruse, A. C., 2016. Crystal structure of the human σ_1 receptor. *Nature*, 532(7600), 527-530.
- 26.- Hille B. *Ion channel of excitable membranes*. 3rdedn, Sunderland MA: Sinauer, 2001.
- 27.- Yu FH et al. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev* 2005; 57:387–295.
- 28.- Waxman, S; Zamponi, G; 2014, Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channels pathways, *Nature Neuroscience* 17(2), 153-163.
- 29.- Kwon, Y. B., Jeong, Y. C., Kwon, J. K., Son, J. S., & Kim, K. W., 2009. The antinociceptive effect of sigma-1 receptor antagonist, BD1047, in a capsaicin induced headache model in rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 13(6), 425-429.
- 30.- Entrena JM, Cobos EJ, Nieto FR, Cendán CM, Gris G, Del Pozo E, Zamanillo D, Baeyens JM., 2009. Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: Studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *PAIN*. Vol.143 P.252-261.
- 31.- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772.
- 32.- Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Baeyens JM. Antinociceptive effects of haloperidol and its metabolites in the formalin test in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 182: 485–93.
- 33.- Cendán CM, Pujalte JM, Portillo-Salido E, Montoliu L, Baeyens JM. Formalin induced pain is reduced in σ_1 receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 2005;511:73–4.
- 34.- Kim HW, Kwon YB, Roh DH, Yoon SY, Han HJ, Kim KW, Beitz AJ, Lee JH. Intrathecal treatment with sigma-1 receptor antagonists reduces formalin induced phosphorylation of NMDA receptor subunit 1 and the second phase of formalin test in mice. *Br J Pharmacol* 2006;148:490–8.
- 35.- Ultenius C, Linderöth B, Meyerson BA, Wallin J. Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci Lett* 2006;399:85–90.

- 36.- Alonso, G., Phan, V., Guillemain, I., Saunier, M., Legrand, A., Anoa, M., Maurice, T., 2000. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 97, 155–170.
- 37.- Kitaichi, K., Chabot, J.G., Moebius, F. F., Flandorfer, A., Glossmann, H., Quirion, R., 2000. Expression of the purported sigma(1) (sigma(1)) receptor in the mammalian brain and its possible relevance in deficits induced by antagonism of the NMDA receptor complex as revealed using antisense strategy. *J. Chem. Neuroanat.* 20, 375–387.
- 38.- Coico R & Sunshine G, 2015. *Immunology: A Short Course*. Septima edición. Edit. John Wiley & Sons. P. 76
- 39.- Willis y Coggeshall. 2004. *Sensory mechanisms of the spinal cord*. Vol. 1 Primary Afferent Neurons and the Spinal Dorsal Horn. 3era ed. Edit. Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- 40.- Moebius FF, Striessnig J, Glossmann H (Mar 1997). "The mysteries of sigma receptors: new family members reveal a role in cholesterol synthesis". *Trends in Pharmacological Sciences*. 18 (3): 67–70
- 41.- Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoa M, Maurice T. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 2000;97:155–70.
- 42.- Roth, M.D. et al. (2005) Cocaine and sigma-1 receptors modulate HIV infection, chemokine receptors, and the HPA axis in the huPBL-SCID model. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1198–1203
- 43.- Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, Jackson MB (2002) The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* 34:399–410
- 44.- Lainez, S., Valente, P., Ontoria-Oviedo, I., Estevez-Herrera, J., Camprubi-Robles, M., Ferrer-Montiel, A., and Planells-Cases, R. (2010). GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *FASEB J* 24, 1958-1970.
- 45.- Fujimoto M & Hayashi T, 2011. New Insights into the Role of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane. *Int Rev Cell Mol Biol*. Vol.292 P.73-117.
- 46.- Morales-Lázaro SL, et al. (2016) Inhibition of TRPV1 channels by a naturally occurring omega-9 fatty acid reduces pain and itch. *Nat Commun* 7:13092.

- 47.- Mishra AK, et al. (2015) The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. *Biochem J* 466: 263–271.
- 48.- Nilius y Flockerzi, 2014. Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) cation channels. Edit. Springer
- 49.- Carnally SM, Johannessen M, Henderson RM, Jackson MB, Edwardson JM (2010) Demonstration of a direct interaction between sigma-1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophys J* 98:1182–1191.