



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIMORFISMO SEXUAL EN LA RESPUESTA DE  
DOLOR ASOCIADA AL CANAL TRPV1 POR  
EFECTO DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**CARLA HUEZCA CARBAJAL**



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

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MÉX., 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyectos IA202717 e IN206819. “Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida”**

**Este proyecto también fue financiado por la Estímulos a investigaciones médicas, Fundación Miguel Alemán A.C.**

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma de México por otorgarme un lugar para mi formación académica.

A la M. en C. María Escalante Gonzalbo y Francisco Pérez Eugenio por su soporte técnico (unidad de Computo del Instituto de Fisiología, UNAM).

Al Dr. Héctor Alfonso Malagón Rivero por su apoyo con el mantenimiento y manipulación de animales (unidad de bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

A la Dra. Tamara Rosenbaum Emir, por permitirme el uso del laboratorio donde se realizó este trabajo.

Al laboratorista Félix Sierra Ramírez por su apoyo técnico y guía en procedimiento de ovariectomización.

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

Al comité sinodal formado por el Dr. Ricardo González Ramírez, la Dra. Cinthia Rocío Juárez Tapia, el M.V.Z Héctor Alfonso Malagón Rivero y la Dra. Laura María Ongay Larios, por sus valiosas aportaciones y comentarios al presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Rebeca y Miguel por haberme acompañado, instruido y apoyado en el desarrollo del presente trabajo.

A mi tutora la Dra. Sara Luz Morales Lázaro por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, enseñanzas, consejos así como su tiempo para la discusión del presente trabajo.

A todos aquellos admirables profesores conocí durante mi formación y que hicieron que me emocionará cada día más por esta hermosa ciencia y que además me han dado la oportunidad de tener una visión multidisciplinaria de la misma. Ahora me encuentro en la búsqueda de algo que me apasione del mismo modo y espero algún

día poder transmitir un poco de esa pasión a alguien más, como ustedes lo hacen. Por mencionar algunos, Alfonso Torre Blanco, Angélica González Oliver, Mariana Guadalupe Cartajena Alcántara, Judith Márquez Guzmán, Sara Luz Morales Lázaro, Leobardo Terpán Acuña.

A Carlos un amigo que me acompañó a lo largo de toda a carrera con quien compartí memorables momentos y quien me apoyo durante tanto tiempo.

A Leticia por ser una amiga desde hace mucho tiempo que siempre ha estado ahí.

A mis padres Juan Carlos y Margarita y hermano Juan Carlos por su amor, apoyo y consejos, por haber estado conmigo en los buenos y malos momentos, que siempre me han motivado a continuar con mis propósitos. Son las personas más importantes en mi vida y un ejemplo para mí.

Gracias a todos.

*Con mucho amor para mis padres Juan  
Carlos y Margarita y mi hermano Juan  
Carlos.*



# ÍNDICE

Abreviaturas	
Resumen	
I. Introducción .....	1
1.1. El dolor .....	1
1.2. La familia TRP como receptores de estímulos nociceptivos .....	2
1.3. El canal TRPV1 .....	4
1.4. Diferencias en la percepción del dolor entre mujeres y hombres .....	7
1.5. Hormona gonadal $17\beta$ - estradiol .....	7
1.6. Los receptores del $17\beta$ -estradiol .....	9
1.7. Relación entre el canal TRPV1 y el $17\beta$ -estradiol .....	13
II. Hipótesis .....	14
III. Objetivo general .....	14
IV. Objetivos particulares .....	14
V. Materiales y métodos.....	15
5.1. Animales y extracción de tejido .....	15
5.2. Ovariectomización.....	15
5.3. Extracción de RNA total .....	16
5.4. RT-PCR (transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa)...	17
5.5. PCR semicuantitativa .....	21
5.6. Obtención de proteína total .....	22
5.7. Cuantificación de proteína total .....	23
5.8. Ensayos de Western Blot (WB).....	23
5.9. Ensayo de dolor agudo .....	27
5.9.1. Ensayos de conducta de dolor agudo en machos y hembras C57BL/6	27
5.9.2. Ensayos de conducta de dolor agudo en machos coinyectados con	
$17\beta$ -estradiol y capsaicina .....	27
5.10. Análisis por Densitometría y Estadística .....	28
5.11. Análisis in silico de los sitios potenciales de unión de los receptores	
nucleares de estrógeno en la región promotora del canal TRPV1 .....	28
VI. Resultados.....	29

6.1.	Ensayos de dolor agudo con capsaicina entre ratones de ambos sexos de la cepa C57BL/6.....	29
6.2.	Expresión de los receptores a estrógeno nucleares (ER $\alpha$ y ER $\beta$ ) y de membrana (GPR30) en DRG de macho y hembra C57BL/6 .....	30
6.3.	Cuantificación y comparación de la expresión del mRNA de ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPR30 y del canal TRPV1 entre ratones machos y hembras C57BL/6.....	31
6.4.	Cuantificación y comparación entre ratones machos y hembras C57BL/6 de los receptores de estrógeno ER $\alpha$ , ER $\beta$ y GPR30 a nivel de proteína.....	35
6.5.	Comparación de los niveles de expresión del canal TRPV1 entre ratones C57BL/6 machos y hembras ovariectomizadas .....	39
6.6.	Ensayos de conducta de dolor agudo en machos C57BL/6 co-inyectados con E2 y capsaicina .....	40
VII.	Discusión .....	41
VIII.	Conclusiones .....	50
IX.	Perspectivas .....	51
X.	Referencias.....	52



## Abreviaturas

**17 $\beta$ -HSD** 17 $\beta$  hidroxiesteroide  
deshidrogenasa

**5H** Serotonina

**AEA** Anandamida

**ANT** Proteína transportadora de  
nucleótidos adenina

**AP-1** proteína activadora 1

**ATP** Adenosín trifosfato

**cAMP** Adenosín monofosfato cíclico

**cDNA** DNA complementario

**DBD** Dominio de unión al DNA

**DGA** Diacilglicerol

**DHEA** Dehidroepiandrosterona

**dNTPs** desoxirribonucleótidos  
trifosfatados

**DRGs** Ganglios de la raíz dorsal

**E1** Estrona

**E2** 17 $\beta$ - estradiol

**E3** Estriol

**EGF** Factor de crecimiento  
epidérmico

**ERE** Elementos de respuesta a  
estrógeno

**ER $\alpha$**  Receptor de estrógeno alfa

**ER $\beta$**  Recetor de estrógeno

**FGF-2** Factor de crecimiento de  
fibroblastos-2

**GAPDH** Gliceraldehído 3-fosfato  
deshidrogenasa

**HRP** Peroxidasa de rábano

**IGF-1** Factor de crecimiento similar a  
la insulina

**IP3** Inositol trifisfato

**LBD** Dominio de unión a ligando

**LPA** Ácido lisofosfatídico

**NADA** N-araquidonoil dopamina

**NGF** Factor de crecimiento neuronal

**NO** Óxido nítrico

**OVX** Ovariectomizadas

**PBS** Buffer de fosfatos

**PBS-T** Buffer de fosfatos

complementado con Tween20

**PCR** Reacción en cadena de la  
polimerasa

**PVDF** difluoruro de polivideno

**RT-PCR** transcripción reversa-  
reacción en cadena de la polimerasa

**RTX** Resiniferatoxina

**Sp1** Proteína estimuladora 1

**StAR** Proteína reguladora aguda  
esteroidogénica

**TRP** Receptores de potencial transitorio

**TRPA** Receptores de potencial transitorio anquirina

**TRPC** Receptores de potencial transitorio canónica

**TRPM** Receptores de potencial transitorio melastatina

**TRPML** Receptores de potencial transitorio mucolipina

**TRPN** Receptores de potencial transitorio NO mecano potencial-C

**TRPP** Receptores de potencial transitorio policistina

**TRPV** Receptores de potencial transitorio vaniloide

**TRPV1** Receptores de potencial transitorio vaniloide 1

**TSPO** Proteína translocadora

**VDAC** Proteína del canal aniónico dependiente de voltaje

**WB** Ensayo de Western Blot

## Resumen

El dolor o nocicepción es una experiencia sensorial y emocional desagradable que proporciona una señal de advertencia de daño potencial o real que da como resultado una serie de conductas dirigidas a aliviar o terminar la experiencia. El estudio de la naturaleza del dolor y la búsqueda de agentes que puedan contrarrestarlo, han sido temas importantes para la medicina moderna. Conjuntamente, existe mucho interés por el estudio del dimorfismo en la percepción del dolor entre sexos, y se ha demostrado que en ciertas condiciones las mujeres presentan un menor umbral y una menor tolerancia al dolor. Uno de los factores al que se le ha atribuido estas diferencias en la percepción del dolor son las hormonas. Particularmente, el estrógeno ha sido propuesto como hormona que participa en la regulación nociceptiva, aunque aún no es claro si tiene un efecto anti o pro-nociceptivo. Por otro lado, cabe señalar que los estrógenos regulan a sus blancos moleculares por medio de dos mecanismos: genómicos y no genómicos, ambos efectos mediante receptores nucleares y de membrana.

El canal TRPV1 es un transductor de señales nocivas que ha sido ampliamente relacionado con patologías de dolor crónico. La regulación de este canal por efecto de estrógenos se ha demostrado en ratones que carecen de los receptores a estrógenos en los cuales hay una disminución del canal TRPV1. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar si existe un dimorfismo sexual en la expresión del canal TRPV1 y los receptores de estrógenos y su relación con la respuesta de dolor en ratones de la cepa C57BL/6. Demostramos que los machos tienen una mayor respuesta de dolor a capsaicina (activador del canal TRPV1) en comparación con las hembras. Además, a nivel molecular, se determinó que existen diferencias de expresión de este canal entre animales de diferente sexo. Interesantemente, en ensayos de evaluación de dolor agudo, determinamos que ratones machos co-inyectados con  $17\beta$ -estradiol y capsaicina muestran una disminución de la respuesta al dolor en comparación de los animales inyectados solo con capsaicina.

Los datos del presente estudio sugieren que la diferencia en la percepción del dolor asociado al canal TRPV1 entre animales de diferente sexo, está estrechamente relacionada con el componente hormonal y que el  $17\beta$ -estradiol tiene un efecto anti-nociceptivo en la percepción de dolor relacionada al canal TRPV1.

## ***I. Introducción***

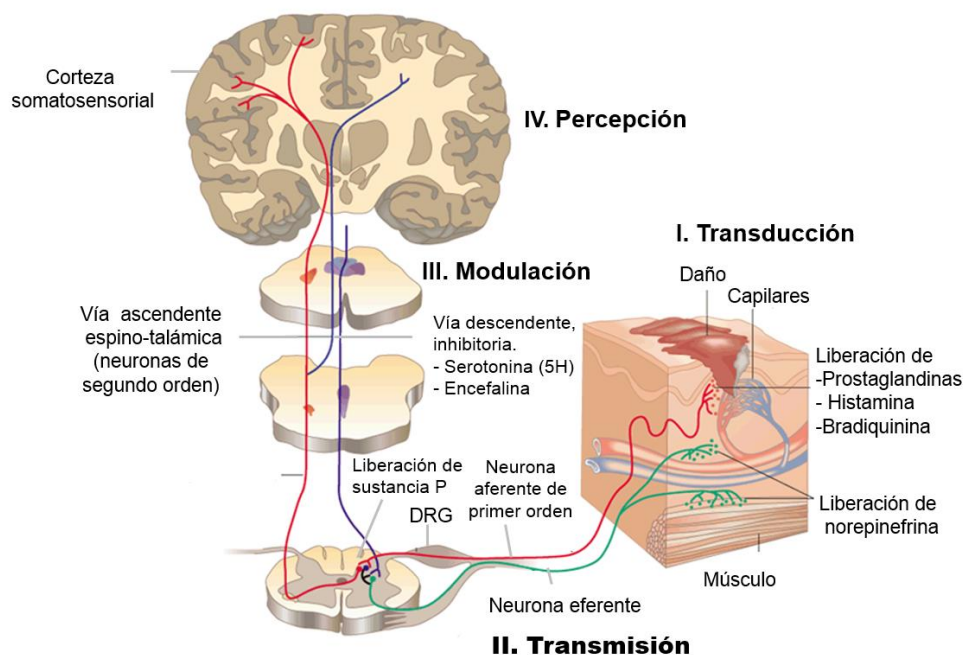
### **1.1. El dolor**

El dolor o nocicepción es un mecanismo de sobrevivencia que se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable que proporciona una señal de advertencia de daño potencial o real, dando como resultado una serie de conductas dirigidas a aliviar o terminar la experiencia (Osterweis *et al.*, 1987; Craig, 2003).

La vía del dolor consta de cuatro etapas: la transducción, transmisión, modulación y percepción. La transducción es el proceso mediante el cual los estímulos externos nocivos son convertidos en señales eléctricas. Es decir, receptores específicos responden selectivamente a estímulos nocivos y convierten la energía química, mecánica o térmica recibida en impulsos neuronales (McEntire *et al.*, 2016; Dubin y Patapoutian, 2010). Estos receptores se encuentran insertados en la membrana plasmática de las terminaciones nerviosas aferentes de primer orden, también llamadas nociceptores, mismos que constituyen fibras que se clasifican en A $\delta$  y C. Las fibras A $\delta$  son mielinizadas de un grosor medio y de conducción rápida, mientras que las fibras C son fibras amielínicas de menor diámetro, por lo tanto de conducción lenta, los cuerpos de ambas terminaciones se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal (DRG por sus siglas en inglés). Estas fibras ingresan a la médula espinal y hacen sinapsis con las neuronas de segundo orden en las láminas I y II del asta dorsal para transmitir la señal (Dubin y Patapoutian 2010).

Durante la sinapsis las neuronas de primer orden liberan neurotransmisores como la sustancia P que a su vez induce la liberación de aminoácidos excitatorios como el aspartato y el glutamato que provocan la excitabilidad de las células postsinápticas en el asta dorsal. Es en este nivel donde los centros superiores pueden modular la señal del dolor de manera inhibitoria mediante la liberación de analgésicos endógenos a través de proyecciones de neuronas descendientes eferentes, estas neuronas activan las neuronas del asta dorsal para inhibir las fibras presinápticas utilizando neurotransmisores opioides como la encefalina y la serotonina (5H) que impiden la liberación de la sustancia P (Kelly y Ahmad, 2001; Kehlet *et al.*, 2005).

Si la señal del estímulo tiene la intensidad necesaria para traspasar la barra inhibitoria, el impulso continúa hacia los centros superiores a través de las fibras ascendentes de segundo orden por la vía tálamo-espinal, hasta llegar a la corteza cerebral para iniciar con la percepción, ya que es ahí donde se le da recepción e interpretación a la señal, asimismo se contrasta con experiencias anteriores y se reconoce el dolor (Castany *et al.*, 2016). Desde la corteza se elaboran estímulos eferentes en respuesta al dolor para alertar al organismo y enviar señales a centros inferiores que secretan sustancias analgésicas como la norepinefrina para aliviar el dolor (figura 1) (Kelly y Ahmad, 2001; Kehlet *et al.*, 2005).



**Figura 1. Vía del dolor.** El estímulo es transducido a una señal neuronal. Esta señal es transmitida por los nociceptores a las neuronas de segundo orden en el asta dorsal. En el asta dorsal se lleva a cabo el proceso de modulación por vías eferentes. Si el estímulo es lo suficientemente fuerte las neuronas de segundo orden lo envían por la vía espino-talámica hasta la corteza somatosensorial donde se percibirá el dolor. Enseguida, se elaborarán respuestas al dolor. Figura modificada de Kehlet, 2014.

## 1.2. La familia TRP como receptores de estímulos nociceptivos

Como se mencionó anteriormente, los nociceptores tienen en sus membranas plasmáticas una amplia variedad de receptores que detectan y transforman estímulos

dañinos en señales neuronales. Algunos de los transductores más importantes de las señales nociceptivas pertenecen a la superfamilia de canales iónicos TRP (por sus siglas en inglés, *transient receptor potential*), ya que estas proteínas funcionan como sensores de varios estímulos nocivos como la temperatura, osmolaridad, pH, sustancias químicas entre otros (Clapham, 2003; Kaneko y Szallasi, 2013; Nilius y Flockerzi, 2014).

Particularmente, en mamíferos hay 28 TRP los cuales están clasificados en seis subfamilias: vaniloide (TRPV), canónica (TRPC), anquirina (TRPA), melastatina (TRPM), policistina (TRPP) y mucolipina (TRPML). Existe una séptima subfamilia de canales TRP llamada TRPN (NO mecano potencial-C) en la cual sus integrantes sólo se encuentra en organismos no mamíferos (Gees *et al.*, 2010).

En general, los canales TRP funcionales comparten una estructura compuesta por cuatro subunidades polipeptídicas idénticas, cada subunidad está constituida por seis segmentos transmembranales (S1-S6) sumamente conservados, las subunidades tienen un asa hidrofóbica entre el S5 y S6 que forman el poro conductor de iones (figura 2a). Es importante mencionar que los aminoácidos que se encuentran localizados en el poro le confieren la selectividad al canal, ya que a pesar de que varios parecen ser canales catiónicos no selectivos, tienen una mayor afinidad por el calcio (Owsianik *et al.*, 2006; Clapham, 2003, González-Ramírez *et al.*, 2017). El amino terminal (N) y el carboxilo terminal (C) de estos canales se ubican en el lado intracelular, estos dominios citoplasmáticos juegan un rol muy importante en la regulación, modulación y tráfico del canal (Owsianik *et al.* 2006; Nilius y Flockerzi 2014). Algunos de los canales TRP contienen repeticiones de anquirinas en el N-terminal, mismas que están involucradas en interacciones proteína-proteína y en el tráfico de algunos canales; el número de anquirinas en el N-terminal de los TRP varía entre los diferentes miembros de las subfamilias (Owsianik *et al.* 2006). Un dato interesante es que las subfamilias TRPC, TRPV y TRPM tienen una secuencia de seis aminoácidos localizada cerca del S6 en el C terminal llamada caja TRP altamente conservada (Gaudet, 2007, Owsianik *et al.*, 2006).

Estructuralmente los canales TRP son muy parecidos a los canales dependiente de voltaje, sin embargo, se diferencian en el dominio de sensor de voltaje, el S4, ya que en los canales TRP se han observado pocos o ausencia de residuos cargados positivamente en este dominio (Minke 2010, Owsianik *et al.*, 2006; Rosasco y Gordon, 2017).

### 1.3. El canal TRPV1

La subfamilia TRPV está constituida por seis canales TRPV1-6. Estos canales se dividen en dos grupos, el primero está formado por los canales TRPV1-4 los cuales son catiónicos no selectivos con una baja selectividad por los cationes monovalentes o divalentes, no obstante, tienen una mayor afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , estos canales son sensores que tienen una función importante en la transducción de señales térmicas y nocivas. El segundo grupo incluye a los canales TRPV5 y TRPV6 que son permeables solo a  $\text{Ca}^{2+}$  y participan en la regulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en células epiteliales del riñón y del intestino (Ramsey *et al.*, 2006; Gees *et al.*, 2010, Morales-Lázaro y Rosenbaum ,2017).

La familia vaniloide le debe su nombre al primer miembro que fue caracterizado, es decir, el canal TRPV1, el cual es activado por un compuesto vaniloide llamado capsaicina, compuesto presente en los chiles que provoca la sensación de picor (Caterina *et al.*,1997). La topología del canal TRPV1 corresponde al arreglo estructural típico de los canales TRP, ya que está constituido de cuatro subunidades idénticas (homotetrámero) (figura 2b-c) (Szallasi *et al*, 2007; Bevan *et al.*, 2014).

En humanos el gen *TRPV1* está localizado en el cromosoma 17p13, organizado por 17 exones que codifican para una proteína de 839 aminoácidos (Birnbaumer *et al.*, 2003). Este canal se expresa principalmente en las neuronas sensoriales de las fibras C y con menor abundancia en las fibras A $\delta$  de los ganglios de la raíz dorsal, así como en los ganglios trigeminales (Caterina *et al.*, 1997); también se ha reportado la expresión de este canal en ciertas partes del cerebro como el hipotálamo, tálamo, hipocampo, núcleo olfatorio, así como en tejidos no neuronales

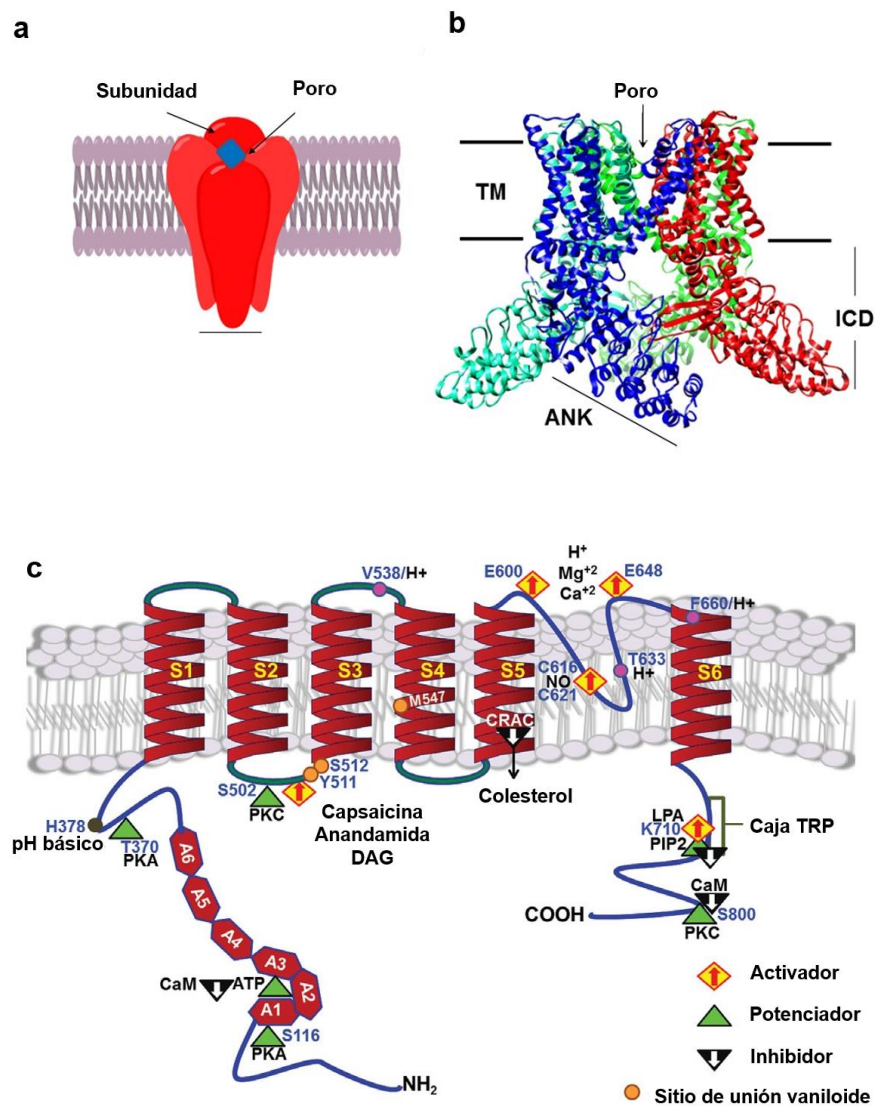
como el sistema inmune, células del músculo liso, vejiga, queratinocitos, piel, y tráquea (Bevan *et al.*, 2014).

TRPV1 es un canal catiónico no selectivo permeable a  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{K}^{+}$ ; su forma de activación es polimodal ya que además de activarse por la capsaicina, este canal responde a la resiniferatoxina (RTX), compuesto químico presente en plantas como *Euphorbia resinífera*, a la alicina presente en el ajo *Allium sativum*, al calor dañino ( $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ) y a protones extracelulares ( $\text{pH} < 6$ ), (Szallasi y Blumberg, 1990; Salazar *et al.*, 2008; Caterina *et al.*, 1997). Del mismo modo se ha determinado que TRPV1 puede ser activado por ligandos endógenos como el ácido lisofosfatídico (LPA), la anandamida (AEA), diacilglicerol (DGA), N-araquidonoil dopamina (NADA), entre otros (Morales-Lázaro *et al.*, 2013). En cuanto a los inhibidores de TRPV1 de naturaleza endógena se conocen al colesterol, la adenosina y las resolvinas (Morales-Lázaro, S. L., & Rosenbaum, 2017; Morales-Lázaro *et al.*, 2013).

El canal TRPV1 se ha relacionado con enfermedades de dolor crónico, por lo cual es reconocido como un mediador molecular del dolor. Además se ha observado que TRPV1 se sobreexpresa en condiciones de inflamación que causan la liberación de compuestos proinflamatorios como el factor de crecimiento neuronal (NGF), bradiquininas, prostaglandinas, adenosín trifosfato (ATP), entre otros (Ho *et al.*, 2012).

Aunado a la regulación del canal TRPV1 por efecto de diversos ligandos o estímulos, otra vía para regular los efectos río abajo de la activación de este canal es mediante la regulación en su expresión, que puede ser mediada por diferentes mecanismos como la transcripción (Chu *et al.*, 2011), modificaciones pos-traduccionales (Veldhuis *et al.*, 2012) y el tráfico del canal hacia la membrana (Szallasi y Blumbrg, 2007).





**Figura 2 Topología de un canal TRPV1 y los sitios de interacción de varios ligandos.**

**a)** Representación del homotetrámero, formado por cuatro subunidades alineadas alrededor del poro central. **b)** Estructura del canal TRPV1 en estado cerrado determinado por crioeM, se observan la región transmembranal (TM), del poro, la parte intracelular (ICD) y la región de los repetidos de anquirina (ANK). **c)** Se muestra un esquema representativo de la estructura monomérica del canal TRPV1 con las repeticiones de anquirina (A1-A6), los dominios amino y carboxilo terminal intracelulares (NH<sub>2</sub> y COOH) y los dominios transmembranales (S1-S6), así como los sitios de unión para varios agonistas (activadores), antagonistas (inhibidores) y sitios de fosforilación. Figuras modificadas de Morales-Lázaro y Rosenbaum 2014; Morales-Lázaro *et al.*, 2013.

#### **1.4. Diferencias en la percepción del dolor entre mujeres y hombres**

El estudio sobre la naturaleza del dolor y la búsqueda de agentes que puedan aliviarlo, han sido temas de gran interés para la medicina moderna. Conjuntamente, a partir de los años noventa, el interés por el estudio del dimorfismo en la percepción del dolor entre mujeres y hombres fue en aumento, de modo que hoy en día existen un gran número de artículos que tratan este tópico (Fillingim, *et al.*, 2009).

Múltiples estudios epidemiológicos de condiciones clínicas y experimentos de laboratorio han determinado que las mujeres muestran un menor umbral y una menor tolerancia al dolor generado por estímulos como la presión, electricidad, calor, frío y sustancias químicas. Asimismo, en reportes epidemiológicos de patologías (en las que se han identificado a canales de la familia TRP como mediadores moleculares de la nocicepción), como dolor neuropático, dolor muscular, migraña, osteoartritis, intestino irritable, dolor temporomandibular y otras dolencias orofaciales, se ha demostrado que las mujeres corren un mayor riesgo de padecerlas que los hombres. De igual forma se ha demostrado que las mujeres muestran una mayor respuesta inflamatoria que los hombres (Fillingim, *et al.*, 2009 y Racine *et al.*, 2012).

La diferencia en la percepción del dolor observada entre hombres y mujeres se ha tratado de explicar mediante varios factores, sin embargo, la discrepancia de las hormonas sexuales ha destacado como un factor importante. Se han realizado estudios de la percepción del dolor en mujeres durante las fases del ciclo menstrual (periodo donde las concentraciones de las hormonas femeninas oscilan y cambian significativamente) y se ha encontrado una correlación entre los niveles de las hormonas gonadales y la nocicepción (Maurer *et al.*, 2016).

#### **1.5. Hormona gonadal 17 $\beta$ - estradiol**

Aunque todas las hormonas sexuales están presentes en ambos sexos, los andrógenos son considerados como hormonas masculinas y los estrógenos junto con la progesterona como hormonas femeninas (Maurer *et al.*, 2016). Los

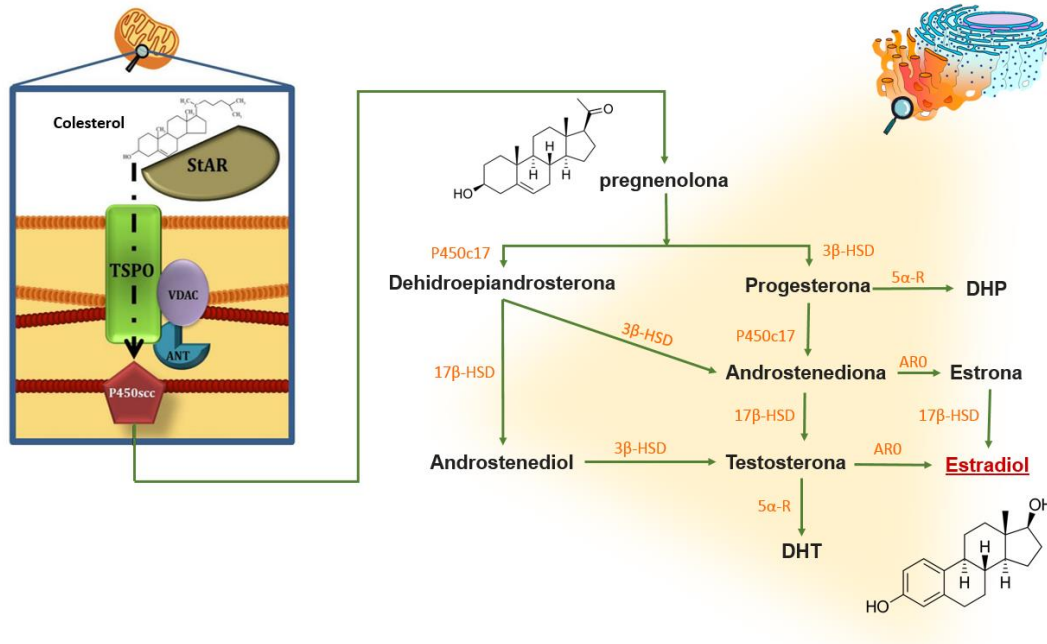
estrógenos son hormonas esteroideas endógenas que se encuentran representadas en tres formas, estrona (E1), estriol (E3) y  $17\beta$ -estradiol (E2). El  $17\beta$ -estradiol es el estrógeno más potente y abundante en las mujeres premenopáusicas. Después de la menopausia el E1 se convierte en el estrógeno más abundante y es sintetizado principalmente por el tejido adiposo adrenal, mientras E3 es producido en grandes cantidades por la placenta durante el embarazo (Coelingh Bennink, 2004).

El  $17\beta$ -estradiol tanto en hombre como en mujeres se produce en pequeñas cantidades en tejidos como las glándulas adrenales, cerebro y tejido graso, sin embargo, las mujeres lo producen grandes cantidades de esta hormona en las células de la granulosa de los folículos ováricos y por el cuerpo lúteo. En una mujer los niveles de  $17\beta$ -estradiol varían entre 30 y 400pg/mL (0.11–2.20 nM) con los niveles más altos cerca del final de la fase folicular, es decir, antes de la ovulación. En contraste, los niveles de  $17\beta$ -estradiol en hombres son de 10-55pg/mL, valores muy comparables con los niveles presentados en las mujeres postmenopáusicas (35pg/mL) (Bondesson *et al.*, 2015).

La síntesis del  $17\beta$ -estradiol (figura 3) comienza con la formación de la pregnenolona a partir del colesterol en la membrana interna de la mitocondria por la acción de la enzima P450<sub>scc</sub>. Después, en el retículo endoplasmático liso, la pregnenolona es convertida en progesterona o en dehidroepiandrosterona (DHEA). Es a partir de estos compuestos que se llevan a cabo una serie de reacciones enzimáticas hasta la síntesis de estrona y testosterona, que son precursores de la síntesis del  $17\beta$ -estradiol, mediante la enzima  $17\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) (Giatti *et al.*, 2018) (figura 3).

El  $17\beta$ -estradiol es una hormona transcendental para el desarrollo de los caracteres sexuales primarios y secundarios, pero también influye en el desarrollo embrionario y fetal del cerebro, en la diferenciación de varios órganos, en el funcionamiento del corazón y cerebro, así como en la modulación de la inflamación. La naturaleza lipídica de esta hormona permite su libre difusión a través de la membrana

plasmática de las células blanco y señala mediante receptores intracelulares de estrógenos específicos para regular la fisiología celular (Marino *et al.*, 2006).

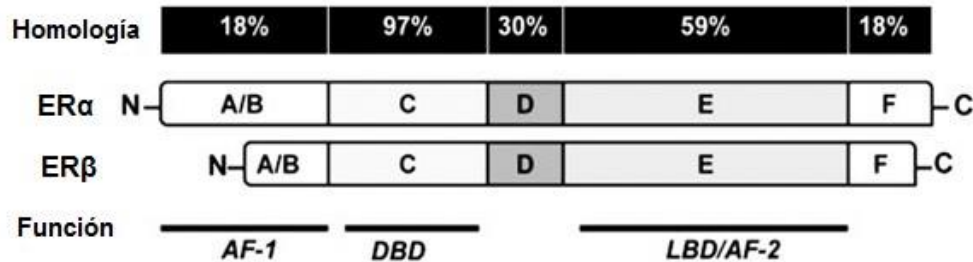


**Figura 3. Síntesis del 17β-estradiol.** El colesterol es traslocado a la membrana interna de la mitocondria por complejos que incluyen varias proteínas, como la proteína translocadora (TSPO), la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), la proteína transportadora de nucleótidos adenina (ANT) y proteína del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), ahí el colesterol es convertido a pregnenolona por acción de la enzima P450scc. Después en el retículo endoplasmático liso la pregnenolona es convertida en progesterona o en dehidroepiandroserona. A partir de estas se llevan a cabo una serie de reacciones enzimáticas para la síntesis de 17β-estradiol. Figura modificada de Giatti *et al.*, 2012.

### 1.6. Los receptores del 17β-estradiol

Los efectos biológicos del 17β-estradiol son mediados principalmente por dos miembros de la superfamilia de receptores nucleares: ERα y ERβ. El ERα es codificado por el gen *ESR1* localizado en el cromosoma 6q24-q27 mientras tanto el ERβ es codificado por el gen *ESR2* localizado en el cromosoma 14q22-q24, ambos genes contienen ocho exones separados que dan como resultado proteínas de 595 y 530 aminoácidos respectivamente (Gosden *et al.*, 1986; Enmark *et al.*, 1997).

Ambos receptores tienen una estructura modular característica de los miembros de la superfamilia de receptores nucleares constituida por seis dominios (A-F) (figura 4).



**Figura 4. Estructura de los receptores de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$ .** Diagrama representativo de los dominios estructurales de los receptores de estrógeno (A-F), donde se muestra el grado de homología de cada dominio entre ER $\alpha$  y ER $\beta$  y los dominios funcionales. Figura modificada de Cui *et al.*, 2012.

El dominio C es el dominio de unión al DNA (DBD), en este dominio se localizan, elementos como los dedos de zinc, la caja-P que interactúan con los elementos de respuesta del DNA, así como la caja-D misma que es requerida para la dimerización del receptor; este dominio es el más conservado entre ambos receptores y como consecuencia ambos receptores se unen a elementos de respuesta de DNA similares. El dominio D funge como bisagra y está involucrado en cambios conformacionales del receptor así como en interacciones proteína-proteína. El dominio E sirve como dominio de unión a ligando (LBD) y aunque ER $\alpha$  y ER $\beta$  tienen un grado de homología no tan conservado en este dominio los residuos que están en estrecha proximidad con el ligando se conservan, por ello la afinidad por el 17 $\beta$ -estradiol es incuestionable. El dominio del C-terminal contiene una importante función de activación transcripcional (AF-2), que depende de la unión de un agonista, la unión de un agonista produce un cambio conformacional en el receptor y la activación de AF-2, que proporciona una interface de interacción con coactivadores transcripcionales. Los antagonistas no inducen este cambio conformacional específico y, por lo tanto, son incapaces de activar el AF-2. Adicionalmente, los dominios cercanos al N-terminal A/B tienen una segunda

función de activación transcripcional (AF-1), conjuntamente son un elemento importante tanto para el mecanismo dependiente como para el independiente de ligando, cabe señalar que AF-1 y AF-2 son muy poco homólogos entre ER $\alpha$  y ER $\beta$  (figura 4) (Dechering, *et al.*, 2000; Arnal *et al.*, 2017).

La acción biológica de los ER $\alpha$  y ER $\beta$  (ERs) implica mecanismos complejos y amplios. Se han descrito mecanismos de acción que incluyen vías genómicas y no genómicas. A continuación se describen las generalidades de estos mecanismos de acción (figura 5) (Sotoca *et al.*, 2012).

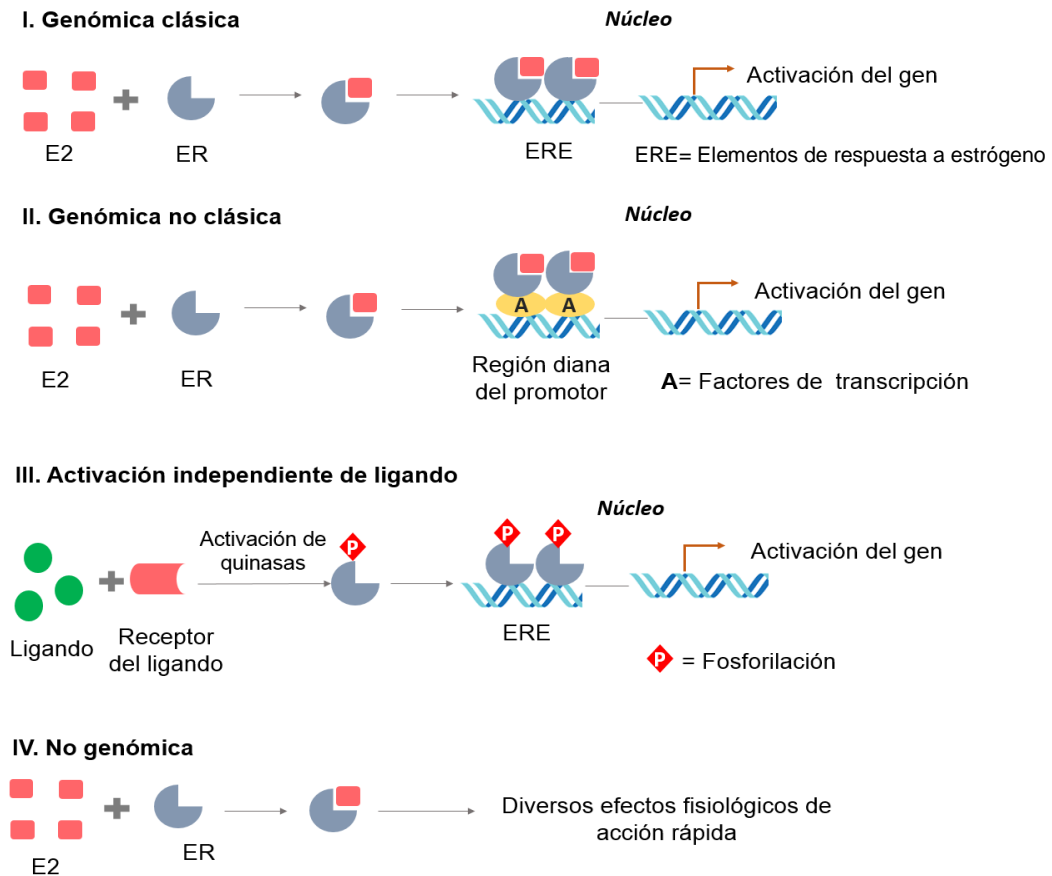
**1. Acción genómica clásica.** En esta vía el 17 $\beta$ -estradiol se une a formas monoméricas del receptor a estrógeno y en consecuencia esto produce que los receptores se asocien en dímero para poder translocarse al núcleo, ahí reclutan la maquinaria transcripcional y los cofactores necesarios para unirse a las secuencias blanco de los promotores, también llamadas elementos de respuesta a estrógeno (EREs) y de este modo comienza la regulación de la transcripción de sus genes blanco (Sotoca *et al.*, 2012).

**2. Acción genómica no clásica.** En este mecanismo la activación de los ER, favorece la asociación con otros factores de transcripción tales como proteína de especificidad 1 (Sp1), proteína activadora 1 (AP-1), factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), C-jun, entre otros, para regular indirectamente genes que carecen de EREs (Björnström y Sjöberg, 2005; Cui *et al.*, 2013).

**3. Activación independiente de ligando.** Bajo condiciones fisiológicas normales los ER pueden ser activados en ausencia de ligando. En esta vía los ER regulan la transcripción inducida por quinasas como PKC, PKA, MAPK o por PI3K involucradas en las vías de señalización de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-1 o el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF)-2 (Björnström y Sjöberg, 2005; Cui *et al.*, 2013).

**4. No genómica.** Los eventos de señalización de estrógenos no genómicos incluyen la generación de los segundos mensajeros como Ca<sup>2+</sup>, adenosín monofosfato

cíclico (cAMP) y óxido nítrico (NO), así la activación de tirosina quinasas receptoras como EGFR e IGF-1R y quinasas como PI3K, miembros de la familia MAPK, Akt y PKA/PKC (Prossnitz, et al., 2008).



**Figura 5. Mecanismo de acción de los receptores de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$ .** Representación simplificada de los mecanismos de acción de los receptores a estrógeno. Figura modificada de Morani *et al.*, 2008.

Tradicionalmente las respuestas genómicas y no genómicas iniciadas por los estrógenos habían sido atribuidas a la acción de los receptores de estrógenos (ERs), sin embargo, en los años noventa se identificó por primera vez un miembro de la familia de receptores con 7 segmentos transmembranales nombrado GPR30 o GPER1 (Carmeci *et al.*, 1997; O'Dowd *et al.*, 1998), mismo que años después se demostró ser receptor del 17 $\beta$ -estradiol, este hecho señaló a este receptor como un

posible responsable de los mecanismos de acción no genómica del 17 $\beta$ -estradiol (Thomas *et al.*, 2005). El GPR30 tiene como agonistas compuestos sintéticos como el ICI 182,780 y el tamoxifeno los cuales son antagonistas de los ER, además, el GPR30 tiene un ligando selectivo llamado G-1 que también es inerte a los receptores de estrógeno clásicos (Prossnitz, *et al.*, 2008; Bologna *et al.*, 2006). El descubrimiento de un ligando selectivo a GPR30 ha permitido la realización de estudios funcionales sobre la implicación del GPR30 en las vías de señalización no genómicas del 17 $\beta$ -estradiol y se ha demostrado que el G-1 es capaz de provocar la movilización de calcio así como la activación de PI3K en células que expresan GPR30 pero no en células que expresan ER $\alpha$  o ER $\beta$ , sin embargo, aún no se conoce por completo la participación del GPR30 en las vías de señalización del 17 $\beta$ -estradiol (Prossnitz, *et al.*, 2008; Prossnitz, *et al.*, 2010).

### **1.7. Relación entre el canal TRPV1 y el 17 $\beta$ -estradiol**

En el 2012 Cho y Chaban, observaron una disminución de la expresión del canal TRPV1 en DRGs a nivel de proteína en ratones transgénicos que carece de la expresión de los receptores ER $\alpha$  ó ER $\beta$ , sugiriendo que el 17 $\beta$ -estradiol podría ser un factor importante en la regulación positiva del canal TRPV1, a partir de este estudio el interés sobre la investigación de la regulación del canal TRPV1 por el 17 $\beta$ -estradiol fue en aumento.

A pesar de que algunos equipos de trabajo han abordado el tema de la influencia del 17 $\beta$ -estradiol en la expresión del canal TRPV1 en los DRGs y el ganglio trigeminal de modelos murinos, hasta el momento no se ha realizado un estudio que demuestre sí realmente existe un dimorfismo sexual en la expresión del canal TRPV1 en estos modelos, lo cual podría explicar las diferencias en el umbral de dolor entre sexos opuestos. Por lo tanto, mediante el presente trabajo se busca determinar sí en ratones (C57BL/6) existe un dimorfismo en la respuesta de dolor a capsaicina y en la expresión del canal TRPV1, así como de los receptores a estrógeno ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPR30, tanto a nivel de RNA mensajero como a nivel de proteína en los DRGs.



## ***II. Hipótesis***

Sí el  $17\beta$ -estradiol es un regulador positivo de la expresión del canal TRPV1, entonces las ratonas presentarían mayor expresión del canal TRPV1 y serían más susceptibles al dolor asociado a este canal en comparación con los ratones.

## ***III. Objetivo general***

Determinar si existe un dimorfismo sexual en la expresión del canal TRPV1 y los receptores de  $17\beta$ -estradiol y su relación con la respuesta de dolor.

## ***IV. Objetivos particulares***

3.1 Establecer si existen una diferencia en el umbral de dolor a capsaicina entre ratones de C57BL/6 de ambos sexos.

3.2 Determinar la expresión a nivel de RNA mensajero y de proteína de los receptores a estrógeno nucleares ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ) y el receptor de estrógeno de la membrana plasmática (GPR30) en los DRGs de ratones C57BL/6 de ambos sexos.

3.3 Cuantificar y comparar la expresión a nivel de RNA mensajero y proteína total de  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , GPR30 y el canal TRPV1 en los DRGs de ratonas y ratones C57BL/6.

3.4 Determinar si existen cambios en los niveles de proteína del canal TRPV1 en ratones macho y hembras ovariectomizadas (ovx) de la cepa C57BL/6.

3.5 Realizar ensayos de conducta de dolor agudo en machos C57BL/6 co-inyectados con  $17\beta$ -estradiol y capsaicina.

## **V. Materiales y métodos**

### **5.1. Animales y extracción de tejido**

Para este trabajo se utilizaron alrededor de 90 ratones y ratonas de ocho semanas de edad, cepa C57BL/6 proporcionados por el bioterio Autorizado del Instituto de Fisiología Celular con vigencia de 21 de diciembre 2016 al 20 de diciembre del 2021, donde los animales son reproducidos, cuidados y mantenidos conforme la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidados y Uso de los Animales de Laboratorio” y circunscritos al Título Tercero del bienestar de los animales, capítulo I del bienestar de los animales. Artículo 20 del párrafo I al IV (Ley federal de Sanidad Animal 2005). Los animales se mantuvieron con acceso a comida (LabDiet 5001) y agua *ad libitum*.

Con el fin de extraer los ganglios de la raíz dorsal, los animales fueron sacrificados por decapitación (aprobado por el CICUAL del IFC-UNAM: SML127-18), después los cuerpos fueron colocados con la parte dorsal expuesta para cortar y remover tanto la piel como el músculo que cubrían la columna vertebral, enseguida la columna fue cortada por la parte media a lo largo, dejando expuesta la médula para ser retirada. Se cortó la curvatura de las vértebras para dejar al descubierto los DRGs y poder retirarlos. Por añadidura, se utilizó tejido ovárico y de cerebro como controles positivos, los cuales, fueron removidos de las hembras a las que se les extrajeron los DRGs.

Los tejidos que fueron utilizados para experimentos de extracción de RNA fueron lavados con buffer de fosfatos PBS (NaCl 136.9mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.14mM y KHP0<sub>4</sub>1.76mM) y colocados en hielo, mientras tanto los utilizados para extracción de proteína fueron puestos en PBS complementado con cOmplete™ (coctel de inhibidos de proteasas) y colocados en hielo.

### **5.2. Ovariectomización**

Este procedimiento se apegó a las disposiciones del numeral 8 Técnicas experimentales del punto 8.1 al 8.1.1. Y 8.2. De la NOM-062-ZOO1999.

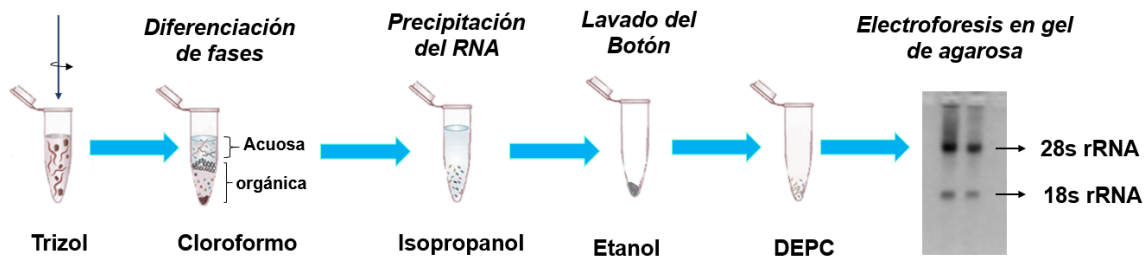
Para este procedimiento a cada hembra se le administró subcutáneamente en la zona escapular 0.4 ml de una mezcla de analgésico y anestésico (xilacina y ketamina con una relación 1:0.8), transcurridos unos cinco minutos se examinaron los reflejos del animal por punción de la cola (conforme al apéndice “C” (Informativo) de la NOM-062-ZOO1999), una vez que no se observaron reflejo se procedió a la técnica quirúrgica por vía lumbar derecha e izquierda para la extracción de los ovarios. El tiempo de recuperación de los animales fue de dos meses antes de someterlos a cada una de las pruebas experimentales.

### **5.3. Extracción de RNA total**

La extracción de RNA total se realizó mediante el método de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo propuesto por Chomczynski P. y Sacchi N. en 1987. Cuyo fundamento, es el uso de fenol y cloroformo que por sus propiedades químicas como la densidad y polaridad forman una emulsión bifásica. En la fase acuosa se solubilizan los compuestos polares como el RNA y el DNA, sin embargo, como el fenol se encuentra con un pH ácido el DNA es neutralizado y precipitado hacia la fase orgánica mientras que el RNA permanece en la fase acuosa porque tiene bases nitrogenadas expuestas que pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua disuelta. En la fase orgánica además del DNA se localizan los compuestos no polares como los carbohidratos, los lípidos y las proteínas (tienen núcleos hidrofóbicos que interactúan con el fenol provocando su precipitación). El pH ácido del fenol minimiza la actividad de las nucleasas, pero para neutralizarlas por completo a la solución se le agrego tiocianato de guanidina que participa como desnaturizante de proteínas (Zumbo, s/a).

Se obtuvo el RNA total de ovario, del cerebro y los DRGs de ratones machos y hembras, para ello, a cada muestra se le agregó TRIzol (Invitrogen™) (1 ml por 50-100mg), posteriormente fueron homogenizadas mecánicamente. Una vez en TRIzol a cada muestra se le agregó cloroformo (200 µl por ml de TRIzol) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, luego, se dejó reposar durante 5 minutos,

después se centrifugó a 12,000g por 15 minutos a 4°C, como resultado se diferenciaron la fase acuosa y la fase orgánica. Se extrajo la fase acuosa en otro tubo y se le agregó isopropanol (500µl por ml de TRIzol), se mezcló por inversión durante 15 segundos y centrifugó a 12,000g durante 10 minutos a 4°C, tras la centrifugación se precipitó un botón al que se le retiró el sobrenadante, inmediatamente, al botón se le añadió etanol al 75% en agua DEPC (agua libre de nucleasas, 1ml por ml de TRIzol), después de 3 minutos de incubación se centrifugó a 7500g por cinco minutos a 4°C, por último fue removido el etanol y el botón se homogeneizó en 50µl de agua DEPC. Para observar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE al 0.5X (Trisbase 44.5mM, ácido bórico 44.4M, 1mM EDTA pH8.3) con bromuro de etidio (0.02mg en 100mL), los gels fueron observados en un transluminador de luz ultravioleta (UVP). Por último el RNA con alta integridad se cuantificó un NANODROP ONE<sup>C</sup> (figura 6).



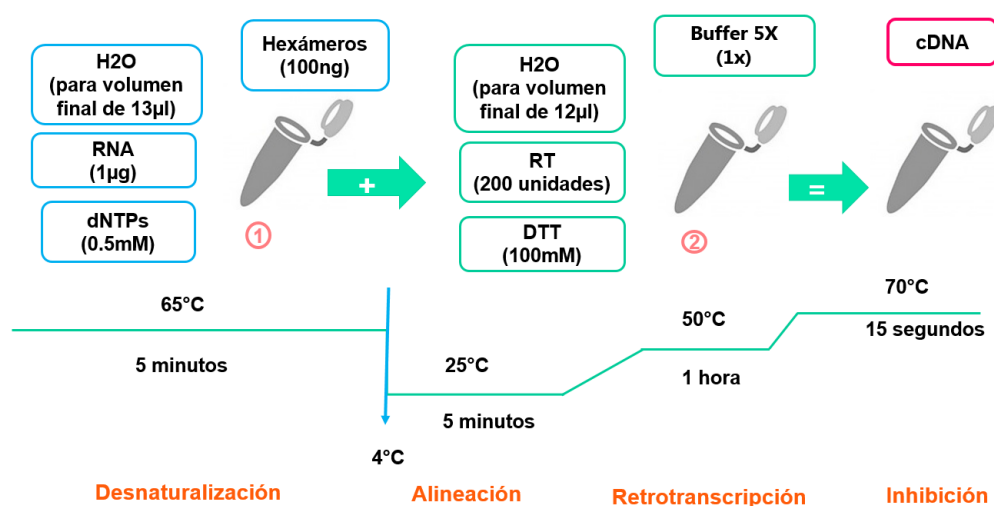
**Figura 6. Pasos para la extracción del RNA total de una muestra e imagen del RNA corrido en el gel de agarosa al 1.5%.** Figura modificada de Vahed S. Z., 2016.

#### 5.4. RT-PCR (transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa)

Una RT-PCR se compone esencialmente de dos reacciones enzimáticas. La primera reacción consiste en el uso de una retrotranscriptasa para sintetizar cadenas de DNA complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA. La segunda reacción utiliza el cDNA producto de la primera reacción en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que es una reacción enzimática que amplifica de manera exponencial una secuencia blanco, ya que los productos amplificados de un ciclo

sirven como molde para el siguiente ciclo (santos *et al.*, 2004; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

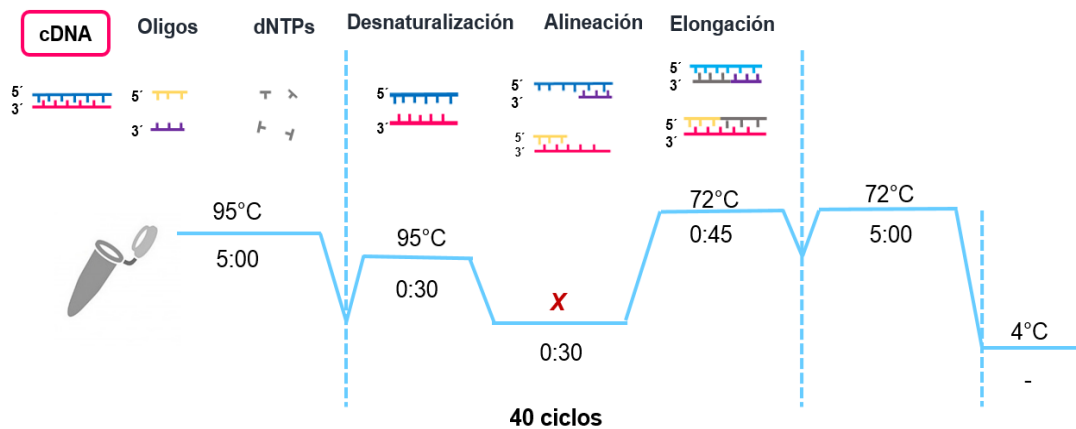
Se realizó una RT con el RNA total de ovario, del cerebro y los DRGs de machos y hembras. La reacción para cada muestra se dividió en dos tubos, el primero contenía: RNA, oligonucleótido (hexámeros), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y H<sub>2</sub>O, entretanto, el segundo contenía: retro transcriptasa (SuperScript™ III Reverse Transcriptase), DTT, buffer 5x y H<sub>2</sub>O. Las concentraciones y las fases del ciclo se pueden observar en la figura 7.



**Figura 7 Procedimiento de la RT.** El tubo 1 se colocó en el termociclador a 65°C durante 5 minutos (para la desnaturalización del RNA), después se colocó el tubo en hielo y se mezcló con el tubo dos, posteriormente el tubo se puso en el termociclador y se sometió al siguiente proceso; una fase de alineación a 25 °C (5 minutos), seguido de una fase de retrotranscripción a 50°C (1 hora) y una fase de inhibición a 70 °C (15 segundos).

Con 5 µl de cDNA obtenidos de cada muestra: el ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPR30 y actina (gen endógeno) fueron amplificados mediante el uso de PCR para el cual se usó Taq DNA polimerasa (Invitrogen™), las concentraciones de los reactivos y la configuración de la PCR se muestra en la tabla 1 y en la figura 8 respectivamente, los oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar los fragmentos de los

mRNA diana se encuentran en la tabla 2. Los productos de las reacciones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.02mg en 100mL) en TBE 0.5X. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados con la secuencia de DNA entre dos exones con el uso del programa Vector NTI a partir de las secuencias encontradas en la base de datos NCBI para *Mus musculus*: TRPV1 NM\_001001445.2, GPR30 NM\_029771.3, ER $\alpha$  NM\_001302531.1, ER $\beta$  NM\_207707.1. Cabe señalar que las temperaturas de alineamiento usadas para cada oligonucleótido fueron determinadas por medio del programa Vector NTI.



**Figura 8. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** La PCR está dividida en tres pasos **Desnaturalización**: las cadenas de DNA templado se separan por efecto térmico 95°C (30 segundos). **Hibridación**: los primers se alinean al extremo 3' de la región blanco (la temperatura de alineación depende de los oligonucleótidos, ver tabla 2). **Extensión**: la polimerasa actúa sobre el complejo formado por el templado y los oligonucleótidos comenzando la catálisis de una hebra complementaria con el uso de dNTP's 72°C (30 segundos).

**Tabla 1.** Reactivos utilizados en las PCRs para la caracterización de los recetores de estrógeno (ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPR30) en los DRGs de machos y hembras.

Reactivo	Concentración final
Buffer PCR 5X	1X
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.5mM
dNTPs (10mM)	0.2mM
Oligo F (30pmoles/ $\mu$ l)	30 pmoles
Oligo R (30pmoles/ $\mu$ l)	30 pmoles
Taq pol (5unidades/ $\mu$ l)	1 unidad
cDNA	5 $\mu$ l

**Tabla 2.** Secuencias de los oligos sentido (F) y antisentido (R) utilizados en las PCR para los mRNA diana de ese trabajo. Así como las temperaturas de alineación para cada blanco.

Blanco	Oligo sentido (F) y oligo antisentido (R)	Temperatura de alineación (°C)	Tamaño del amplico
ER $\alpha$	F 5'GTCTAATTCTGACAATCGAC 3' R 5'GCCTTTCATCATGCCCACTT 3'	52°C	305
ER $\beta$	F 5'GCTTTGTGGAGCTCAGCCTG 3' R 5' TGCGGTAGCCAAGGGGTACA 3'	57.5°C	350
GPR30	F 5' ATCAGGACACCCAACAGAAA 3' R 5'TCCAGGTGAGGAAGAAGACG 3'	57°C	885
Actina	F 5'AAGATGACCCAGATCATGTT3' R 5'GAGTACTTGCGCTCAGGAGG3'	56°C	650
TRPV1	F 5'CCACATCTTCACTACCAGGAGTCG TACCCG 3' R 5'CGGAACATGACGCTGGTGACCCTC TTGGTG 3'	57.5°C	550

## 5.5. PCR semicuantitativa

Para establecer los niveles de expresión a nivel de mRNA de ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPR30 y el canal TRPV1 en los DRGs de ratones machos y hembras, se extrajo el RNA total de los DRGs de machos y hembras de la misma camada con el propósito de ser utilizados en la realización de los RT-PCRs semicuantitativas con oligos específicos para cada gen blanco (tabla 2). Primero, se realizó la retrotranscripción de cada muestra. Posteriormente se hizo la co-amplificación de cada mRNA blanco conjuntamente con un mRNA de referencia (actina). Para ello cada mezcla de reacción de PCR fue realizada en presencia de los oligonucleótidos específicos para cada secuencia blanco y los oligonucleótidos para el gen de actina (tabla 2). La actina al ser un housekeeping fue utilizada como control de carga durante la normalización de la expresión de cada mensajero. Las RT-PCRs se realizaron por parejas de la misma camada, con la configuración observada en la figura 8 con las temperaturas de alineación correspondiente a cada gen que se muestran en la tabla 2, empero con un aumento en el número de ciclos a 45. A partir del ciclo 30 cada cinco ciclos se obtuvieron 5 $\mu$ l de cada muestra, mismo que fueron corridos en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.02mg en 100mL) en TBE 0.5X. En el caso del receptor de membrana GPR30 por motivo de su baja expresión en los DRGs se realizó la reacción en tubos separados, es decir, se realizó una mezcla para GPR30 y otra para actina en cada muestra, los tubos fueron colocados al mismo tiempo en el termociclador y a partir de ciclos 30 tanto al tubo de GPR30 como al de actina de cada muestra se le extrajeron 5 $\mu$ l. Los 5 $\mu$ l de ambos tubos de cada ciclo fueron corridos juntos el gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.02mg en 100mL) en TBE 0.5X.



**Tabla 3.** Concentraciones finales de los reactivos utilizados en las PCRs semicuantitavas para los cuatro genes diana. Cabe señalar que el tubo de la mezcla contenía los oligos del gen housekeeping (actina) excepto para receptor GPR30 para el cual se utilizaron tubos separados para el gen blanco y el housekeeping.

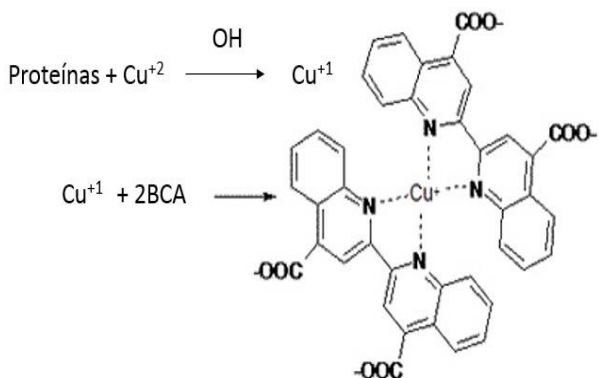
Reactivo	ER $\alpha$	ER $\beta$	GPR30	TRPV1
Buffer PCR 5X	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.5mM	1.5mM	1.5mM	1.5mM
dNTPs (10mM)	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM
Oligo F ( <b>blanco</b> ) (30pmoles/ $\mu$ l)	30pmoles	30pmoles	30pmoles	30pmoles
Oligo R ( <b>blanco</b> ) (30pmoles/ $\mu$ l)	30pmoles	30pmoles	30pmoles	30pmoles
Oligo F <b>actina</b> (30pmoles/ $\mu$ l)	30pmoles	30pmoles	7.5pmoles	15pmoles
Oligo R <b>actina</b> (30pmoles/ $\mu$ l)	30pmoles	30pmoles	7.5pmoles	15pmoles
Taq pol (5unidades/ $\mu$ l)	2 unidades	2 unidades	1 unidad por reacción.	2 unidades
cDNA	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

### 5.6. Obtención de proteína total

Para determinar y comparar los niveles de expresión en los DRGs de los receptores nucleares ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPR30 y TRPV1 a nivel de proteína entre ratones machos y hembras se procedió a la obtención de DRGs de cada animal. Los ganglios fueron macerados en 250 $\mu$ l de buffer de lisis (50 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 1% CHAPS, 2.5 mM NaF y 1X cOmplete™) con el fin de extraer la proteína total integra, después se centrifugó durante 5 minutos a 13,500g, de manera que se distinguieron dos fases: una fase sólida donde se condensaron los restos celulares y una fase acuosa que contenía la proteína. La fase acuosa fue recolectada y colocada a 4°C.

## 5.7. Cuantificación de proteína total

La proteína fue cuantificada por el método de ácido bicinconínico (figura 9). En una placa de 96 pozos se agregaron por duplicado 10µl de proteína de albumina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones con 10µl del buffer de lisis utilizado en las muestras de los DRGs, en seguida, en la misma placa se añadieron por duplicado 10µl de las muestras de proteína de los DRGs con 10 µl de agua, inmediatamente a cada pozo se le agregaron 160µl de solución de trabajo (9 ml ácido bicinconínico + 180 µl de sulfato de cobre <sup>+2</sup>), luego, la placa se dejó en incubación a 37°C durante media hora. Transcurrido el tiempo se dio lectura a la absorbancia de las muestras con un espectrofotómetro ELx808 (BioTek). Mediante el uso del programa GraphPad Prism, con los valores de absorbancia de BSA se realizó una regresión lineal, los valores de las muestras se interpolaron a la ecuación de la curva de calibración y se obtuvo la concentración total de proteína de cada muestra.

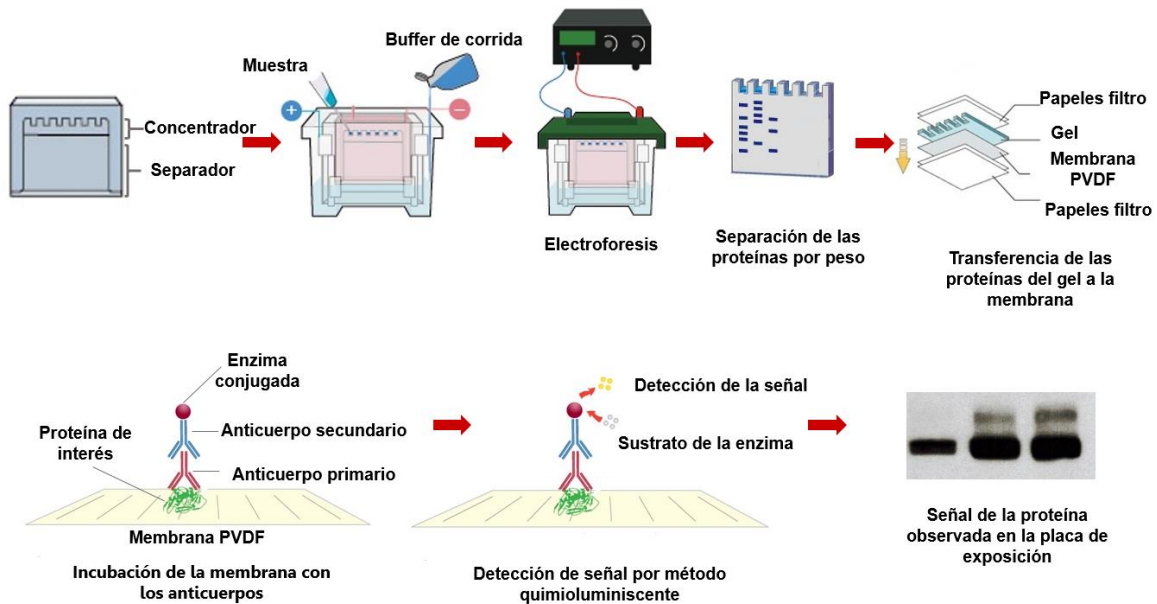


**Figura 9. Fundamento del método de BCA.** El método de BCA depende de la reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  en presencia de proteínas en un sistema alcalino (los elementos que determinan esta reacción son el número de enlaces peptídicos y la presencia aminoácidos como la cisteína, cistina, triptófano y tirosina en la estructura de la proteína). Después el  $\text{Cu}^{+1}$  es detectado selectivamente por el ácido bicinconínico dando como resultado una reacción colorimétrica purpura detectable a 562nm (Smith *et al.*, 1985).

## 5.8. Ensayos de Western Blot (WB)

El ensayo de western blot es una técnica que permite la detección específica de proteínas en una muestra biológica mediante el uso de anticuerpos. El western blot, combina la técnica de separación de las proteínas de acuerdo con su peso molecular mediante la electroforesis en gel, las cuales son transferidas a una

membrana de nitrocelulosa o PVDF (difluoruro de polivideno) con la inmunodetección de la proteína en la membrana mediante el reconocimiento y unión de un anticuerpo primario a un epítipo único de la proteína de interés. El anticuerpo primario después es detectado por un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Cuando la HRP entra en contacto con su sustrato (peróxido de hidrógeno) provoca una reacción enzimática que resulta en una reacción luminiscente. La luz emitida por la reacción puede ser detectada en una película de rayos X, o de forma digital, mediante un sistema de captación de imágenes (Towbin, 1979; Advansta, 2011) (figura 10).



**Figura 10. Western blot.** Representación de los pasos del procedimiento de western blot. Figuras adquiridas y editada de creative diagnostics y health gallery.

Las proteínas de los DRGs de machos y hembras, cuantificadas previamente, fueron separadas por su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%. Los geles estaban compuestos por dos fases la del concentrador y la del separador (tabla 4). Los geles fueron ensamblados en la cámara de electroforesis y cubiertos con el buffer de corrida (Tris.Cl 0.025M, Glicina

0.192M y SDS 0.1%). Se realizaron los cálculos para que la concentración (20 µg/µl) de la proteína que se colocó en los pozos de los geles fuese la misma; las muestras fueron mezcladas con buffer de carga 1X (Tris.Cl 0.5M con 0.4% de SDS pH6.8 [0.35M], glicerol 5%, SDS 1.67%, DTT 0.1M y Azul de bromofenol 0.002%). La electroforesis duró dos horas a 20mV por gel (Figura 10).

**Tabla 4** Reactivos utilizados para la elaboración de cada gel de poliacrilamida.

<b>Concentrador</b>		<b>Separador (10%)</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Acrilamida (30%) / bisacrilamida (0.8%)	650 µl	Acrilamida (30%) / bisacrilamida (0.8%)	3.75 ml
4X TrisCl 0.5M /SDS 0.4% pH 6.8	1.25 ml	Tris Cl1/SDS pH 8.8	2.81ml
Persulfato de amonio (10%)	25µl	Persulfato de amonio (10%)	37.5µl
TEMED	10 µl	TEMED	15 µl
H <sub>2</sub> O	3.05 ml	H <sub>2</sub> O	4.68ml

Las proteínas separadas electroforéticamente en los geles fueron transferidas a una membrana de PVDF en un sistema semi seco con una cámara TE70XP (Hoefer), entre papeles saturados con buffer de trasferencia (Glicina 39mM, Tris base Cl 48mM, SDS 1.28mM y Metanol 20%) a un amperaje constante de 220 mA durante dos horas. Al terminar la transferencia la membrana fue bloqueada con leche descremada al 6% en PBS con Tween20 al 0.1% (PBS-T) durante una hora. Después del bloqueo, las membranas fueron lavadas con PBS-T para eliminar el exceso de leche.

Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 5), luego de la incubación las membranas se lavaron con PBS-T para eliminar el

anticuerpo no unido a la proteína, enseguida la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (tabla 6), más adelante, las membranas fueron lavadas con PBS-T. Posteriormente, la membrana se expuso al sustrato de la enzima ensamblada en el anticuerpo secundario y la señal de la luz emitida por la reacción fue capturada en una placa de rayos X.

**Tabla 5. Anticuerpos primarios** utilizados para el reconocimiento de los epítopes de las proteínas blanco.

Proteína objetivo		Tipo y origen	Dilución	Condiciones de incubación	Marca
Nombre	Peso (KDa)				
TRPV1	95	Policlonal de cabra	1:1,000 en leche al 3% en PBS-T	Toda la noche.	Santa Cruz (P19)
ER $\alpha$	65	Policlonal de conejo	1:1,000 en leche al 3% en PBS-T	Toda la noche.	Abcam ab75635
ER $\beta$	59	Policlonal de conejo	1:1,000 en leche al 3% en PBS-T	Toda la noche.	Abcam ab3576
GPR30	42	Policlonal de conejo	1:1,000 en leche al 3% en PBS-T	Toda la noche.	Abcam ab39742
GAPDH	36	Policlonal de conejo	1:1,000 en leche al 3% en PBS-T	Toda la noche.	Cell signaling (14C10)
Actina	42	Monoclonal de ratón	1:500 en PBS-T	Toda la noche.	Casero CINVESTAV

**Tabla 6. Anticuerpos secundarios** utilizados para el reconocimiento de los anticuerpos primarios.

<b>Epitope Blanco</b>	<b>Dilución</b>	<b>Disuelto en</b>	<b>Condiciones de incubación</b>	<b>Maca</b>
Anticuerpo de conejo	1:5,000	Leche al 3% en PBS-T	1 hora a temperatura ambiente	GE Healthcare life Sciences
Anticuerpo de cabra	1:5,000	Leche al 3% en PBS-T	1 hora a temperatura ambiente	Santa Cruz

## 5.9. Ensayo de dolor agudo

### 5.9.1. Ensayos de conducta de dolor agudo en machos y hembras C57BL/6

Se utilizaron ratones y ratonas C57BL/6 de dos meses de edad. Cada grupo fue dividido en dos tratamientos. El primer tratamiento correspondió a la inyección de 2.8µg de capsaicina disuelta en etanol concentrado y el segundo tratamiento correspondió a la inyección de la cantidad equivalente del primer tratamiento, pero sólo de vehículo (etanol). Ambos tratamientos fueron llevados a un volumen final de 10µl en solución salina e inyectados intradérmicamente (con aguja del calibre 26) en la pata delantera derecha, la observación del tiempo de lamido de la pata inyectada tuvo una duración de 10 minutos (Caterina *et al.*, 2000).

### 5.9.2. Ensayos de conducta de dolor agudo en machos coinyectados con 17β-estradiol y capsaicina

Se trabajó con ratones machos de dos meses de edad, mismos que fueron separados en cuatro grupos. Al primer grupo se les inyectaron 2.8µg de 17β-estradiol, al segundo 1µg de capsaicina, al tercer grupo 1µg de capsaicina con 2.8µg de 17β-estradiol y al cuarto grupo se les inyectó 1µg de capsaicina con el volumen de etanol equivalente a la cantidad de 17β-estradiol. Los tratamientos de los cuatro

grupos fueron llevados a un volumen final de 10  $\mu$ l con solución salina e inyectados en la pata delantera derecha, la observación del tiempo de lamido de la pata inyectada tuvo una duración de 10 minutos.

#### **5.10. Análisis por Densitometría y Estadística**

Al haber obtenido por lo menos 3 experimentos independientes de los ensayos de RT-PCRs semicuantitativas y western blots, se cuantificaron las bandas observadas de las placas a través del programa ImageJ. Después se normalizaron los datos al dividir los valores de las bandas de la amplificación de mRNA o la proteína de interés con los valores de la banda del control de carga (GAPDH/ actina). Para realizar el análisis estadístico se normalizaron los valores de las hembras con el valor de 1 y se graficó el cambio en los machos respecto a las hembras, la prueba estadística utilizada fue t-student no pareada. Para el ensayo de conducta de respuesta a dolor entre machos y hembras también se realizó t-student no pareada, pero para los ensayos de conducta donde los machos fueron coinyectados con 17 $\beta$ -estradiol y capsaicina se realizó una ANOVA de una vía con un test de comparación múltiple Tukey con el programa GraphPad Prism.

#### **5.11. Análisis in silico de los sitios potenciales de unión de los receptores nucleares de estrógeno en la región promotora del canal TRPV1**

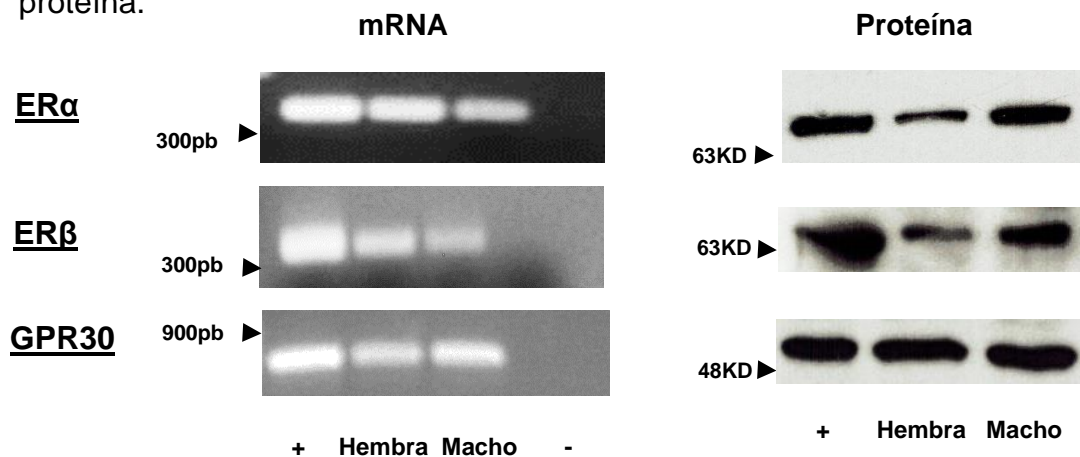
Se descargó la secuencia del gen de TRPV1 de *Mus musculus* (NM\_001001445.2) de NCBI en formato FASTA y se examinaron en <http://jaspar.genereg.net/> los sitios potenciales de unión de los receptores nucleares de estrógeno de *Mus musculus* en la región promotora del canal TRPV1 con una porcentaje de coincidencia mayor o igual al 90%.





## 6.2. Expresión de los receptores a estrógeno nucleares (ER $\alpha$ y ER $\beta$ ) y de membrana (GPR30) en DRG de macho y hembra C57BL/6

Considerando que nuestra hipótesis plantea al 17 $\beta$ -estradiol como un factor importante en dimorfismo sexual en la respuesta al dolor causada por la activación del canal TRPV1, primero se verificó que los ERs se expresaran en el sistema de mayor expresión del canal TRPV1, los DRGs. Para ello a partir de RNA total de los DRGs de hembras y machos C57BL/6J se realizaron los RT-PCR con oligos diseñados para amplificar regiones del mRNA de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPR30, conjuntamente se realizaron las PCR con extractos de tejidos de expresión positiva de cada uno de los receptores a estrógeno (+); ovario para los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  y cerebro para el receptor GPR30. Como se observa en la figura 12 (izquierda), los tres receptores se expresan a nivel de mRNA en los DRGs de ambos sexos. En seguida se comprobó si el mRNA de los receptores se traducía a proteína, para esto se extrajo la proteína de los DRGs de hembras y machos así como de los controles positivos de cada receptor para ser usados en ensayos de western blot. Como se observa en la figura 12 (derecha), los tres receptores se expresan a nivel de proteína.

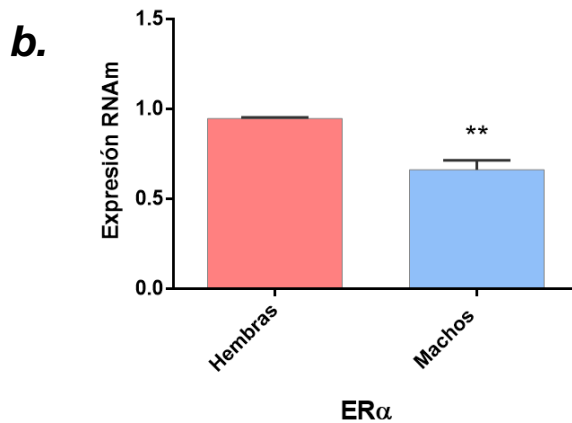
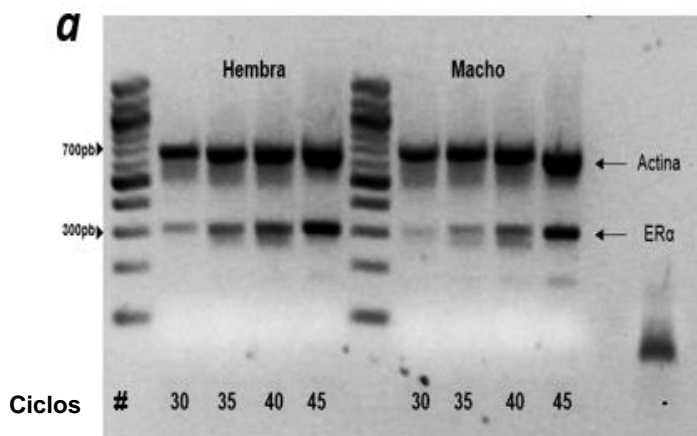


**Figura 12. Expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPR30 en DRGs de macho y hembra.** En la columna izquierda se observa amplificación del fragmento de mRNA de los receptores de estrógeno. En la columna derecha se observa la expresión de proteína de los receptores de estrógeno. El control positivo (+) para ER $\alpha$  y ER $\beta$  fue ovario; el control positivo (+) para GPR30 fue cerebro.

### 6.3. Cuantificación y comparación de la expresión del mRNA de ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPR30 y del canal TRPV1 entre ratones machos y hembras C57BL/6

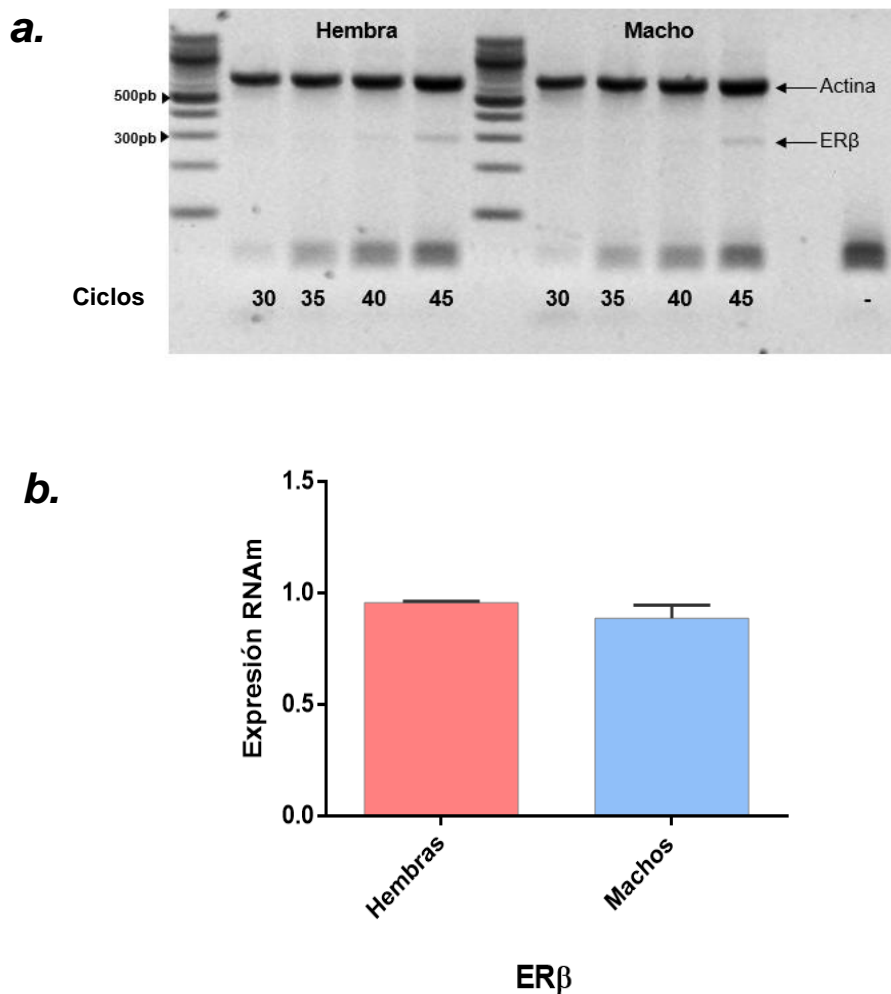
Para establecer si existe una diferencia en la expresión de mRNA de los receptores de estrógeno ER $\alpha$ , ER $\beta$ , GPR30 y el canal TRPV1 en DRGs de ratones de ambos sexos de la misma camada se realizaron RT-PCR semicuantitativas por pares para los cuatro mRNA diana.

Los ensayos de RT-PCR semicuantitativas para el gen ER $\alpha$  indican que las hembras expresan 0.34 veces más este receptor que los machos ya que después de realizar el análisis estadístico con una T de Student no pareada con los valores normalizados del ciclo 30 de actina y 45 de ER $\alpha$  se determinó una diferencia significativa entre machos y hembras con una  $P < 0.05$  (Figura 13).



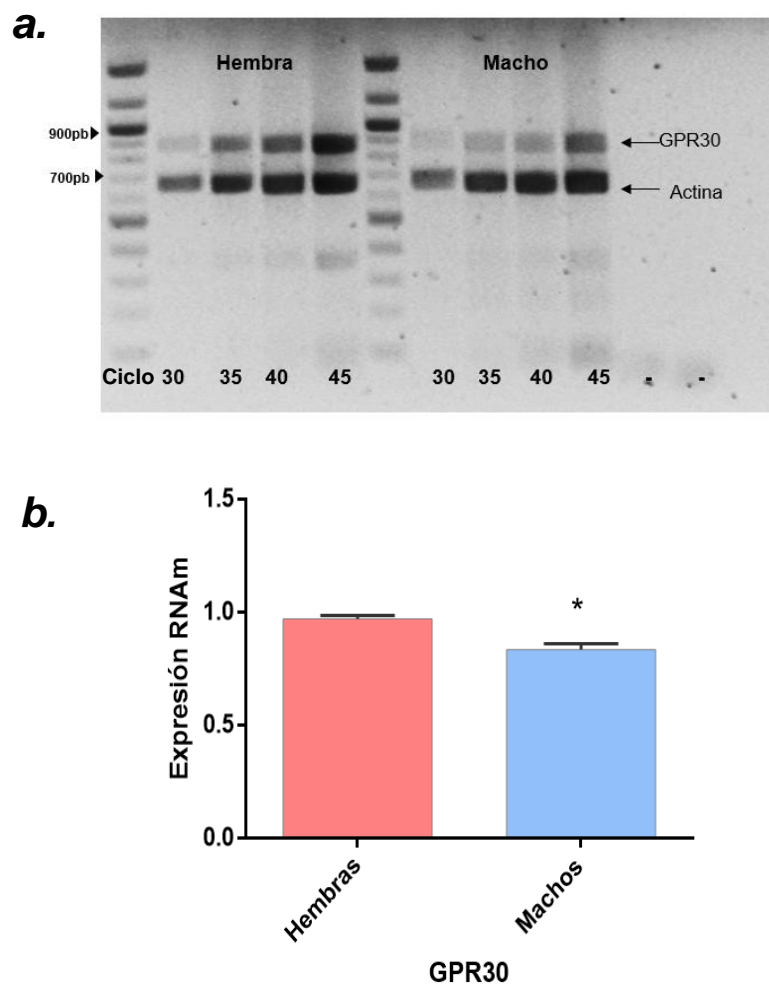
**Figura 13. Expresión del ER $\alpha$  en DRGs de machos y hembras a nivel de mRNA.** **a.** Gel representativo de los ciclos muestreados; **b.** Gráfica que resume los datos de la expresión del receptor ER $\alpha$  en ambos sexos. Se realizó una T-Student no pareada ( $n=3$ ) y se determinó diferencia significativa en expresión entre hembras y machos con una  $P= 0.0058$ . El nivel de expresión promedio del mRNA de ER $\alpha$  en machos es  $0.6639 \pm 0.05308$  en comparación con las hembras establecido como 1.

La expresión del mRNA de ER $\beta$  en DRGs de hembras y machos se aprecia en el gel y la gráfica de la figura 14. Se realizó una t-student no pareada con los valores normalizados del ciclo 30 de actina y 45 de ER $\beta$  y no se observó una diferencia significativa en la expresión de este receptor entre los dos grupos de estudio ya que el valor de  $P > 0.05$ .



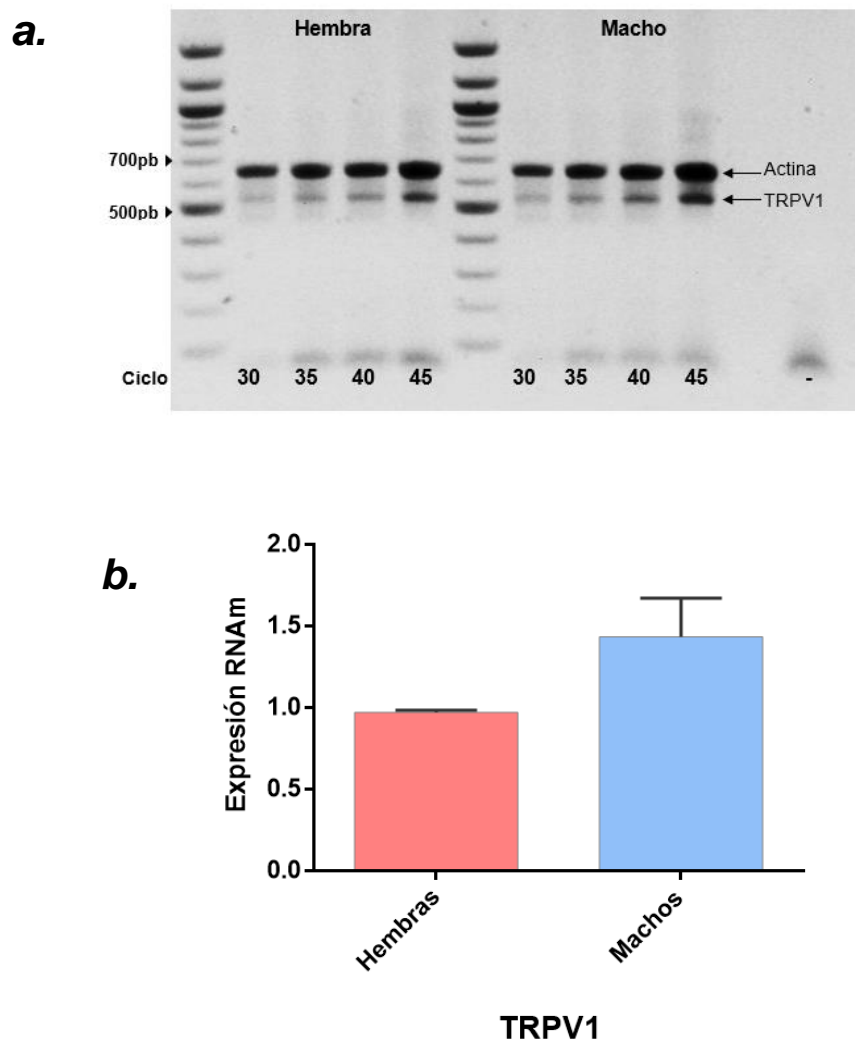
**Figura 14. Expresión del ER $\beta$  en DRGs de machos y hembras a nivel de mRNA.** a) Gel representativo, b) Gráfica que resume los datos de expresión del receptor ER $\beta$ . Se realizó una T-Student no pareada ( $n=3$ ) y se determinó que la diferencia en expresión entre hembras y machos no es significativa con una  $P= 0.3002$  el promedio de la expresión en los machos es de  $0.8900 \pm 0.05859$ , en comparación con las hembras establecido como 1.

El receptor de estradiol de membrana GPR30 se expresa muy poco en los DRG por ello no fue posible hacer la amplificación del receptor y de actina (gen endógeno) en un mismo tubo, en consecuencia, las reacciones se realizaron en diferentes tubos. Al realizar la prueba estadística con los valores normalizados del ciclo 30 de actina y 30 de GPR30 de las muestras, se observó que este receptor se expresa 0.16 veces más en los DRGs de las hembras que en machos y esta diferencia discreta resultó ser estadísticamente significativa ya que  $P < 0.05$ , figura 15.



**Figura 15. Expresión del GPR30 en DRGs de machos y hembras a nivel de mRNA.** **a)** Gel representativo, **b)** Gráfica que resume los datos de expresión del receptor GPR30. Se realizó una T-Student no pareada ( $n=3$ ) y se determinó que la diferencia en la expresión entre hembras y machos si es significativa con una  $P= 0.0107$ . El promedio de la expresión en los machos es de  $0.8367 \pm 0.02650$ , en comparación con las hembras establecido como 1.

La expresión del canal TRPV1 se observa desde el ciclo 30, por lo que se normalizó desde el ciclo 30 de actina y 30 de TRPV1. Los resultados obtenidos de la expresión del canal TRPV1 indican que el TRPV1 tiende a expresarse más a nivel de mRNA en los machos que en las hembras aunque la diferencia no resulto ser significativa después de realizar la prueba estadística (figura 16).

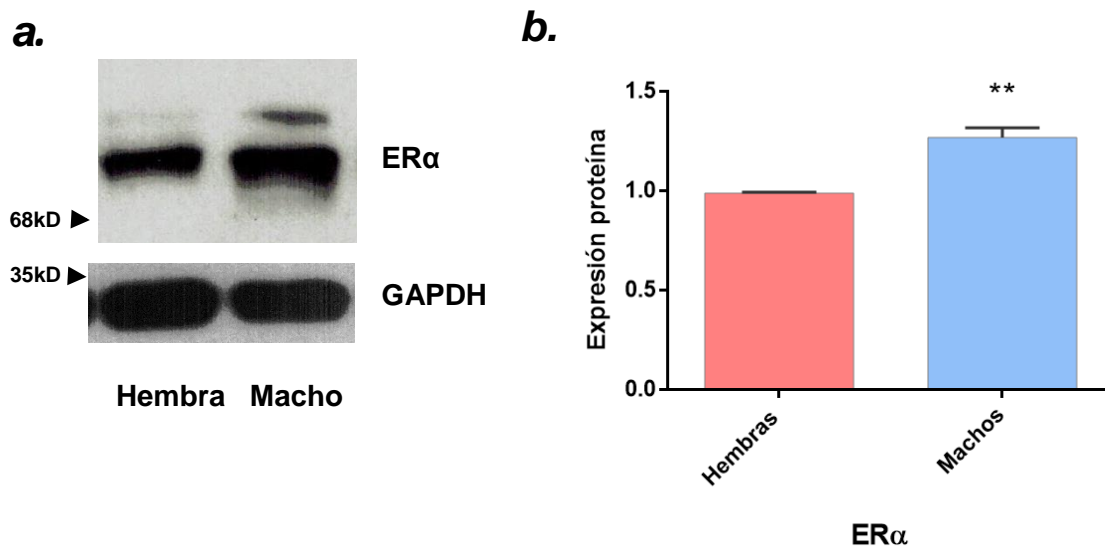


**Figura 16. Niveles de expresión del mRNA para el canal TRPV1 en DRGs de machos y hembras. a)** Gel representativo, **b)** Gráfica que resume los datos de expresión del receptor TRPV1. Se realizó una T-Student no pareada ( $n=3$ ) y se determinó que la diferencia en expresión entre hembras y machos no es significativa con una  $P=0.1230$  el promedio de la expresión en los machos es de  $1.437 \pm 0.2375$ , en comparación con las hembras establecido como 1.

#### 6.4. Cuantificación y comparación entre ratones machos y hembras C57BL/6 de los receptores de estrógeno ER $\alpha$ , ER $\beta$ y GPR30 a nivel de proteína

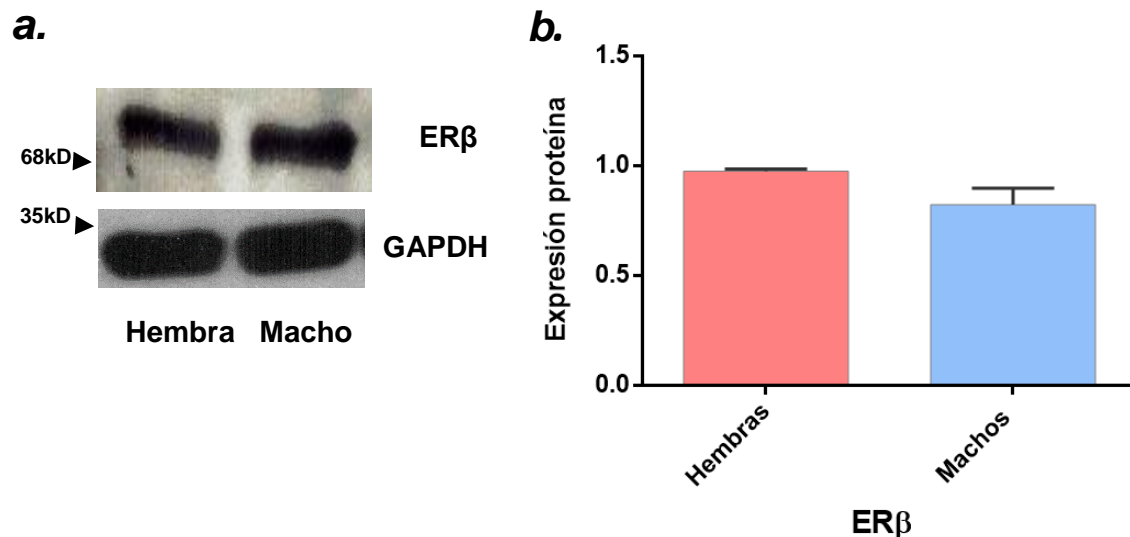
Además de determinar los niveles de mRNA de los receptores de estrógeno y del canal TRPV1 se realizaron ensayos de western blot con DRGs de ratones de ambos sexos de la misma camada para establecer si la expresión a nivel de mRNA de los receptores de estrógeno y el canal TRPV1 presentan las mismas proporciones a nivel de proteína en los DRGs de machos y hembras.

Como se puede observar en la Figura 17, el ER $\alpha$  se expresa 0.27 veces más en los machos que en las hembras. Después de realizar la estadística se observa una diferencia significativa con una  $P < 0.05$ . Al comparar este resultado con el obtenido a nivel de mRNA parece que el resultado es el contrario ya que a nivel de mRNA las hembras expresan más el receptor que los machos y con una diferencia significativa.



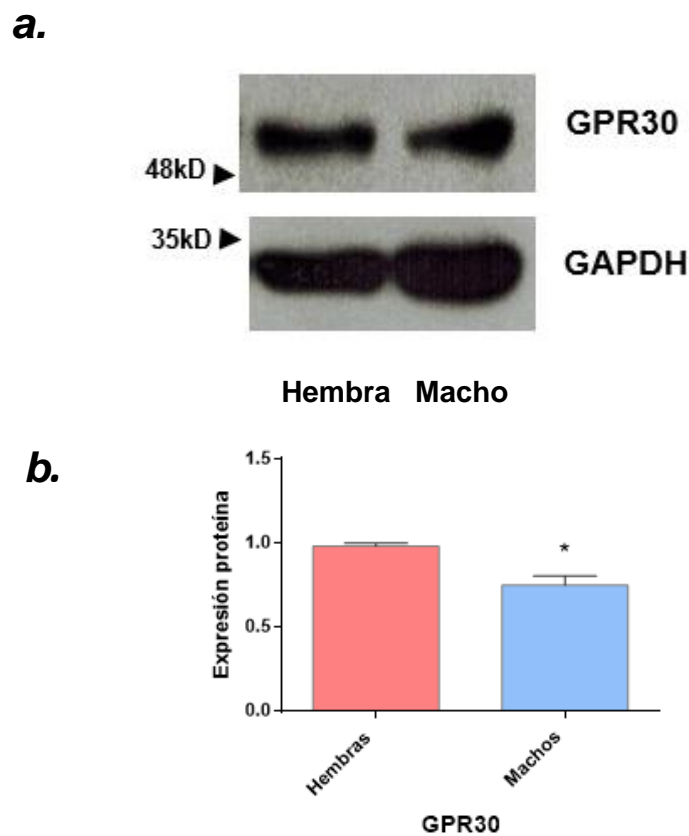
**Figura 17. Expresión del receptor ER $\alpha$  a nivel de proteína en DRGs de machos y hembras.** **a)** Imagen representativa del WB para la detección del ER $\alpha$  y el control de carga (GAPDH) en DRG **b)** Gráfica que resume los datos de la expresión del receptor ER $\alpha$  en DRGs. Se realizó una T-Student no pareada ( $n=3$ ) y se demostró que hay una diferencia significativa en la expresión de ER $\alpha$  en DRGs de machos y hembras con una  $P= 0.0049$ . El promedio de los datos de los machos es  $1.271 \pm 0.04806$  con respecto al valor de proteína en hembras establecido como 1.

En los ensayos de RT-PCR semicuantitativos se demostró que el mRNA de ER $\beta$  se expresa prácticamente en las mismas proporciones en los DRGs en ambos sexos revelando que el receptor ER $\beta$  es el único receptor que no presenta una diferencia marcada en la expresión entre sexos. Para determinar si los datos de la expresión de este receptor a nivel de mRNA presentan similitud con los datos de proteína se realizaron los ensayos de western blot y se encontró que los datos a nivel de proteína son muy parecidos ya que el análisis estadístico señala que no hay diferencia significativa en la expresión con una  $P > 0.05$  (Figura 18).



**Figura 18. Expresión de receptor ER $\beta$  a nivel de proteína en DRGs de machos y hembras. a)** Imagen representativa del WB para la detección del ER $\beta$  y el control de carga (GAPDH) en DRG **b)** Gráfica que resumen los datos de la expresión del receptor ER $\beta$  en DRGs. Se realizó una T-Student no pareada ( $n=4$ ) y se demostró que no hay una diferencia significativa en la expresión de ER $\beta$  en DRG de machos y hembras con una  $P = 0.0901$ . El promedio de los datos de los machos es  $0.8232 \pm 0.07448$ , con respecto al valor de proteína en hembras establecido como 1.

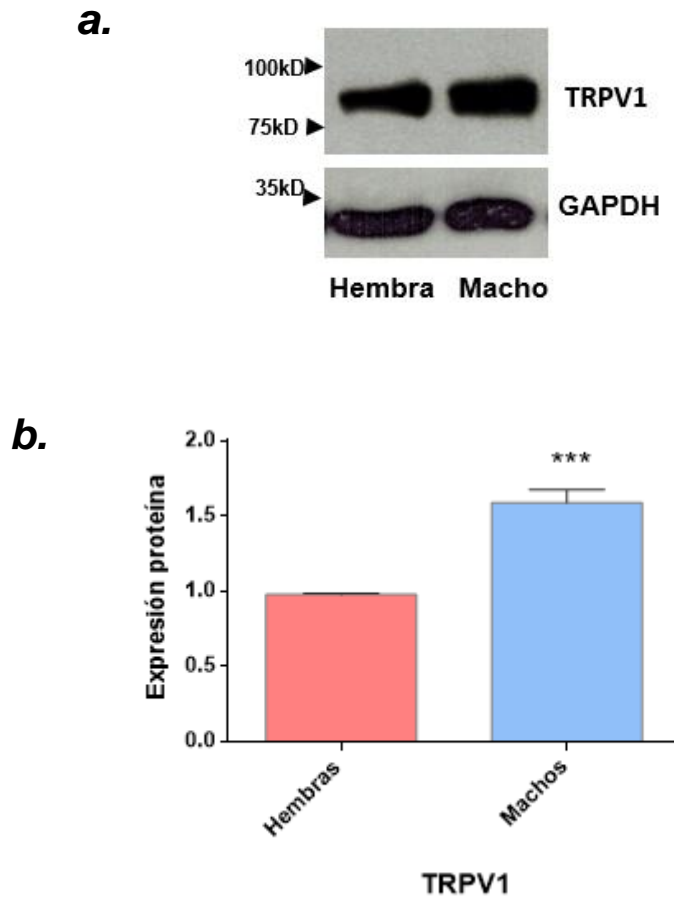
Con respecto al receptor de estrógeno de membrana GPR30 resulto expresarse 0.16 veces más en hembras que en machos a nivel de mRNA en DRG y el nivel de proteína parece concordar debido a que se observó una mayor expresión de este receptor en las hembras en comparación con los machos, esta diferencia resulta ser significativa, con un valor de  $p < 0.05$  con diferencia de casi el 0.25 (figura 19).



**Figura 19. Expresión de receptor GPR30 a nivel de proteína en DRGs de machos y hembras. a)** Imagen representativa del WB para el GPR30 y el control de carga (GAPDH) en DRGs **b)** Gráfica que resume los datos de la expresión del receptor GPR30 en DRG. Se realizó una T-Student no pareada ( $n=3$ ) y se demostró que hay una diferencia significativa en la expresión de GPR30 en DRG de machos y hembras con una  $P= 0.0152$ . El promedio de los datos de los machos es  $0.7505 \pm 0.05473$ , con respecto al valor de proteína en hembras establecido como 1.



Finalmente, se examinó la expresión de la proteína del canal TRPV1 en los DRGs de ambos sexos y se comprobó que los machos tienen más canal TRPV1 que las hembras  $P < 0.05$  de manera que el dato concuerda con el obtenido en las RT-PCR. (Figura 20).

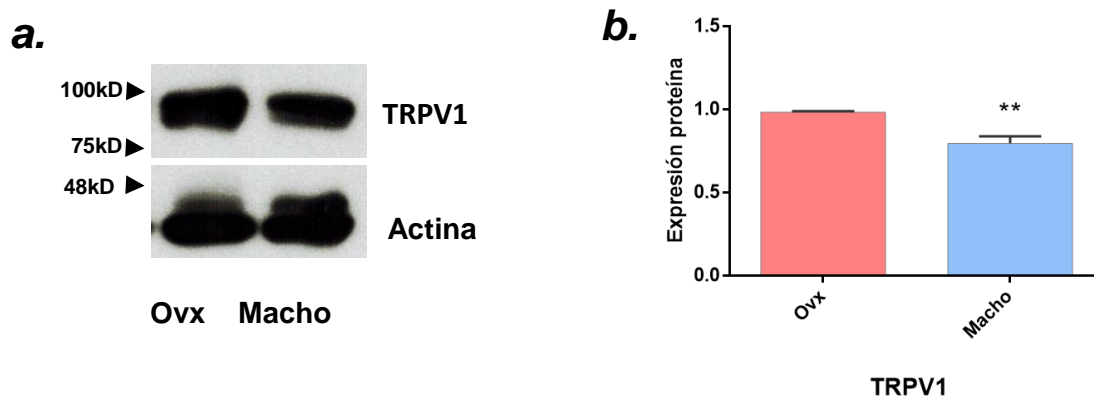


**Figura 20. Expresión de receptor TRPV1 a nivel de proteína en DRGs de machos y hembras. a)** Imagen representativa de la detección de TRPV1 y el control de carga (GAPDH) en DRGs **b)** Gráfica correspondiente a los datos de la expresión del receptor TRPV1 en DRGs. Se realizó una T-Student no pareada ( $n=5$ ) y se demostró que hay una diferencia significativa en la expresión de TRPV1 en DRGs de machos y hembras con una  $P= 0.0001$ . El promedio de los datos de los machos es  $1.588 \pm 0.08729$  con respecto al valor de proteína en hembras establecido como 1.

## 6.5. Comparación de los niveles de expresión del canal TRPV1 entre ratones C57BL/6 machos y hembras ovariectomizadas

Para definir si el componente hormonal es un factor que regula la expresión del canal TRPV1, se eliminó en las hembras el tejido de mayor producción del  $17\beta$ -estradiol y de otras hormonas, mediante la ovariectomización (ovx). Después de dos meses de recuperación de la cirugía a las ratonas se les removieron los DRGs para extraerles la proteína total.

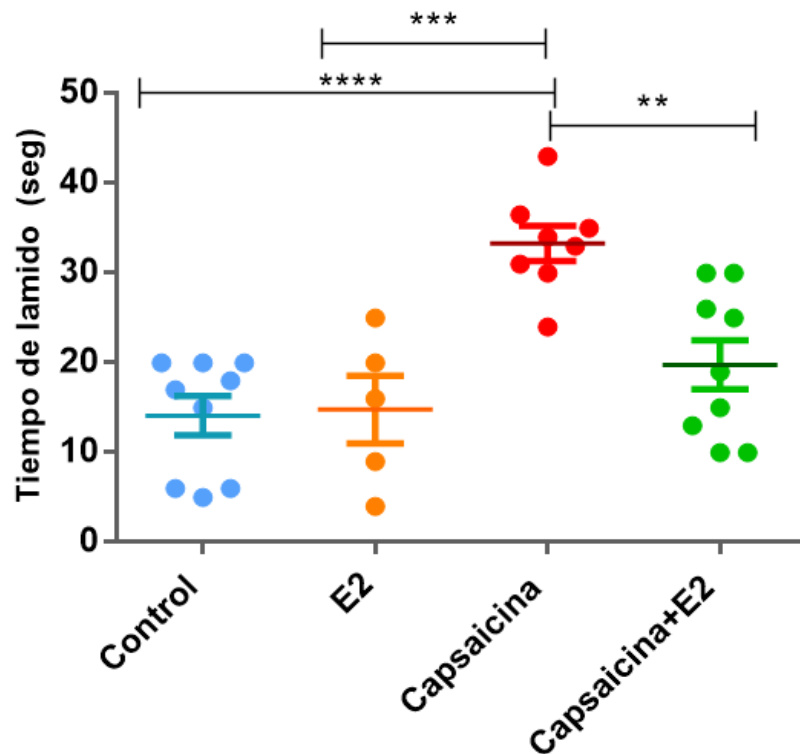
Con la proteína que se obtuvo de los DRGs de las ratonas ovx y proteína de DRGs de machos se realizaron ensayos de WB para comparar la expresión del canal TRPV1 en ambos grupos. Posterior a la normalización de los datos y realizar la prueba estadística, se encontró que las hembras ovx expresan de manera significativa una mayor cantidad de canal TRPV1 que los machos. Los machos expresan 0.20 veces menos el canal que las hembras (Figura 21). Ese resultado nos indica que la eliminación del tejido que sintetiza la mayor cantidad de hormonas (ovarios) es un factor que modifica la expresión del canal TRPV1.



**Figura 21. Expresión de receptor TRPV1 a nivel de proteína en DRGs de ovx y machos. a)** Imagen representativa del WB para la detección de TRPV1 y el control de carga (GAPDH) en DRGs **b)** Gráfica correspondiente a los datos de la expresión del receptor TRPV1 en DRGs. Se realizó una T-Student no pareada ( $n=4$ ) y se demostró que hay una diferencia significativa en la expresión de TRPV1 en DRGs ovx y machos con una  $P=0.0049$ . El promedio de los datos de los machos es  $0.7976 \pm 0.04273$ .

## 6.6. Ensayos de conducta de dolor agudo en machos C57BL/6 co-inyectados con E2 y capsaicina

Al inyectar E2 en solución salina los ratones machos presentaron una respuesta de dolor muy parecida a la que mostró el grupo al que se le inyectó el vehículo (control), de modo que el E2 no genera una respuesta de dolor per se. Después a otro grupo de ratones se les inyectó capsaicina y se registró un tiempo de lamido aproximado  $33 \pm 1.9$  s. Cuando al cuarto grupo de ratones se co-inyectó la capsaicina y E2, se observó que el tiempo de dolor generado por efecto del agonista del canal TRPV1 disminuyó a  $19 \pm 2.7$  s. Al hacer una ANOVA con análisis post hot de Tukey se observó una diferencia significativa entre la respuesta de dolor generada por la capsaicina y la co-inyección de capsaicina con E2 (Figura 22).



**Figura 22.** Gráfica en donde se resumen los datos obtenidos en los ensayos de conducta en machos co-inyectados con E2 y capsaicina. Cada punto representa un individuo. Se utilizó una ANOVA con análisis post hot de Tukey<sup>\*\*\*\*</sup>  $P < 0.0001$ . Los valores obtenidos del vehículo ( $14.11 \pm 2.182$ ,  $n=9$ ) y de E2 ( $14.80 \pm 3.760$ ,  $n=5$ ) no muestran una diferencia significativa. Entre los valores de capsaicina ( $33.31 \pm 1.939$ ,  $n=8$ ) y E2 con capsaicina ( $19.78 \pm 2.727$ ,  $n=9$ ) si se determinó una diferencia significativa.

## **VII. Discusión**

El canal TRPV1 es un transductor de estímulos químicos y térmicos que se ha relacionado con patologías de dolor crónico, por esta razón, ha tenido un gran auge en las últimas décadas el estudio de los procesos fisiológicos en los que participa y su regulación, esto con el fin de encontrar antagonistas que sirvan como tratamiento terapéutico (Vay *et al.*, 2011).

La búsqueda de tratamientos terapéuticos para contrarrestar el dolor asociado a diversas patologías, se ha visto comprometida por múltiples factores, entre ellos el dimorfismo sexual en la percepción del dolor, ya que en los últimos años en varios estudios se ha sugerido que las mujeres son menos tolerantes y tienen un menor umbral al dolor (Fillingim *et al.*, 2009). Para el caso del canal TRPV1 se realizó un estudio en un grupo de voluntarios de ambos sexos a los cuales se les aplicó capsaicina de manera tópica, después se aplicó temperatura para producir sinergia en el modo de activación del canal TRPV1 y se observó una diferenciación sexual en la percepción de la intensidad del dolor producido, siendo las mujeres quienes lo clasificaron con un mayor puntaje (Frot, *et al.*, 2004).

Los resultados del trabajo mencionado son parecidos a los obtenidos en una investigación realizada con ratas en donde se determinó que la respuesta al dolor generado por la inyección de capsaicina en la pata delantera era más intensa en las hembras que en los machos (Yu-Ching *et al.*, 2009). No obstante, en el presente trabajo, los resultados de los ensayos de dolor agudo en ratones de ambos sexos a los que se les inyectó capsaicina en la pata delantera, demostraron que los machos tienen una respuesta al dolor más aguda que las hembras, debido a que el tiempo de lamido de la pata inyectada fue mayor en los machos (figura 11).

La discrepancia en los resultados de la respuesta al dolor generada por la activación del canal TRPV1 entre en el presente estudio y los estudios anteriormente mencionado, podría ser explicada por un fenómeno de dependencia de especie. Esta hipótesis se fundamenta con el trabajo realizado por Mogil *et al.* 2000 quienes mostraron datos que indican una diferencia en el tiempo de latencia del dolor generado en ensayos de retirada de la cola a 49°C entre sexos en ratas y ratones,

así como entre cepas, demostrando que la percepción es una interacción entre el sexo y el fondo genético de los roedores.

A pesar de que existen estudios en los que se ha investigado el dimorfismo sexual en la percepción del dolor generado por la transducción de estímulos por TRPV1, la mayoría se han quedado con datos de ensayos conductuales dejando a un lado los ensayos moleculares que bien podrían ayudar en el aporte de información sobre los posibles mecanismos por los cuales se observa el dimorfismo sexual (Yu-Ching *et al.*, 2009; Payrits *et al.* 2017). Asimismo es interesante que se encuentre un estudio en el que se da a conocer el dimorfismo sexual de expresión del canal TRPV1 en vejiga de ratón (Kobayashi *et al.* 2009), tejido que presenta una baja expresión del canal TRPV1 y que no participa en la vía de señalización del dolor, mientras que para DRGs tejido donde se concentran los somas de las neuronas sensoriales encargadas de transmitir la señal nociceptiva y tejido de mayor expresión del canal TRPV1, no exista un estudio comparativo de la expresión de TRPV1 entre sexos.

En el presente trabajo se propuso investigar sí la disimilitud en la respuesta al dolor entre sexos se debe a una diferencia en la expresión del canal TRPV1. Para ello, se realizó la cuantificación y comparación de la expresión de TRPV1 tanto a nivel de mRNA (figura 16) como de proteína en los ganglios de la raíz dorsal de ratones de ambos sexos (figura 20). A nivel de mRNA se determinó que hay una tendencia en la que los machos expresan más el canal TRPV1 y a nivel de proteína se demostró de manera contundente que los machos expresan más el canal TRPV1 que las hembras. Esta evidencia molecular se asocia directamente con la respuesta fisiológica: una mayor expresión del canal TRPV1 en DRG de ratones macho y una mayor respuesta al dolor por capsaicina en comparación de las hembras.

El dimorfismo sexual en la percepción del dolor se ha tratado de explicar por diferentes factores fisiológicos y psicológicos, sin embargo, uno de los que ha tenido un mayor apoyo ha sido el perfil hormonal entre sexos. Particularmente en las mujeres se ha estudiado la influencia natural de las variaciones de los niveles de hormonas femeninas: progesterona y E2 (Maurer *et al.*, 2016). Desde hace varios

años a la progesterona se le ha atribuido un efecto protector y recientemente esta hipótesis fue confirmada por lo menos para el dolor relacionado al canal TRPV1 en un estudio en el que se demostró que la progesterona promueve la disminución de la respuesta de dolor a capsaicina debido a que esta hormona funciona también como un antagonista de la proteína chaperona Sigma 1, esta chaperona resulta ser de crucial importancia para brindar estabilidad a la proteína TRPV1 (Ortíz-Rentería *et al.*, 2018). Por lo tanto, la progesterona al bloquear a Sigma 1, ejerce un efecto indirecto y de regulación negativa en la expresión del canal TRPV1, favoreciendo una reducción en el umbral del dolor a capsaicina.

En cambio, el papel del  $17\beta$ -estradiol en el dolor aún no ha podido ser bien definido puesto que existen datos contrapuestos en cuanto a su posible papel pro o anti-nociceptivo. Por mencionar un ejemplo tenemos el caso de la migraña, enfermedad que comienza a tener una diferenciación sexual a partir de la pubertad (cuando comienzan a distinguirse las concentraciones de las hormonales sexuales entre sexos) y que, durante el periodo reproductivo, las mujeres padecen tres veces más que los hombres (Maurer *et al.*, 2016). Además, en estudios epidemiológicos se ha observado que durante la fase folicular del ciclo menstrual (fase con el pico más alto de  $17\beta$ -estradiol) se atenúa un poco la migraña, lo que indicaría que  $17\beta$ -estradiol es una molécula anti-nociceptiva (MacGregor 1996; Martin *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos estudios sugieren que los episodios de migraña declinan durante la menopausia (el efecto del  $17\beta$ -estradiol sería pro-nociceptivo), mientras que otros estudios sugieren que los síntomas de la migraña empeoran después de la menopausia (Brandes, 2006; Ripa *et al.*, 2015; Neri *et al.* 1993) Conjuntamente, en varios reportes se ha mostrado que en las mujeres postmenopáusicas a quienes se les administró estrógenos exógenos se exacerban los síntomas de la migraña (Maurer *et al.*, 2016).

Como sucede con la migraña en varias patologías nociceptivas se ha observado una tendencia en la que durante los picos de mayor concentración de  $17\beta$ -estradiol se observa una disminución del dolor, pese a ello, también se puede encontrar

reportes en los que se contradice esta tendencia (Maurer *et al.*, 2016; Craft *et al.*, 2007).

Una alternativa a los estudios epidemiológicos es el análisis de la influencia directa de  $17\beta$ -estradiol en la regulación de los elementos que participan en la respuesta de dolor e inflamación. Para el caso del canal TRPV1 se han realizado estudios en los que se compara la respuesta de dolor generada por el agonista del canal TRPV1 en hembras Ovx y Ovx con reemplazo de  $17\beta$ -estradiol y se ha observado una respuesta más aguda en los animales a los que se les administró  $17\beta$ -estradiol (Yamagata *et al.*, 2016; Payrits *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha reportado un aumento en la expresión del canal TRPV1 a nivel de mRNA en células de endometrio y del ganglio trigeminal proponiendo que la regulación del canal TRPV1 en estos tejidos es por una vía genómica (Pohóczyk *et al.*, 2016; Yamagata *et al.*, 2016). En contraste, existe un reporte obtenido a través de ensayos electrofisiológicos en neuronas DRG de rata tratadas con  $17\beta$ -estradiol en donde demuestran una disminución de la activación del canal TRPV1 y de acuerdo con sus datos esta regulación tiene que ver con una regulación no genómica (Xu *et al.*, 2008).

En vista de que son pocos los reportes que tratan sobre la influencia del  $17\beta$ -estradiol en la expresión del canal, uno de nuestros objetivos fue determinar si el  $17\beta$ -estradiol tiene algún efecto en la expresión del canal TRPV1 en nuestro modelo, para esto primero se verificó si en los DRGs se expresaban los receptores de estrógeno nucleares ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ) y de membrana (GPR30) a nivel de mRNA y de proteína y como se observa en la figura 12, estos tres receptores se expresan a nivel de transcrito y proteína. Con respecto a la expresión de los receptores  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  en DRGs hay un reporte en ratas en el cual describen que el  $ER\beta$  tiene una distribución en las neuronas de todos los diámetros mientras que el  $ER\alpha$  se expresa en casi todas las neuronas de diámetro pequeño y ocasionalmente en las neuronas de diámetro mediano, además mencionan que la distribución de ambos receptores es parecida entre sexos (Taleghany *et al.*, 1999).

La observación de la distribución de los receptores en el sistema nervioso y sus gradientes de concentración son de considerable interés, dado que la activación de ER $\alpha$  puede tener efectos diferentes de aquellos mediados por ER $\beta$  en un mismo sistema neuronal (Taleghany *et al.*, 1999), por este motivo además de determinar la presencia de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$  y GPR30 en DRGs también se compararon sus niveles de expresión de entre machos y hembras a nivel de mRNA y de proteína. Para el ER $\beta$  no observamos una diferencia significativa en su expresión entre sexos a nivel de mRNA ni a nivel de proteína (figura 14 y 18). Con respecto a GPR30, encontramos que tanto el mRNA como la proteína se expresan significativamente más en hembras que en machos (figura 15 y 19). Finalmente, para el ER $\alpha$  se observó un nivel de expresión mayor del mRNA en los DRGs de hembras que los de machos (figura 13). En contraste a nivel de proteína se determinó que los machos presentan mayor expresión de este receptor (figura 17), este dato nos podría estar hablando de una regulación postranscripcional y/o postraducciona, aunque no podemos descartar que la disparidad en los datos se deba a la baja sensibilidad del muestreo de las RT-PCR semicuantitativas.

En el trabajo realizado por Taleghany y colaboradores hay un ensayo en el que comparan la inmunoreactividad del receptor ER $\alpha$  en DRGs de ratas ovx con ratas ovx tratadas con 17 $\beta$ -estradiol, los autores describen que la cantidad de ER $\alpha$  observada en ratonas tratadas con 17 $\beta$ -estradiol fue mucho menor que la observada en las ratonas ovx, sugiriendo que el tratamiento crónico con 17 $\beta$ -estradiol reduce los niveles ER $\alpha$ , estos resultados coinciden con los obtenidos a nivel de proteína en el presente trabajo ya que en los machos quienes contienen una menor concentración de 17 $\beta$ -estradiol expresan más el receptor ER $\alpha$  con respecto a las hembras (figura 17).

Una vez que se tuvo la evidencia de que los DRGs expresan los receptores de estrógeno, el siguiente paso fue investigar si el 17 $\beta$ -estradiol participa en la expresión del canal TRPV1. Para este fin, se comparó la cantidad de proteína total de TRPV1 en los DRGs de hembras ovx y machos (figura 21). Con este experimento pudimos observar que cuando las hembras contienen una alta concentración de



17 $\beta$ -estradiol tienen una menor cantidad de TRPV1 con respecto a los machos, pero que cuando a las hembras se les retiran los ovarios y por ende se reduce la concentración de 17 $\beta$ -estradiol en su sistema, los niveles de TRPV1 aumentan con respecto a los machos de modo que se podría argumentar que el 17 $\beta$ -estradiol participa en la regulación del canal TRPV1 en los DRGs de ratón.

Dado que el 17 $\beta$ -estradiol afecta directamente la expresión del TRPV1, la regulación que se observa podría ser genómica. En primera instancia se podría sugerir que la regulación que ejerce el 17 $\beta$ -estradiol sobre la expresión del TRPV1 es negativa ya que cuando hay más 17 $\beta$ -estradiol se expresa menos, asimismo, tras realizar el análisis in silico de los sitios potenciales de unión de los receptores nucleares de estrógeno en la región promotora del canal TRPV1 con <http://jaspar.genereg.net/> se encontró que el receptor ER $\beta$  tiene varios posibles sitios de unión con un gran porcentaje de afinidad. No obstante, en un trabajo en el que se analiza la expresión del canal TRPV1 en ratones machos knockout para ER $\alpha$  y ER $\beta$  se observa una disminución en la expresión del canal TRPV1 no un aumento (Cho y Chaban 2012), por lo cual la regulación de la expresión de TRPV1 por los receptores a estrógeno no puede ser negativa.

Una posible explicación del efecto del 17 $\beta$ -estradiol en la regulación de la expresión del canal TRPV1, tendría que ver con el hecho de que al parecer el 17 $\beta$ -estradiol regula de manera negativa la expresión del ER $\alpha$  en los DRGs, de modo que los machos al tener menos 17 $\beta$ -estradiol expresan más ER $\alpha$  el cual podría regular una mayor expresión del canal TRPV1 en machos que en hembras.

La regulación de la expresión de TRPV1 por el ER $\alpha$  puede ser clásica, es decir, mediante la unión de ER $\alpha$  en la región promotora empero en el análisis in silico de los potenciales sitios de unión del ER $\alpha$  en la región promotora de TRPV1 de ratón se encontró que son muy pocos los sitios y que tienen bajo porcentaje de afinidad. De igual manera la regulación genómica del ER $\alpha$  puede ser de manera no clásica por la unión del ER $\alpha$  a otros factores de transcripción. Un factor de transcripción que interactúa con el ER $\alpha$  para la regulación de varios genes diana ampliamente descrito es Sp1, factor que de manera interesante participa en la activación transcripcional

del canal TRPV1 en los DRGs dando como resultado un incremento en la expresión del canal TRPV1 (Björnström y Sjöberg, 2005; Chu *et al.*, 2011).

Con el propósito de determinar si el 17 $\beta$ -estradiol también tiene un efecto en la respuesta al dolor generado por el TRPV1 de manera un poco más directa, se realizaron ensayos de dolor agudo en ratones machos. A un grupo se le inyectó 17 $\beta$ -estradiol en la pata delantera derecha y el tiempo de lamido fue muy parecido al obtenido en el grupo control, de esta manera se comprobó que el 17 $\beta$ -estradiol por sí mismo no es un agente que induzca una respuesta de dolor. A otro grupo se le inyectó capsaicina y se registró la respuesta de dolor típica. Pero lo trascendental ocurrió cuando al cuarto grupo se le co-inyectó capsaicina con 17 $\beta$ -estradiol, puesto que se observó una disminución significativa de la respuesta al dolor en 10 minutos de observación, este resultado nos denotaría que el 17 $\beta$ -estradiol también podría participar en una regulación no genómica del dolor asociado al canal TRPV1.

Xu y colaboradores en el 2008 por medio de ensayos electrofisiológicos determinaron, al igual que nosotros que el 17 $\beta$ -estradiol por si mismos no activa al canal TRPV1, asimismo describen una disminución en la activación del canal TRPV1 por capsaicina después del tratamiento de las células de DRGs de rata con 17 $\beta$ -estradiol, este resultado lo justificaron por una regulación no genómica dado que no observaron un cambio en la expresión de la proteína del canal TRPV1 en cultivos de DRG. Un hecho controversial es que la disminución de la corriente del canal TRPV1 que observaron en las células que fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol una noche antes no la observaron en aquellas que fueron tratadas 30 minutos antes de los registros, esto es relevante ya que en general la acción no genómica se puede observar en unos cuantos minutos, como lo observamos en los ensayos de conducta donde en tan solo 10 minutos pudimos registrar una disminución de la respuesta de dolor.

La regulación no genómica del canal TRPV1 puede darse principalmente por dos mecanismos, el primero consiste en la mediación del tráfico del canal hacia la membrana plasmática. El TRPV1 se encuentra insertado en la membrana

plasmática pero también en el retículo endoplasmático. La activación de ciertas vías de señalización puede favorecer el tráfico del TRPV1 desde el retículo endoplasmático a la membrana, generalmente mediante la fosforilación. Por ejemplo, la activación de PKC puede conducir a la inserción de TRPV1 en la membrana a través de la exocitosis mediada por el SNARE, también la activación de PKA dependiente de AMPc puede mediar el tráfico rápido de los monómeros de TRPV1 desde compartimientos intracelulares a la membrana plasmática para formar el canal funcional (Szallisi y Blumberg, 2007). Además, la vía de señalización del NGF activa a la señalización de la cinasa Src, que en consecuencia fosforila al TRPV1 en Y200 para aumentar los niveles de TRPV1 en la membrana (Ho *et al.*, 2012).

El segundo es por modificación de estado fosforilado, que a su vez involucra dos vías de regulación del canal: la sensibilización y la desensibilización. La sensibilización se refiere a un cambio en la estructura del canal, promovido por fosforilaciones, de tal manera que se facilita la apertura del poro del canal TRPV1 ante estímulos de baja intensidad y la desensibilización es lo contrario, es decir, que el umbral de activación del canal aumenta e imposibilita su apertura aún en la presencia de un estímulo. La fosforilación del canal TRPV1 por PKC o PKA a través de la estimulación de múltiples receptores, incluidos, los receptores a bradiquinina B1 y B2, los receptores purinérgicos P2, el receptor de quimiocinas CCL3 y los receptores de endotelina han demostrado aumentar la sensibilidad del canal. Entre los sitios claves de fosforilación del TRPV1 para PKC y PKA se encuentran Ser800 y Ser116 respectivamente (Morales-Lázaro *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2012).

La desensibilización del canal inicia con un incremento de calcio intracelular que promueve a la desfosforilación del TRPV1 impulsada por el flujo de calcio que activa la fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina, calcineurina (Ho *et al.*, 2012).

Los tres receptores de estrógeno interactúan con un gran número de intermediarios en ambas cascadas de señalización que podrían regular al canal TRPV1 de una manera no genómica entre los que se encuentran las PKA, PKC, PIP2, calmodulina, por mencionar algunos (Prossnitz, *et al.*, 2008), sin embargo, la investigación sobre

los mecanismos molecular por los cuales el  $17\beta$ -estradiol regula al canal TRPV1 de manera no genómica es limitada.

El dolor a diferencia de la naturaleza relativamente más objetiva de otras sensaciones, puede verse restringido por factores fisiológicos, etológicos y culturales, por lo que las pruebas de conducta en humanos han sido fuertemente criticadas (Dubin *et al.*, 2010). Por esta razón, el uso de modelos animales ha sido una alternativa más objetiva para el estudio del dimorfismo sexual y los factores que intervienen en la respuesta de dolor, sin embargo, el hecho de que la percepción del dolor parece no solo depender del sexo sino también de la cepa complica su estudio objetivo. Por ello, podría ser una buena alternativa el uso de alguna línea celular de origen humano que en este caso exprese los receptores de estrógeno y el canal TRPV1, para determinar de manera contundente sí el  $17\beta$ -estradiol regula la expresión del canal TRPV1, de qué modo y por cuáles vías moleculares. El conocimiento que se obtenga será muy valioso para el uso terapéutico.

El presente trabajo es un acercamiento al entendimiento del papel del  $17\beta$ -estradiol en la regulación del dolor relacionado al canal TRPV1, los resultados sugieren que en ratones el  $17\beta$ -estradiol ejerce un papel anti-nociceptivo y que esta regulación se podría dar tanto por una vía genómica como no genómica.

Finalmente, aunque no se ha conseguido clasificar inequívocamente a los estrógenos como moléculas pro- o anti-nociceptivas, tal vez el  $17\beta$ -estradiol sea un agente que tenga ambas características, dependiendo de tipo de dolor, la región y todos los elemento que propicien la condición, ya que por ejemplo, en un estado nociceptivo con presencia de inflamación se libera un conjunto de sustancias que podrían interactuar entre sí, con los diferentes transductores y con el  $17\beta$ -estradiol para la potencializar o disminuir la percepción del dolor (Chaban, 2013). Por lo tanto, es necesario un estudio a mayor profundidad de los mecanismos por los cuales el  $17\beta$ -estradiol regula al canal TRPV1.

## **VIII. Conclusiones**

- a)** Los receptores nucleares de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$  y el receptor de membrana de estrógeno GPR30 se expresan en los DRGs de ratones de ambos sexos de la cepa C57BL/6.
  
- b)** Nuestros resultados sugieren que existe mayor expresión del mRNA de ER $\alpha$  en hembras que en machos, sin embargo, a nivel de proteína se observa lo contrario. El ER $\beta$  no se expresa diferencialmente entre sexos tanto a nivel mRNA como de proteína. El GPR30 se expresa más en hembras que en machos en mRNA y proteína. El TRPV1 se expresa más en macho que en hembras tanto a nivel de mRNA y como de proteína.
  
- c)** Los ratones macho de la cepa C57BL/6 presentaron un menor umbral al dolor generado por capsaicina, el agonista del canal TRPV1, en comparación con las hembras, en contraste con lo observado en estudios realizados en humanos y ratas.
  
- d)** La ovariectomización repercute directamente en el aumento de los niveles proteicos del canal TRPV1.
  
- e)** En ensayos de conducta el 17 $\beta$ -estradiol disminuye la respuesta de dolor generada por el agonista del canal TRPV1.

## ***IX. Perspectivas***

- Realizar ensayos más precisos para la cuantificación a nivel de mRNA (PCR en tiempo real) de los receptores a estrógeno y del canal TRPV1 entre sexos.
- Realizar ensayos in silico con una mayor profundidad para determinar si el gen del canal TRPV1 existe una región en la que se unan los receptores de estrógeno y pueda modular la transcripción del canal TRPV1.
- En caso de encontrar alguna zona de posible unión, realizar ensayos para determinar si esa región es un ERE.
- En caso de no encontrar una región ERE determinar si la regulación del canal TRPV1 esta medida por algún factor de transcripción acoplado a un receptor de estrógeno.
- Realizar ensayos para determinar las vías moleculares por las cuales el 17 $\beta$ -estradiol podría también regular de manera no genómica a canal TRPV1.
- Usar una línea celular de origen humano que exprese al canal TRPV1 y a los receptores de estrógeno. Para determinar si el 17 $\beta$ -estradiol ejerce algún tipo de regulación en el canal TRPV1 (ya sea positiva o negativa) en humanos.

## **X. Referencias**

- Advansta. (2011). Análisis de Proteínas. Electroforesis, Transferencia e Inmunodetección.
- Arnal, J.-F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M.,... Katzenellenbogen, J. (2017). Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiological Reviews*, 97(3), 1045–1087.
- Bevan S., Quallo T., y Andersson D. A. (2014). TRPV1. En: Nilius, B., & Flockerzi, V. (n.d.). *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels Vol. I*.
- Birnbaumer L, Yildirim E y Abramowitz J (2003). A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium* 33(5–6):419–432
- Björnström L. y Sjöberg M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes, 19(4), 833–842.
- Bologa C.G., Revankar C.M., Young S.M., Edwards B.S., Arterburn J.B., Kiselyov A.S., Parker M.A., Tkachenko S.E., Savchuck N.P., Sklar L.A., Oprea T.I., Prossnitz E.R. (2006). Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol*.2:207–212.
- Bondesson M., Hao R., Lin C.-Y., Williams C. y Gustafsson J.A. (2015). Estrogen receptor signalling during vertebrate development. *Biochimica et Biophysica acta* 1849, 142-151. Review.
- Brandes J.L. (2006). The influence of estrogen on migraine: a systematic review. *JAMA* 295(15), 1824–1830.
- Carmeci C., Thompson D.A., Ring H.Z., Francke U., Weigel R.J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*.45:607–617.
- Castany, S., Homs, J., Deulofeu, M., y Verdú, E. (2016). Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: *International Spinal Cord Society*. 54,330–340.
- Caterina M. J., Leffer A., Malmberg A. B., Martin W. J., Trafton J., Petersen-Zeit K. R., Koltzenburg M., . Basbaum A. I, Julius D. 2000. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science* VOL 288, 305-313.

- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., y Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, 389(October).
- Chaban V. (2013). Estrogen modulation of visceral nociceptors. *Curr Trends Neurol.* 7: 51–55.
- Cho T. y Chaban V., (2012). Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors- $\alpha$  and estrogen receptor- $\beta$  knock-out mice, *Neuroreport.* 23(9): 530–534.
- Chomczynski P and Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal. Biochem.* 162(10): 156–159.
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature review.* 426, 517–524.
- Coelingh Bennink HJ. (2004) Are all estrogens the same? *Maturitas.* 47(4):269-75
- Cosens, D.J. and A. Manning. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216): 285–287.
- Craft, R. M. (2007). Modulation of pain by estrogens. *Pain*, 132(SUPPL. 1), S3.
- Craig, A. D. B. (2003). Pain Mechanisms : Labeled Lines Versus Convergence in Central Processing, *Annu. Rev. Neurosc.* 26, 1–30.
- Cui J., Shen J. y Li R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends Mol Med.* 19(3): 197–209.
- Dechering K., Boersma C. y Mosselman S. (2000). Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ : Two Receptors of a Kind? *Current Medicinal Chemistry.* 7, 561-576.
- Dubin, A. E., y Patapoutian, A. (2010). Nociceptors : the sensors of the pain pathway. *The Journal of Clinical Investigation.* 120(11), 3760–3772.
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G et al (1997). Human Estrogen Receptor  $\beta$ -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4258-4265.
- Fillingim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B., & Riley, J. L. (2009). Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. *Journal of Pain*, 10(5), 447–485.



- Frot, M., Feine, J. S., & Bushnell, M. C. (2004). Sex differences in pain perception and anxiety. A psychophysical study with topical capsaicin. *Pain*, 108(3), 230–236.
- Gaudet R. (2007). Structural Insights into the Function of TRP Channels. En: Liedtke WB, Heller S,( eds). *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Cap 25.
- Gees, M., Colsoul, B., y Nilius, B. (2010). The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca<sup>2+</sup> Signaling, 1–31.
- Giatti S., Garcia-Segura L.M., Barreta G.E. y Melagi R.C. (2018). Neuroactive steroids, neurosteroidogenesis and sex. *Progress in Neurobiology* 1-17.
- Gosden J, Middleton P, Rout D (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* 43:218-20.
- Ho K W., Ward J.W. y Calkins D.J. (2012). TRPV1 a stress response protein in the central nervous system. *Review Am J Neurodegener.* 1(1):1-14.
- Kaneko, Y., y Szallasi, A. (2013). Transient receptor potential (TRP) channels : a clinical. *British Journal of pharmacology.* 171 2474–2507
- Kehlet, H., Ph, D., y Hon, F. A. C. S. (2005). Postoperative Pain. *ACS Surgery: Principles & Practice*, 1-15.
- Kelly, D. J., y Ahmad, M. (2001). Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities, *Canadian Journal of Anesthesia*, 1000–1010.
- Kobayashi, H., Yoshiyama, M., Zakoji, H., Takeda, M., & Araki, I. (2009). acid-sensing ion channels in the mouse urinary bladder symptoms, 1746–1751.
- MacGregor EA. (1996). “Menstrual” migraine:towards a definition. *Cephalalgia* 16(1), 11–21.
- Marino, M., Galluzzo, P., & Ascenzi, P. (2006). Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Current Genomics*, 7(8), 497–508.
- Martin V.T., Wernke S., Mandell K. et al. (2005).Defining the relationship between ovarian hormones and migraine headache. *Headache* 45(9), 1190–1201.
- Maurer, A. J., Lissounov, A., Knezevic, I., Candido, K. D., & Knezevic, N. N. (2016). Pain and sex hormones: a review of current understanding. *Pain Management*, 6(3), 285–296.

- McEntire, D. M., Kirkpatrick, D. R., Dueck, N. P., Kerfeld, M. J., Smith, T. A., Nelson, T. J... Agrawal, D. K. (2016). Pain transduction: a pharmacologic perspective. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(8), 1069–1080.
- Minke, B. (2010). The history of the drosophila TRP channel: The birth of a new channel superfamily. *Journal of Neurogenetics*, 24(4), 216–233.
- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M. & Sternberg, W. F. (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24,375–389.
- Morales-Lázaro, S. L., & Rosenbaum, T. (2014). A painful link between the TRPV1 channel and lysophosphatidic acid. *Life Sciences*, 125, 15–24.
- Morales-Lázaro, S. L., & Rosenbaum, T. (2017). Multiple Mechanisms of Regulation of Transient Receptor Potential Ion Channels by Cholesterol. *Current Topics in Membranes* (1st ed., Vol. 80). Elsevier Inc.
- Morales-Lázaro, S. L., Simon, S. A., y Rosenbaum, T. (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *The Journal of Physiology* 591(13), 3109–3121.
- Morani, A., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2008). Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *Journal of Internal Medicine*, 264(2), 128–142.
- Neri I, Granella F., Nappi R., Manzoni G.C., Facchinetti F., Genazzani A.R. (1993). Characteristics of headache at menopause: a clinicoepidemiologic study. *Maturitas* 17(1), 31–37.
- Nilius, B., y Flockerzi, V. (2014). *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels* Springer Heidelberg New York Dordrecht London, Vol. I.
- O'Dowd B.F., Nguyen T., Marchese A, Cheng R., Lynch K.R., Heng H.H., Kolakowski L.F., Jr, George S.R. (1998). Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*.47:310–313.
- Ortíz-Rentería M., Juárez-Contreras R., González-Ramírez R., Islas L.D, Sierra-Ramírez F., Llorente Simon S. A., Hiriart M. Rosenbaum T. y L. Morales-Lázaro S.L. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *PNAS* 115 (7) E1657-E1666.
- Osterweis M., Kleinman A y Mechanic D. (1987). *Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives*. Institute of Medicine (US) Committee on Pain,

Disability, and Chronic Illness Behavior. Washington (DC): National Academies Press (US).

Owsianik, G., Voets, T., y Nilius, B. (2006). Structure – function relationship of the TRP channel superfamily, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 61-89.

Payrits M., Ságghy É., Cseko K., Pohóczky K., Bölcskei K., Ernszt D., Barabás K., Szolcsányi J., Ábrahám I.M., Helyes Z., Szoke É. 2017.Estradiol sensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in pain responses. *Endocrinology*. 58(10), 3249-3258.

Pohóczky K., Kun J., Szalontai B.,Szöke E., Saghly E., Payrits M., Kajtár B., Kovács K., Környei J., Garai J., Garami A., Perkecz A., Czeglédi L., and Helyes z. 2016.Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium. *Journal of Molecular Endocrinology* 56(2), 135–149.

Prossnitz, E. R., & Maggiolini, M. (2010). Mechanisms of estrogen signaling via GPR30. *Mol Cell Endocrinol*.308(1-2): 32–38.

Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., & Sklar, L. A. (2008). GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen .265-266: 138–142

Racine, M., Tousignant-laflamme, Y., Kloda, L. A., Dion, D., Dupuis, G., & Choinière, M. (2012). A systematic literature review of 10 years of research on sex / gender and experimental pain perception – Part 1 : Are there really differences between women and men?, 153, 602–618.

Ramsey, I. S., Delling, M., y Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels, *Annu. Rev. Physiol.* 68:619–47.

Ripa P., Ornello R., Degan D. et al. (2015). Migraine in menopausal women: a systematic review.*Int. J. Womens Health* 7, 773–782.

Rosasco .G. y Gordon S.E., 2017. TRP Channels What Do They Look Like?. TRP Channels and Pain. En: Rosenbaum-Emir, T. (Edt). *Neurobiology of TRP Channels*. *Frontiers in Neuroscience*.1-9.

Salazar, H., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Garcia-Villegas, R., Munari, M., Gordon, S. E. (2008). A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nature Neuroscience*, 11(3), 255–261.

Santos C.F., Sakai V.T., Machado M.A.M., Schippers D.N., Greene A.S. (2004) Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *Appl Oral Sci* 12(1): 1-11.

- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Frovenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Y Klenk D. C.(1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150,76-85.
- Sotoca A.M., Vervoort J.,Rietjens I. y GustafssonJ.Å (2012). Human ER $\alpha$  and ER $\beta$  Splice Variants: Understanding Their Domain Structure in Relation to Their Biological Roles in Breast Cancer Cell Proliferation, *Biochemistry*, Prof. Deniz Ekinici (Ed.), ISBN: 978-953-51-0076-8.
- Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., y Eid, S. R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature reviews Drug discovery*.6, 357-372.
- Szallasi, A., y Blumberg, P. M. (1990). Resiniferatoxin and its analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Sciences*, 47(16), 1399–1408.
- Taleghany N., Sarajari S., DonCarlos L.L., Gollapudi L, Oblinger M.M. (1999).Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res*. 1999 57(5):603-15.
- Tamay de Dios L., Ibarra C., Velasquillo C.(2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad (Medigraphic)* 2(2):70-78
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G-protein in human breast cancer cells. (2005). *Endocrinology*. 146:624–632.
- Towbin, H. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4.
- Vay, L., Gu, C., & Mcnaughton, P. A. (2012). The thermo-TRP ion channel family : properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology* 165 787–801.
- Veldhuis N.A., Lew MJ, Abogadie F.C., Poole D.P., Jennings E.A., Ivanusic J.J., Eilers H., Bunnett N.W., McIntyre P. 2012. N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor. *J Biol Chem*. 2012 Jun 22;287(26):21765-72.
- Xu S., Cheng Y., Keast J.R., Osborne P.B. (2008). 17beta-estradiol activates estrogen receptor beta-signalling and inhibits transient receptor potential vanilloid receptor 1 activation by capsaicin in adult rat nociceptor neurons. *Endocrinology*. 149(11):5540-8.

- Yamagata, K., Sugimura, M., Yoshida, M., Sekine, S., Kawano, A., Oyamaguchi, A., ... Niwa, H. (2016). Estrogens exacerbate nociceptive pain via up-regulation of trpv1 and ano1 in trigeminal primary neurons of female rats. *Endocrinology*, 157(11), 4309–4317.
- Yu-Ching L., Chao-Wei C., Su-Yi W. y Fong-Sen W. 17 $\beta$ - estradiol mediates the sex difference in capsaicin induced nociception in rats. (2009). *Pharmacology*. 1104-1110.
- Zumbo P. S/A. phenol-chloroform extraction. Weill cornell medical college department of physiology & biophysics 1.
- Zununi-Vahed S., Barzegari A., Rahbar Saadat Y., Mohammadi S., Samadi N. Zununi. (2016). A microRNA isolation method from clinical samples, 6(1), 25-3.