



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN POR TEMPERATURA DEL CANAL IÓNICO
TRPV1 EN NEURONAS DEL GANGLIO DE LA RAÍZ DORSAL DE *MUS*
MUSCULUS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
BIÓL. ANA SÁNCHEZ MORENO

TUTOR PRINCIPAL
DR. LEÓN DAVID ISLAS SUÁREZ
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)
DRA. SARA LUZ MORALES LÁZARO
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Agosto, 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.

AGRADECIMIENTOS FORMALES

Agradezco enormemente a mi tutor, el Dr. León David Islas Suárez por la dirección, asesoría y corrección de esta tesis.

A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro por sus enseñanzas en la extracción de neuronas DRG, su colaboración al otorgar ratones knock-out y WT, sus consejos y su asesoría como miembro del comité tutor de esta tesis.

Al Dr. José Bargas Díaz por sus consejos y asesoría como miembro del comité tutor de esta tesis.

Al Dr. Arturo Hernández Cruz, el Dr. Fredy Roberto Cifuentes Navarro, el Dr. Salvador Leonardo Hernández López, el Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y la Dra. Myrian Velasco Torres por sus valiosas correcciones como miembros del jurado de examen de esta tesis.

A la Dra. Gisela Edith Rangel Yescas, técnico del laboratorio, por su colaboración y asesoría en el desarrollo de esta tesis.

A la laboratorista Elsa Evaristo Montes por su apoyo técnico en el manejo de ratones de laboratorio.

Al laboratorista Félix Sierra Ramírez por su apoyo técnico y asesoría en la extracción y cultivo de neuronas DRG, así como en los experimentos de estimulación por capsaicina.

A la Biól. Rebeca Juárez Contreras y el Biól. Miguel Ortiz Rentería por sus enseñanzas en la extracción y cultivo de neuronas DRG, así como el manejo de ratones de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS INFORMALES

Quisiera expresar mi más grande agradecimiento al Dr. León por todo lo que me ha enseñado, como profesor, como tutor, como científico y como una increíble persona.

A la Dra. Sara por sus consejos, correcciones y acompañamiento en el proyecto.

A la Dra. Gisela por su generosidad, amabilidad y paciencia como profesora en el laboratorio.

A Esteban, estudiante de doctorado del laboratorio, por sus enseñanzas, consejos y escucharme quejarme casi todo el tiempo.

A Miriam, Aymé, Teriws, Miguel, Ceci y Javier, compañeros del laboratorio por hacer tan divertido el tiempo que pasamos haciendo experimentos en el laboratorio.

A Rebeca y Miguel por ayudarme tan amablemente en todo lo que necesité.

Agradezco profundamente a mis padres, Ismael Sánchez Martínez y Anita Moreno Ruíz por estar siempre conmigo.

A mis hermanas y hermano, Adela, Dulce Berlen, Agustina, Valeria, Mari cruz, Jennifer e Ismael, por ser mis mejores amigas y amigo, y estar cuando más los he necesitado.

A mis amigas, Karina y Paola por ser tan nerds como yo. A Tomás, Iris Ashanty, Hilda, Anita, Gonza y Carlos por ser los mejores compañeros en mis clases.

Agradezco a todos los que hicieron posible esta tesis, con la que he madurado como estudiante y también como persona.

Y finalmente agradezco a *Fix you* de *Coldplay*, porque me daba ánimos cuando el proyecto se volvía demasiado duro, esta canción me recuerda esta tesis.



Esta tesis fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el proyecto IN203318 a nombre del Dr. León David Islas Suárez y la beca número 895334 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgada a su autora.

Lo valioso no es la condecoración sino el trabajo, cuando trabajas y te gusta el trabajo, encontrarás en él la recompensa.

Anna Karenina, León Tolstói, pp. 728.

ÍNDICE

Resumen.....	8
Introducción.....	9
I. Termosensación.....	9
II. Neuronas DRG.....	10
III. TermoTRPs.....	12
IV. TRPV1.....	15
V. Activación de TRPV1 por temperatura.....	17
VI. Inactivación de TRPV1 por temperatura.....	18
Justificación.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	24
Métodos.....	25
I. Extracción de Ganglios de la Raíz Dorsal.....	25
II. Cultivo de neuronas DRG.....	26
III. Soluciones.....	27
IV. Registro electrofisiológico mediante <i>patch-clamp</i> (fijación de voltaje en microáreas de membrana).....	28
V. Microcalentador.....	28
VI. Calibración de temperatura.....	29
VII. Estimulación por temperatura.....	30
VIII. Activación por capsaicina.....	32
IX. Análisis de datos.....	32
Resultados.....	33
I. Cultivo celular.....	33
II. Registro electrofisiológico de neuronas DRG.....	34
III. Registro de potenciales de acción con fijación de corriente o <i>current clamp</i>	35
IV. Registro de potenciales de acción por capsaicina en presencia de calcio extracelular.....	37
V. Registro de corriente activada por capsaicina.....	38
VI. Registro de potenciales de acción por capsaicina en ausencia de calcio extracelular.....	40

VII.	Activación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas de ratón WT CD1.....	42
VIII.	Activación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1-/-.....	48
IX.	Potenciales de acción por temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1-/-.....	52
X.	Ausencia de potenciales de acción por temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1-/- con calcio extracelular	58
XI.	Activación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas del ratón WT C57 BL6-J	59
XII.	Potenciales de acción por temperatura de neuronas DRG pequeñas del ratón WT C57 BL6-J.....	62
XIII.	Ausencia de potenciales de acción por temperatura de neuronas DRG pequeñas del ratón WT C57 BL6-J con calcio extracelular	68
	Discusión y conclusión.....	70
	Referencias.....	73

RESUMEN

La inactivación por temperatura del canal iónico TRPV1 se había identificado y caracterizado en células HEK 293 (un sistema de expresión heterólogo), se trata de un fenómeno en el que al repetir el estímulo de temperatura la corriente iónica disminuye con cada estímulo y se encontró además que es irreversible, puesto que no hay recuperación de la corriente. En esta tesis se estudia la inactivación por temperatura de TRPV1 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG), las células donde el canal se expresa de manera endógena, para conocer si este fenómeno también ocurre en las neuronas y si tiene un papel fisiológico en las mismas. Para ello, a través del registro electrofisiológico de corrientes mediante *patch-clamp*, se ha identificado a las neuronas DRG pequeñas que expresan TRPV1 al activarlas por capsaicina y con el uso de un dispositivo denominado microcalentador que eleva la temperatura del área cercana a la célula, se ha estimulado a las neuronas con rampas de temperatura consecutivas. Los resultados muestran que las neuronas DRG se inactivan por temperatura, la corriente disminuye con cada rampa, igual que en las células HEK 293. Esto se sustenta con la respuesta de las neuronas DRG del ratón TRPV1^{-/-}, cuya corriente activada por temperatura es muy pequeña, muy parecida a la corriente de fuga de las neuronas, es decir, la corriente activada por temperatura de las neuronas es mayoritariamente debida a TRPV1 y ésta se inactiva. Los experimentos se llevaron a cabo sin calcio extracelular, puesto que se comprobó la desensibilización rápida que el calcio ejerce en las neuronas al activar con capsaicina y cuando se producen potenciales de acción. También, se ha registrado el disparo de potenciales de acción por rampas de temperatura en neuronas DRG pequeñas del ratón WT y el ratón TRPV1^{-/-}, y se ha observado una disminución en el disparo de potenciales de acción en el segundo pulso de temperatura, lo cual puede estar relacionado con el freno que representa TRPV1 en la célula en el caso de las neuronas WT, y que podría estar relacionado con fenómenos de adaptación de la neurona sensorial.

INTRODUCCIÓN

Los sentidos nos permiten percibir los estímulos ambientales, con el fin de responder a los mismos e interactuar adecuadamente con el medio. Éstos forman parte del sistema nervioso periférico, el cual está compuesto de neuronas aferentes, neuronas que llevan información del exterior y del medio interno hacia el sistema nervioso central, donde se procesan los estímulos ambientales; y de neuronas eferentes que llevan información del sistema nervioso central hacia los órganos efectores (músculos, glándulas) (Purves et al., 2012).

Las neuronas aferentes, también conocidas como neuronas sensoriales, generalmente se encapsulan en receptores especializados en la piel (Purves et al., 2012) cuya membrana permite la transducción del estímulo táctil, sonoro, olfatorio, gustativo y visual, en una señal eléctrica conocida como potencial de receptor, y posteriormente un potencial de acción, que se propaga hasta el sistema nervioso central para el procesamiento de dichos estímulos sensoriales (Randall et al., 2001).

I. Termosensación

De manera específica, los estímulos de temperatura son percibidos mediante el sistema somatosensorial, un sistema complejo, puesto que a través de él se pueden percibir estímulos mecánicos (de vibración, presión y tacto fino), de propiocepción (de la posición y los movimientos corporales), estímulos térmicos, algunos estímulos químicos, estímulos de dolor y de tacto grueso (Purves et al., 2012). A diferencia de la mayoría de los receptores táctiles, los termorreceptores son terminaciones nerviosas libres que alcanzan la epidermis de la piel (Fig. 1).

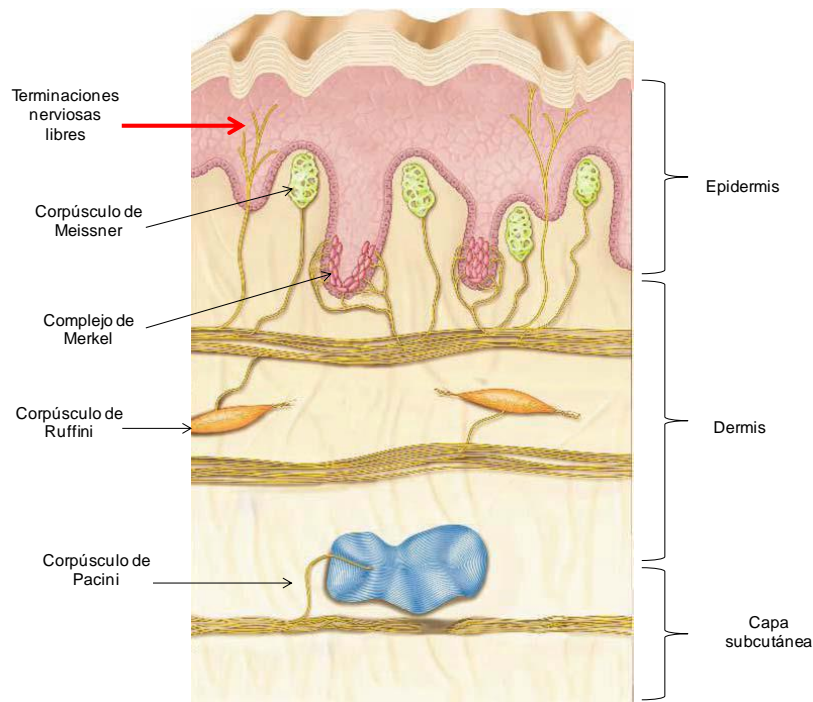


Fig. 1. Los receptores sensoriales de temperatura son terminaciones nerviosas libres. Se muestran los distintos receptores táctiles, así como las terminaciones nerviosas libres que detectan estímulos térmicos, los cuales se proyectan en las diversas capas de la piel. Tomado de Purves et al., 2012.

II. Neuronas DRG

Las terminaciones nerviosas libres de los termoreceptores son proyecciones de las neuronas aferentes primarias, cuyos cuerpos neuronales residen en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) cuando se detectan estímulos térmicos corporales, y en el ganglio trigeminal cuando se detectan en la cabeza.

Los ganglios de la raíz dorsal son cúmulos de cuerpos neuronales y células de soporte (Purves et al., 2012), que se encuentran en la columna vertebral, en la zona lateral de la médula espinal (Patapoutian et al., 2003). El ganglio trigeminal inerva la cabeza, por ende, la cara y la boca (Yarmolinsky et al., 2016).

Las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (neuronas DRG) pueden ser neuronas que detectan estímulos mecánicos, estímulos de propiocepción, de dolor y/o de temperatura (Patapoutian et al., 2003) (Fig. 2), puesto que su actividad origina las sensaciones del sistema somatosensorial (Purves et al., 2012).

Las neuronas DRG, según su tamaño y velocidad de conducción se dividen en fibras (como se denomina a las proyecciones de la neurona) de diámetro grande $A\beta$, de conducción rápida que responden a estímulos mecánicos inocuos, fibras de diámetro pequeño, no mielinizadas (conducción lenta) de tipo C, y fibras medianas,

ligeramente mielinizadas (conducción más rápida) de tipo A δ , de las cuales éstas dos últimas detectan dolor y temperatura.

Las neuronas aferentes primarias son neuronas pseudounipolares, es decir, tienen una proyección que va hacia la piel, las mucosas, los músculos o su órgano blanco (proyección periférica), y otra que se dirige al cuerno dorsal de la médula espinal (proyección central), a la que transmiten información sobre el estímulo detectado, pero ambas proyecciones producen proteínas similares, por lo que no se distingue dendrita y axón, de tal forma que se denominan pseudounipolares (Purves et al., 2012; Basbaum et al., 2009; Patapoutian et al., 2003, Vriens et al., 2014).

A su vez, en el cuerno dorsal de la médula espinal, se distinguen varios tipos de láminas con neuronas que se conectan a las distintas neuronas aferentes. Las neuronas A δ proyectan hacia la lámina I y V, las de tipo C hacia las láminas I y II, y las fibras A β hacia las láminas III, IV y V (Basbaum et al., 2009) (Fig. 2).

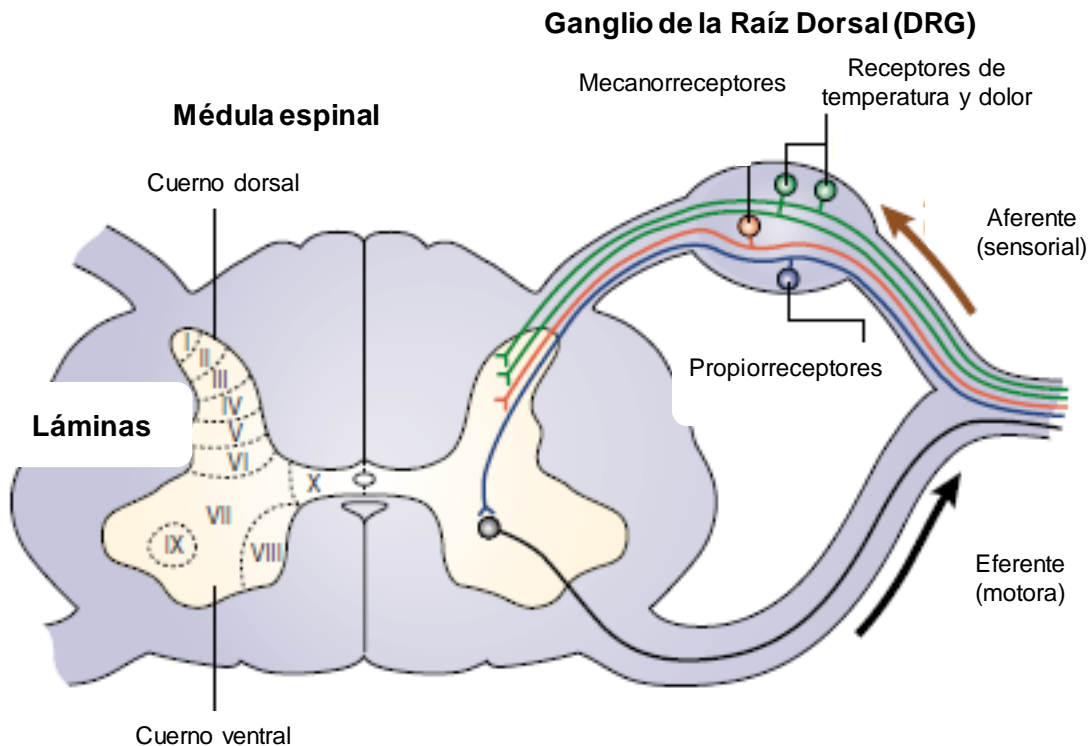


Fig. 2. Neuronas DRG. Se muestran los distintos tipos de neuronas DRG según los estímulos que detectan, y sus proyecciones. Tomado de Patapoutian et al., 2003.

Posteriormente, las neuronas del cuerno dorsal de la médula espinal se proyectan por el eje espinotalámico hacia el tálamo (en el caso del cuerpo) o el eje trigémino espinal y trigémino talámico (en el caso de la cara), pasan por el tallo cerebral, hasta

que alcanzan la corteza somatosensorial primaria donde los estímulos son procesados (Purves et al., 2012).

Las neuronas DRG que detectan temperatura llevan información de los estímulos térmicos en un rango nocivo, forman parte de los nociceptores (las neuronas que detectan dolor); o bien, detectan temperatura en un rango inocuo (Patapoutian et al., 2003). Ahora bien, algunos nociceptores son polimodales, responden a varios estímulos (por ejemplo, calor y estímulos mecánicos), y otros son unimodales, sólo detectan un estímulo (Patapoutian et al., 2003), además se han identificado poblaciones específicas de neuronas que detectan frío y otras que detectan calor y sólo algunas más que son bimodales (Yarmolinsky et al., 2016).

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

III. ThermoTRPs

Pero ¿cómo se transduce el estímulo térmico a una señal eléctrica en la membrana de las neuronas DRG? La respuesta aún es parte de una intensa investigación, pero con el estudio de los canales iónicos thermoTRPs, se ha avanzado en su conocimiento.

En el caso de la visión, el olfato y el gusto, la transducción del estímulo sensorial esta mediada principalmente por receptores acoplados a proteínas G, que modulan canales iónicos y entonces se pueden generar potenciales de acción, las señales eléctricas con las que se comunican las neuronas; los canales thermoTRPs, a diferencia de los receptores acoplados a proteínas G, son canales iónicos activados directamente por un estímulo físico, la temperatura (Dhaka et al., 2006).

El primer thermoTRP identificado y caracterizado fue TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1* o Potencial Transitorio del Receptor Vaniloide 1) (Caterina et al., 1997), luego se añadieron más canales a dicho subgrupo, hasta el momento se han identificado 11 miembros, los cuales se distribuyen en las subfamilias TRPV, TRPM, TRPA y TRPC, éstos abarcan casi todas las temperaturas relevantes en mamíferos (Fig. 3) y se expresan en neuronas del sistema nervioso periférico, por lo que son fundamentales en la termosensación de mamíferos (Patapoutian et al., 2003; Baez et al., 2014).

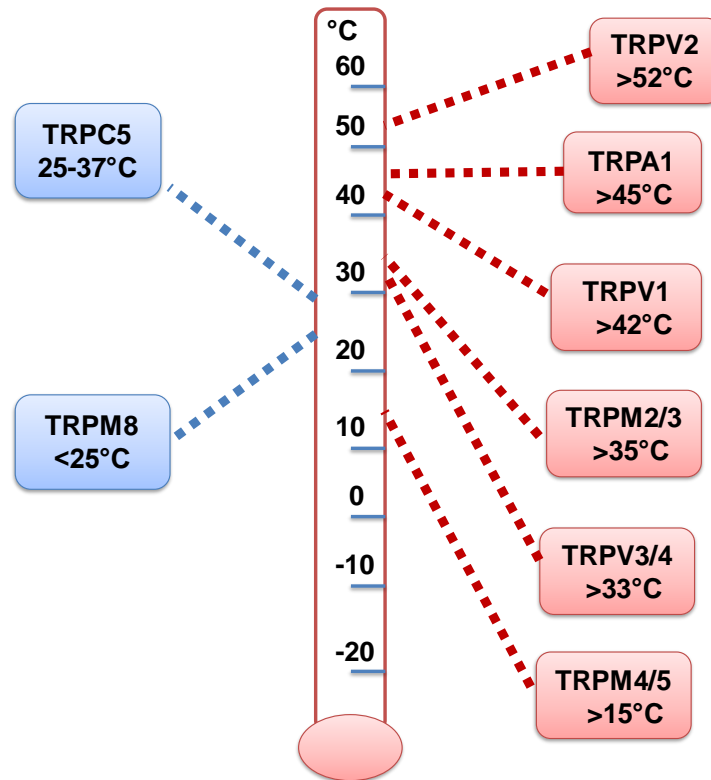


Fig. 3. TermoTRPs. Se muestran los canales iónicos TRP activados por temperatura según sus rangos de activación en *Mus musculus*.

Los canales termoTRPs detectan los cambios ambientales de temperatura en diferentes rangos y se activan, permitiendo el paso de cationes que despolarizan la célula, es decir, forman parte del proceso de transducción del estímulo térmico a la señal eléctrica, junto con otros canales sensibles a temperatura, los cuales no son de tipo termoTRP que también se han detectado; luego, la célula puede disparar potenciales de acción que alcanzan la médula espinal y finalmente el cerebro, donde se traducen en respuestas fisiológicas y de comportamiento al estímulo térmico (Fig. 4) (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014).

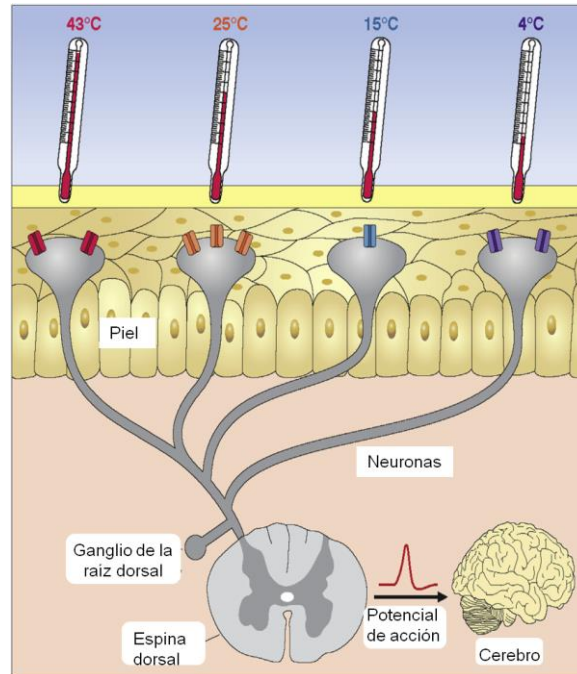


Fig. 4. Canales iónicos sensibles a temperatura en neuronas DRG. (Tomado de Cohen & Moiseenkova-Bell, 2014).

En ese sentido, presumiblemente mediante la transducción del estímulo térmico por los canales sensibles a temperatura como los canales termoTRPs, en la terminal de la neurona aferente ubicada en la piel se produce el potencial de receptor, el cual activa canales iónicos dependientes de voltaje, principalmente de sodio (Nav 1.1, 1.6, 1.7, 1.8 y 1.9) y de potasio (Kv), a partir de los cuales se generan los potenciales de acción, que permiten la señalización con las neuronas del cuerno dorsal de la médula espinal.

De esta forma, aquí es importante resaltar que una neurona DRG expresa varios canales iónicos en su membrana, algunos de los cuales le permiten diferenciarse de otras células, pues le confieren sensibilidad al frío (TRPM8), sensibilidad tanto al calor nocivo (TRPV1 y TRPV2) como inocuo (TRPV3 y TRPV4), sensibilidad a estímulos mecánicos (ASIC1, 2 y 3) (Fig. 5). Esto es, existe una separación funcional de nociceptores molecularmente distintos (Basbaum et al., 2009).

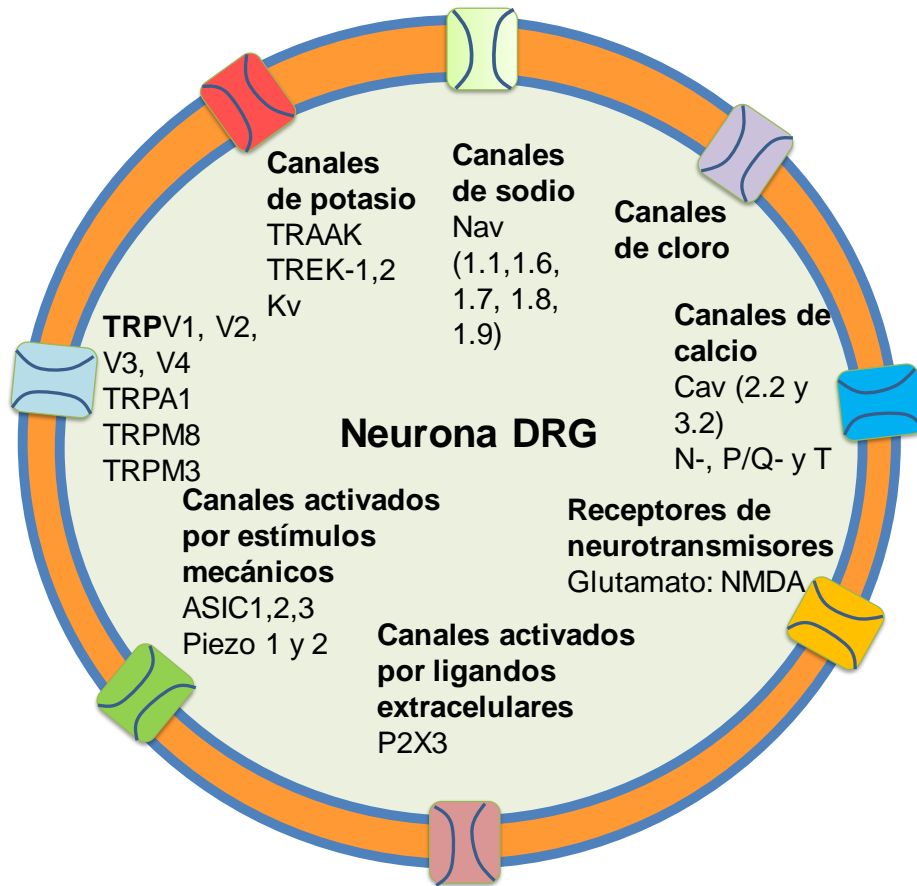


Fig. 5. Algunos de los canales iónicos que se expresan en las neuronas DRG. Tomado de Basbaum, 2009; Patapoutian, et al., 2003; Dhaka et al., 2006; Volkens et al., 2015; Vriens et al, 2011.

IV. TRPV1

Ahora bien, de los termoTRPs existentes, en esta tesis nos enfocaremos en TRPV1. TRPV1, así como los demás termoTRPs, es un canal iónico perteneciente a la superfamilia de canales TRP. Estructuralmente forma tetrámeros, cada una de las cuatro subunidades tiene seis dominios transmembranales que son α -hélices; los segmentos S5 y S6, así como el asa entre los mismos forman el poro, el cual es como un cono invertido, puesto que la parte externa es más amplia que la región del fondo (Fig. 6a) (Liao et al., 2013).

Con respecto a la región amino terminal, presenta un dominio de repeticiones de anquirina, el cual está compuesto de 263 aminoácidos distribuidos en 6 motivos o repeticiones de anquirina (Lishko et al., 2007). Y la región carboxilo terminal tiene un dominio TRP de aproximadamente 23-25 aminoácidos en forma de α -hélice (Fig. 6b) (Liao et al., 2013).

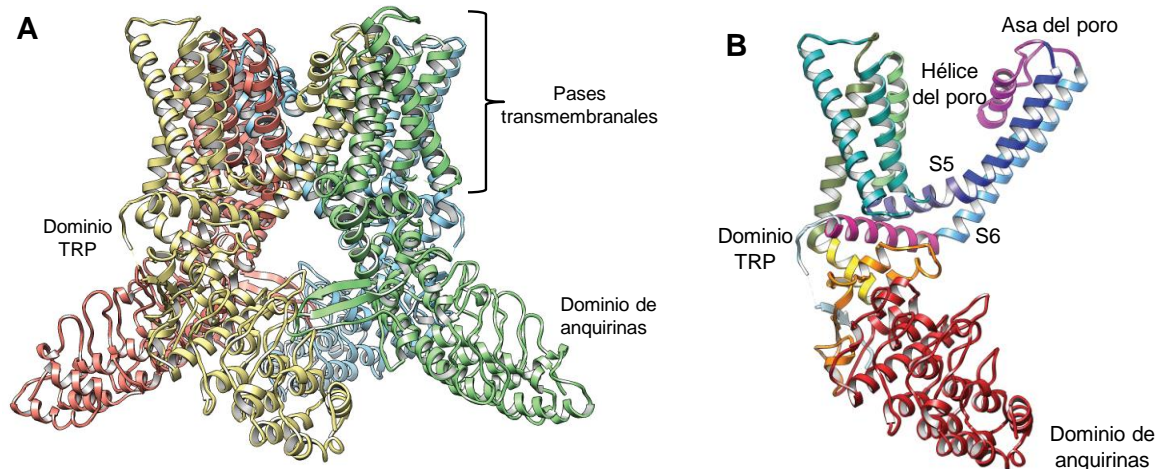


Fig. 6. Diagramas en forma de cinta de la estructura de TRPV1 obtenidos mediante criomicroscopía electrónica. En el panel A se observa al canal en forma de tetrámero, cada una de las 4 subunidades está representada con colores diferentes. En el panel B se observa una subunidad de TRPV1, se muestra el dominio de anquirinas en rojo, los seis pases transmembranales, con énfasis en los segmentos S5 y S6 que forman el poro y al final el dominio TRP en color rosa. Tomado de Liao et al., 2013.

Funcionalmente, TRPV1 es un canal catiónico no selectivo, principalmente permeable a calcio (Calixto et al., 2005). Surge como el receptor de capsaicina, el compuesto activo de los chiles del género *Capsicum* que les brinda su carácter picante. La capsaicina es un compuesto lipofílico de tipo vaniloide puesto que comparte el anillo vaniloide con la vainilla, de ahí el nombre de la subfamilia TRPV o vaniloide (Calixto et al., 2005).

No obstante, es un canal iónico polimodal, es decir, se activa por varios estímulos de naturaleza química y física, tales como pH ácido extracelular, voltajes despolarizantes positivos superiores a +60 mV (Winter et al., 2013), otros ligandos como la resiniferatoxina, ligandos endógenos como la anandamida, y por supuesto, se activa por temperatura (Calixto et al., 2005).

TRPV1 está involucrado en la modulación de procesos nociceptivos que originan dolor (Calixto et al., 2005; Rosenbaum y Simon, 2007) pues se expresa en neuronas sensoriales de tipo C y A δ , cuyas terminaciones son denominadas nociceptores, neuronas aferentes sensibles a estímulos nocivos de tipo mecánico, térmico o químico (Calixto et al., 2005).

En ese sentido, se ha demostrado que TRPV1 es un componente clave del mecanismo a través del cual la inflamación modula la sensibilidad térmica, en la que el canal funciona como un integrador polimodal sobre el cual actúan varios elementos que participan en la inflamación, algunos son moduladores alostéricos

directos positivos del canal (protones extracelulares y lípidos) y otros se unen a varios receptores en la membrana de los nociceptores y modulan a TRPV1 a través de la activación de cadenas de señalización. Así, se puede desarrollar hipersensibilidad al calor después de la inflamación o después de inyectar componentes específicos de la inflamación como la bradicinina o el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Basbaum et al., 2009).

El resultado de la modulación de la sensibilidad térmica es el descenso del umbral de activación por temperatura (alodinia, cuando un estímulo inocuo es percibido como doloroso), o el aumento en la magnitud de la respuesta a temperaturas superiores al umbral de activación (hiperalgesia, cuando un estímulo doloroso se percibe con dolor de mayor intensidad). En biofísica, se traduce en un corrimiento de la curva de activación por temperatura hacia temperaturas menores (Basbaum et al., 2009).

V. Activación de TRPV1 por temperatura

De manera general, las proteínas tienen cierta dependencia de la temperatura, no obstante, el *gating* (la apertura y cierre del canal) de TRPV1 se modifica en función de la temperatura (Jara-Oseguera e Islas, 2013), esto es, detectan la temperatura y responden con la apertura del poro.

Se sabe de esta alta sensibilidad a la temperatura que presentan TRPV1 y los demás termoTRPs, pero su mecanismo de activación por temperatura aún no ha sido dilucidado. Así que se ha buscado un posible dominio sensor de temperatura. Se han encontrado varias regiones que afectan la activación de TRPV1 por temperatura como son: varios aminoácidos del poro, en una región del poro denominada torreta, en la región C terminal y en el dominio próximo a la membrana, una región de 80 aminoácidos que abarca las dos últimas repeticiones de anquirina y la región que las conecta con el pase transmembranal 1 (Fig. 7) (Cohen y Moiseenkova-Bell, 2014).

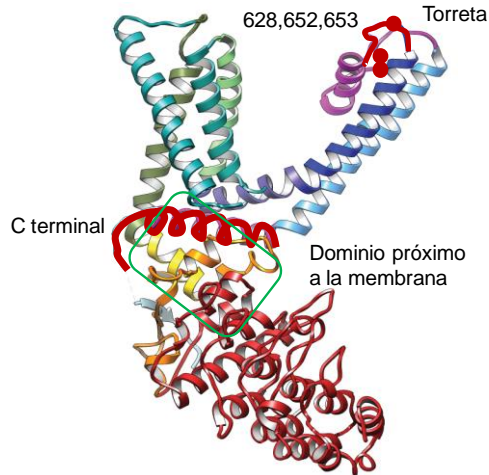


Fig. 7. Dominios sensores de temperatura putativos de TRPV1. Se muestran los diferentes dominios donde se ha ubicado el sensor de temperatura putativo de TRPV1, dibujados sobre el diagrama de cinta de una subunidad del canal (Liao et al., 2013).

Con respecto al dominio próximo a la membrana, cuando esta región se cambia por la de otro canal disminuye la entalpía y entropía de activación de TRPV1, por lo que es de mayor relevancia, puesto que, según los análisis termodinámicos, el proceso cerrado a abierto de TRPV1, involucra valores altos en el cambio de entalpía y entropía, lo cual está relacionado con la alta sensibilidad a la temperatura que presenta, ambos parámetros se compensan y la energía libre de Gibbs se vuelve pequeña, entonces el proceso es espontáneo y reversible (Baez et al., 2014).

Sin embargo, también se ha postulado que en realidad no existe un dominio sensor de temperatura, sino que existen microdominios en toda la estructura del canal que participan en el proceso de activación (Chowdhury, Jarecki & Chanda, 2014), por ello los dominios sensores de temperatura putativos se encuentran en varias regiones del canal.

VI. Inactivación de TRPV1 por temperatura

Ahora bien, con respecto a la estimulación repetida de TRPV1 con pulsos de temperatura consecutivos, se había observado cierta inactivación en sistemas de expresión heterólogos (Tominaga et al., 1998; Caterina et al., 1999), así como en neuronas DRG pequeñas cuyo umbral de activación era de 42°C (Vyklícký et al., 1999; Schwarz et al., 2000). Destaca el estudio de Schwarz et al. en el 2000, el cual demuestra inactivación al mantener el pulso de temperatura por 4 s y al repetir el pulso de temperatura con intervalos de 30 s (Fig. 8).

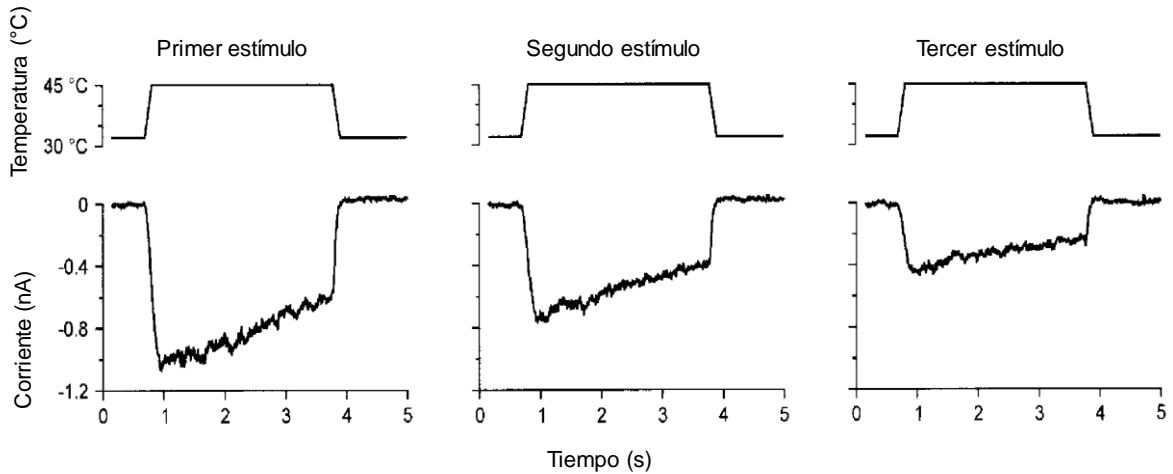


Fig. 8. Inactivación por temperatura en una célula DRG pequeña. Se registraron corrientes de una neurona DRG pequeña mediante *patch-clamp* en configuración *whole-cell*, la cual fue estimulada con rampas de temperatura de 43-47°C con un intercambiador de solución caliente, y el intervalo entre estímulos fue de 30 s. Se observa inactivación de la corriente en un estímulo que dura 4 s, y al repetir dicho estímulo tres veces. Tomado de Schwarz et al., 2000.

Sin embargo, aunque se había observado este fenómeno de inactivación por temperatura en TRPV1, no se había caracterizado como un fenómeno propio del canal. Mi tesis de licenciatura consistió en la caracterización de la inactivación de TRPV1 por temperatura, a través de la expresión heteróloga del canal en células HEK 293 (células embrionarias de riñón humano) (Fig. 9).

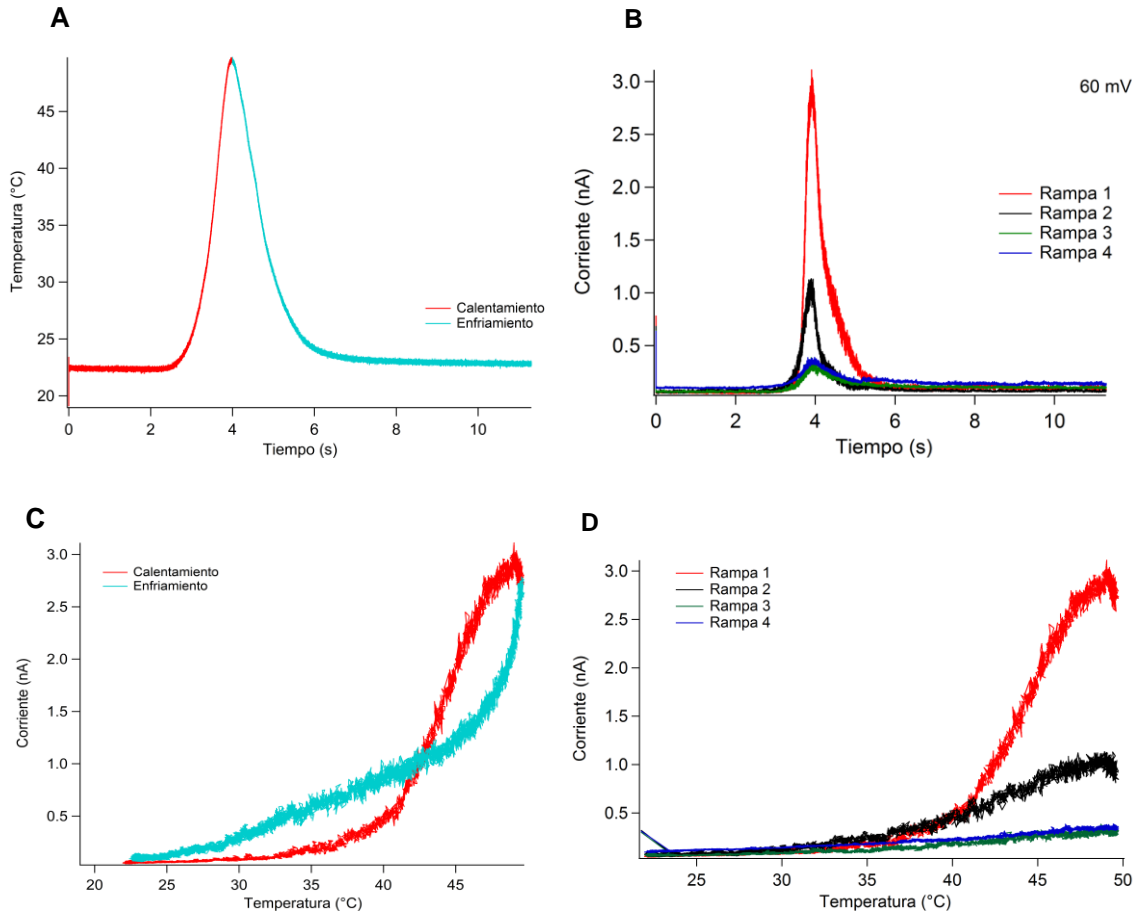


Fig. 9. Caracterización de la inactivación por temperatura de TRPV1 en células HEK 293. A. Se muestra el pulso de temperatura en una pipeta abierta como calibración de la temperatura que alcanza la rampa. B. Se observa la corriente iónica en cada punto de tiempo al aplicar el pulso de temperatura del panel A, manteniendo el potencial a 60 mV, cada una de las rampas de temperatura fue aplicada con 30 s de diferencia. C. Se muestra el gráfico corriente vs. temperatura al relacionar los gráficos de los paneles A y B, la rampa completa es cortada hasta la corriente que corresponde a la temperatura máxima y se obtiene la subida y bajada, que corresponden a las fases de calentamiento y enfriamiento de la rampa de temperatura. D. Se muestran sólo las rampas de calentamiento de las curvas corriente vs. temperatura. Parche de célula HEK 293 en configuración *inside-out* a 60 mV.

Se concluyó que se trata de un fenómeno que no depende del tiempo entre los estímulos térmicos, pero es muy sensible a la magnitud del pulso de temperatura (Fig. 10).

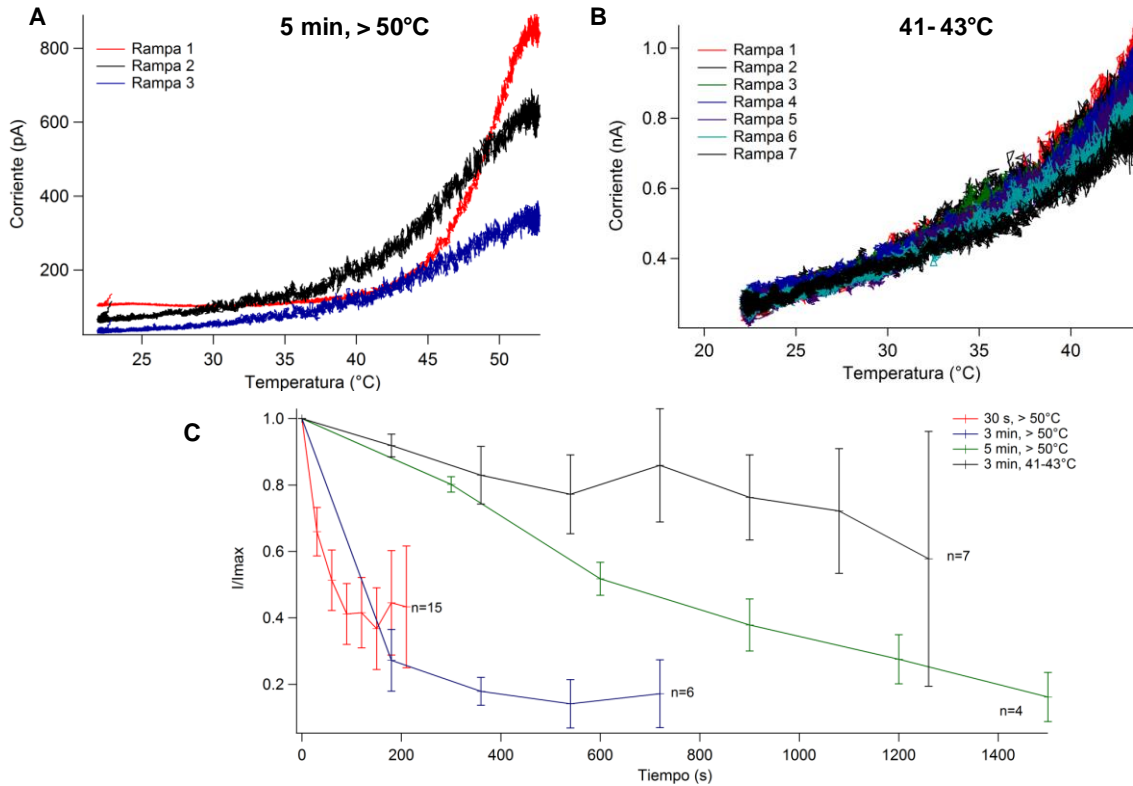


Fig. 10. La inactivación por temperatura de TRPV1 no depende del tiempo entre los estímulos, pero sí de la magnitud del pulso de temperatura. A. Se muestra un parche representativo de varias rampas de temperatura espaciadas a 5 minutos. B. Se muestran varias rampas de temperatura con un pulso de temperatura de 41-43°C. C. Promedio de los experimentos con rampas espaciadas a diferentes tiempos y con un pulso de temperatura menor. I/I_{max} representa el cociente de cada una de las rampas aplicadas al parche entre la corriente máxima de la primera rampa.

La conclusión más interesante de este trabajo es que se trata de un fenómeno irreversible, puesto que, al esperar hasta 20 minutos, la corriente no se recupera, e incluso, al estimular con capsaicina después de inactivar por temperatura, no se observa corriente, y al enfriar el baño de registro hasta aproximadamente 10°C tampoco se recupera la corriente (Fig. 11).

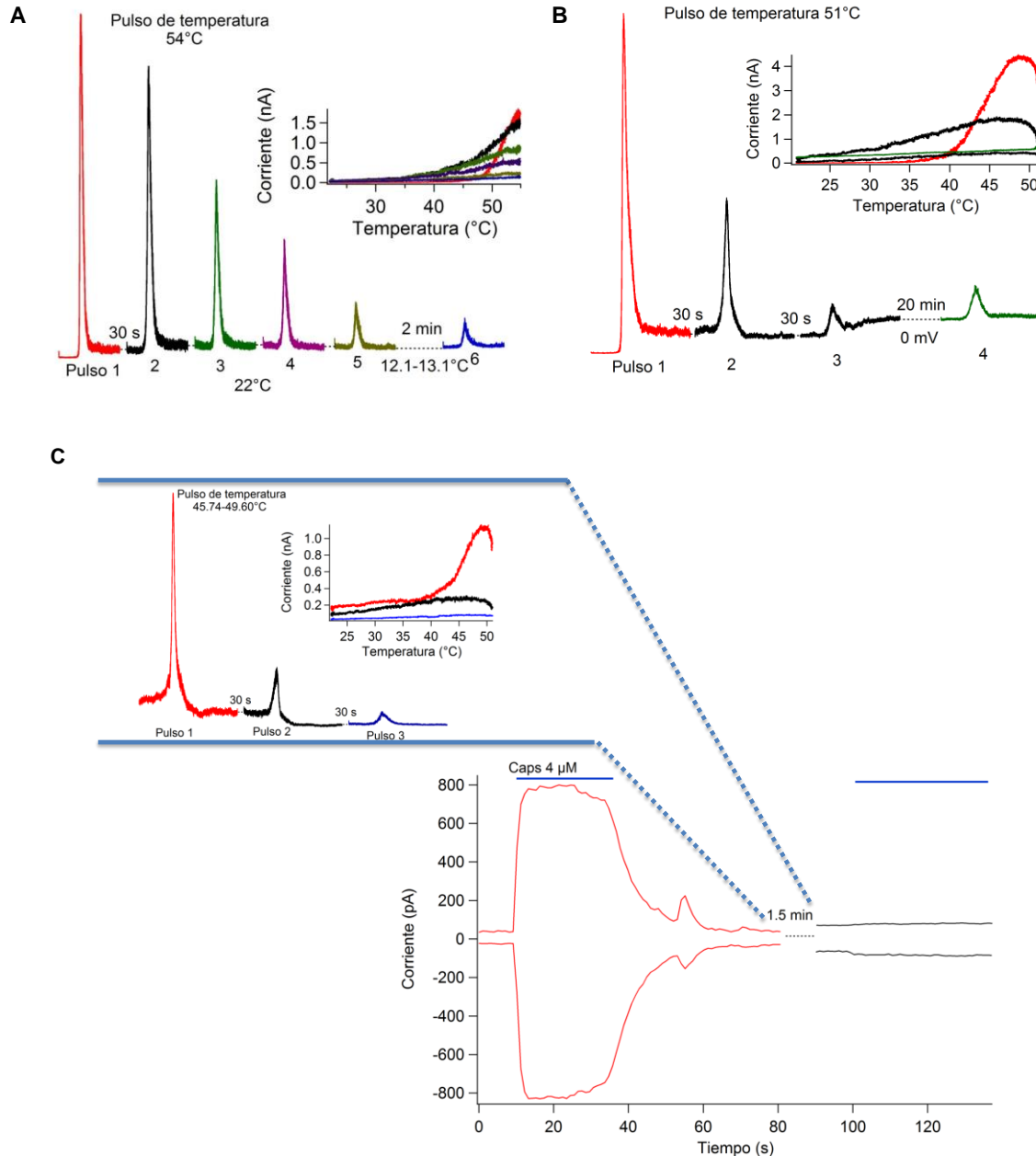


Fig. 11. La inactivación por temperatura de TRPV1 es un fenómeno irreversible. A. Parche representativo al aplicar varias rampas de temperatura, inactivar y después enfriar el baño de registro para observar recuperación de la corriente, se muestran también las curvas corriente vs. temperatura de las rampas. B. Parche representativo de varias rampas, se observa inactivación, luego se espera por 20 minutos y se prueba recuperación de la corriente. C. Se estimula con capsaicina, luego se inactiva por temperatura con tres rampas, y se vuelve a activar con capsaicina después de inactivar.

Entonces, la inactivación de TRPV1 por temperatura fue caracterizada en células HEK 293, ahora se pretende comprobar si dicho fenómeno también ocurre en las

neuronas DRG, donde TRPV1 se expresa de manera endógena, y si la inactivación tiene alguna relevancia fisiológica en éstas.

JUSTIFICACIÓN

Se pretende estudiar el fenómeno de inactivación por temperatura del canal iónico TRPV1 en neuronas del ganglio de la raíz dorsal para conocer si la inactivación dependiente de temperatura tiene un papel fisiológico en la neurona (en la modulación del disparo de potenciales de acción, por ejemplo). La caracterización de dicho fenómeno en las neuronas podría dar idea de cómo se regula el canal TRPV1 en la célula, probablemente con cambios en el tráfico de proteínas, puesto que, si el canal se inactiva y es un fenómeno irreversible, puede ser que el canal sea removido de la membrana y sea enviado a otra región de la célula.

HIPÓTESIS

El canal iónico TRPV1 expresado de manera endógena en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de *Mus musculus* se inactiva por temperatura, esta inactivación podría modular el disparo de potenciales de acción y tener un papel fisiológico en la neurona.

OBJETIVOS

General

Estudiar la inactivación por temperatura del canal iónico TRPV1 en neuronas del Ganglio de la Raíz Dorsal de *Mus musculus*.

Particulares

- Conocer si existe inactivación por temperatura de TRPV1 en neuronas DRG.
- Verificar si la inactivación modula el disparo de potenciales de acción.

MÉTODOS

Los ratones WT CD1 fueron obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina, de acuerdo con la aprobación del proyecto por la Comisión de Investigación y de Ética y fueron manejados según los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

Los ratones WT y TRPV1-/- C57 BL6-J fueron obtenidos del Instituto de Fisiología Celular y manejados según los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL TRE17–14) de dicho Instituto.

En la primera fase de la tesis o fase de estandarización se utilizaron ratones de la cepa CD1 (ratón de pelaje blanco) y posteriormente, en la fase de resultados propiamente dicha, se emplearon ratones de la cepa C57 BL6-J (ratón de pelaje negro), puesto que el ratón knock-out de TRPV1 (TRPV1-/-) se encuentra en esta cepa.

I. Extracción de Ganglios de la Raíz Dorsal

Ratón macho, cepa CD1 o C57 BL6-J (ambos se trataron de la misma forma), de 8 semanas de edad.

Decapitación del ratón. Con guantes, se toma al ratón por la parte dorsal hasta el cuello, se jala la piel, se corta la cabeza mediante tijeras de punta curva en un solo corte, y se drena la sangre en una bolsa de papel estraza con sanitas.

Inmediatamente, se baña el cuerpo del ratón con alcohol etílico al 70%, se toma con una sanita y se lleva al área de extracción de ganglios. El área de extracción de ganglios es estéril (hay un mechero), las pinzas y tijeras de disección están en un vaso de precipitados con alcohol al 70%, hay alcohol al 70% extra, sanitas y se usa un microscopio estereoscópico.

Se coloca el cuerpo del ratón en posición dorsal con la región caudal más distante sobre una base de unicel cubierta de aluminio, se dispone al ratón en posición de sacrificio usando agujas de jeringa para sujetar cada extremidad, cuidando que la columna vertebral quede muy recta y extendida con las 4 extremidades lo más alejadas posible.

Se baña nuevamente el cuerpo del ratón con alcohol al 70%, se toma con unas pinzas su piel y pelo, y se comienza a cortar con unas tijeras, hasta exponer toda la columna vertebral.

Luego, se colocan sanitas cubiertas de alcohol al 70% a ambos lados de la columna vertebral para evitar contaminación por el pelo del ratón. Se corta el tejido que cubre la columna vertebral, dejando los desechos sobre una sanita.

Después, se ubica el orificio de la columna vertebral, se introducen las tijeras y se corta la región superior de todas las vértebras hasta exponer la médula espinal, se extrae la médula espinal. A continuación, se corta el tejido lateral de la columna vertebral para visualizar adecuadamente los ganglios, de forma precisa pues se puede cortar a los ganglios (Fig. 12A).

Con el microscopio estereoscópico se visualizan los ganglios (Fig. 12B) y se extraen con unas pinzas muy finas, para ello, se introducen las pinzas hasta el orificio donde se encuentran los ganglios y se jalan, cortando los axones que acompañan a las neuronas mediante unas tijeras (Fig. 12C).

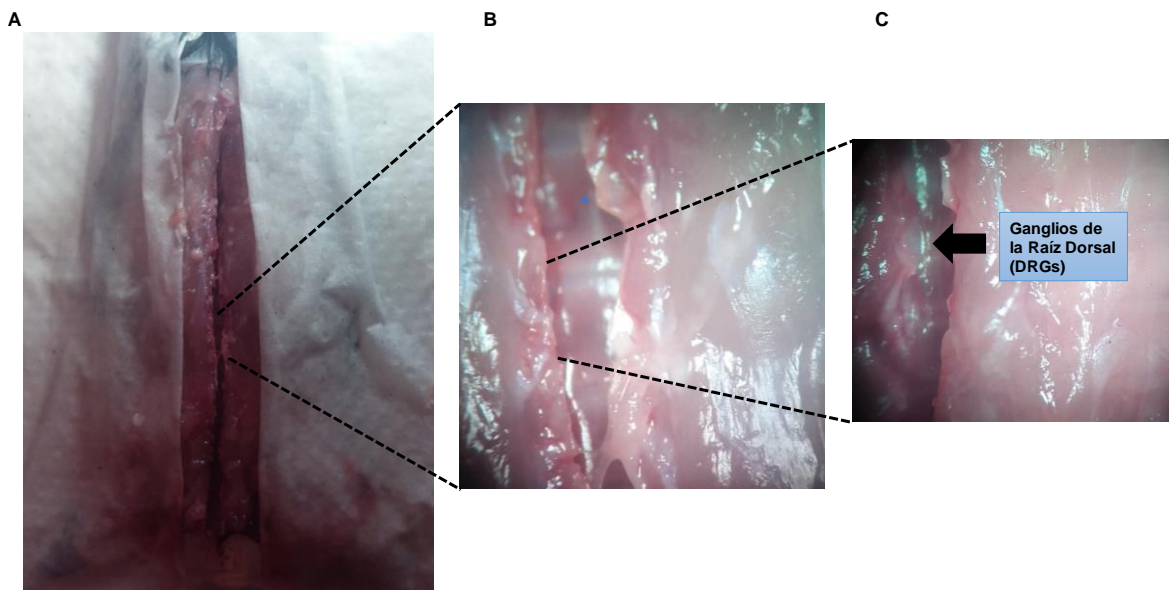


Fig. 12. Extracción de Ganglios de la Raíz dorsal (DRGs). A. Se muestra a simple vista el ratón previamente decapitado en posición de sacrificio con la columna vertebral expuesta. B. Es un acercamiento con el microscopio estereoscópico de una región de la columna vertebral donde se observan cada una de las vértebras. C. Es un acercamiento con el microscopio estereoscópico de la región donde se encuentran los ganglios, esto es, en las zonas laterales de la columna vertebral hacia el fondo en el orificio de cada vértebra.

II. Cultivo de neuronas DRG

Se colocan dos tubos Falcon de 15 mL, uno con 6-7 mL de medio DMEM (penicilina-estreptomicina al 1% y pH de 7) sin suero fetal de bovino, y otro tubo con 10 mL de medio DMEM con suero fetal de bovino al 10% (completo) a temperatura ambiente.

Se colectan los ganglios de todas las vértebras (60 en total) en una caja Petri de 35 mm x 10 mm con 2 mL de medio DMEM sin suero fetal de bovino a temperatura ambiente.

Al terminar de colectar los ganglios, se pasan a un tubo Falcon de 15 mL con 2.5 mg de tripsina (tipo IX-S), 8 mg de colagenasa (tipo II) y 2 mL de DMEM sin suero fetal de bovino y luego se introducen a la incubadora a 37°C por 20 minutos.

Se centrifugan a 1200 rpm por 5 minutos a 22°C. Se observa la pastilla formada y se retira completamente el sobrenadante con micropipeta en una campana de flujo laminar.

Se colocan 2 mL de DMEM con suero fetal de bovino, se dan pequeños golpecitos y se vuelven a centrifugar a 1200 rpm por 5 min. Se retira todo el sobrenadante, nuevamente se agregan 2 mL de medio DMEM completo y se vuelve a centrifugar con las mismas condiciones.

Se retira todo el sobrenadante y se agregan aproximadamente 100 µL de medio DMEM con suero fetal de bovino a temperatura ambiente según la cantidad de ganglios. Con una pipeta Pasteur pulida, siliconizada con Sigmacote y esterilizada, se baja y sube todo el volumen de ganglios varias veces hasta disgregarlos.

Se siembran las células disgregadas sobre vidrios tipo cubreobjetos de aproximadamente 5mmx5mm con poly D lisina (10 µg/ml) montados sobre cajas de 35 mm x 10 mm, y se incuban a 37°C por 1 hora, máximo 2 hrs. Se revisan cada cierto tiempo por si se secan. Al final, se agregan 2 ml de medio DMEM con suero fetal de bovino adicionado con 10 µL de NGF (100 ng/mL concentración final) y se mantienen en dichas condiciones. Se usan para registro electrofisiológico máximo 24 horas después.

III. Soluciones

Baño de registro o solución extracelular con calcio

Contiene 140 mM de NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ y 10 mM de HEPES. Ajustada a pH 7.2 con NaOH.

Baño de registro o solución extracelular sin calcio

Contiene 140 mM de NaCl, 3 mM KCl y 10 mM de HEPES. Ajustada a pH 7.2 con NaOH.

Solución de la pipeta o solución intracelular

Contiene 140 mM de KCl, 0.5 mM EGTA, 5 mM HEPES, 3 mM Mg-ATP y 3 mM de Glucosa. Ajustada a pH 7.2 con KOH.

IV. Registro electrofisiológico mediante *patch-clamp* (fijación de voltaje en microáreas de membrana)

Las pipetas de borosilicato fueron jaladas mediante un estirador (P-97 Sutter Instrument) con un filamento en forma de caja. Posteriormente, fueron pulidas con calor en una microforja (MF-830), y su resistencia final fue aproximadamente de 1-3 MΩ al introducirlas al baño de registro.

Las pipetas fueron llenadas con la solución intracelular, y se empleó un micromanipulador (Sutter Instrument) para controlar los movimientos de la pipeta.

Luego, se usaron las configuraciones de *cell-attached* y *whole-cell* para el registro electrofisiológico, con ésta última se registra toda la célula (Fig. 13). Es importante mencionar, que al realizar el sello en configuración *whole-cell* la pipeta es levantada y se coloca frente al microcalentador, es decir, la célula no está adherida al vidrio.

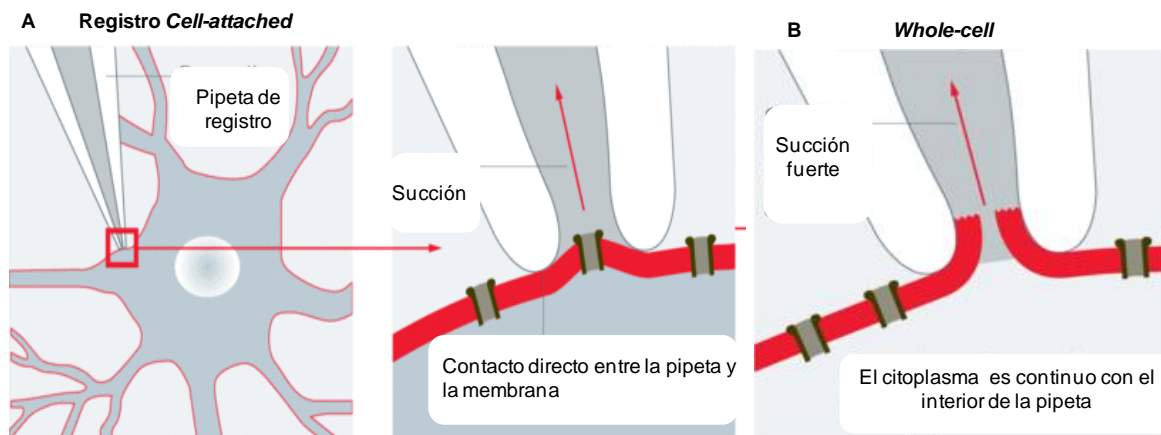


Fig. 13. Configuraciones de *patch-clamp*. A) Se observa la pipeta en contacto con la membrana de la célula, forma un gigasello al aplicar succión en la misma, el cual aún está unido a la célula (*cell-attached*). B) A partir de la configuración *cell-attached*, se aplica succión nuevamente, y al romper el pedazo de membrana que formaba el gigasello, ahora se tiene acceso al citoplasma de la célula completa (*whole-cell*). Modificado de Veitinger, 2011.

V. Microcalentador

El principio de funcionamiento de este aparato es el calor producido al administrar una corriente eléctrica por un cable conductor (calentamiento resistivo) (Islas et al., 2015). Consiste en un cable de cobre despojado del barniz que lo cubre haciendo pasar por él una corriente suministrada por una fuente de poder (Matrix model: MPS-

3010L-1). Este alambre es colocado dentro de un capilar de borosilicato (el mismo que se usa para hacer pipetas de registro) y es jalado con el estirador (Sutter Instrument) hasta que el cable queda adherido al capilar. Después, es doblado en el centro con calor aplicado mediante un soplete, de tal manera que se le da forma de horquilla (Fig. 14).



Fig. 14. Microcalentador en forma de horquilla.

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

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

VI. Calibración de temperatura

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

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

Entonces, con el amplificador (Axopatch 200B, Axon Instruments) en el programa PatchMaster (HEKA Elektronik) el canal uno registró la corriente y el dos la temperatura, se empleó un protocolo con tres pulsos cuadrados de 10 mV

separados por uno de 0 mV y se obtuvieron las dos curvas: corriente y temperatura. Mediante la ley de Ohm se obtuvo el cambio en la resistencia a partir de la corriente y el voltaje ($V=RI$ luego entonces $R=V/I$) y se relacionó con el cambio en la temperatura. Además, se realizó un ajuste a un polinomio de tres términos con ambos ejes, y se obtuvo una ecuación que relaciona la resistencia con la temperatura (Fig.15).

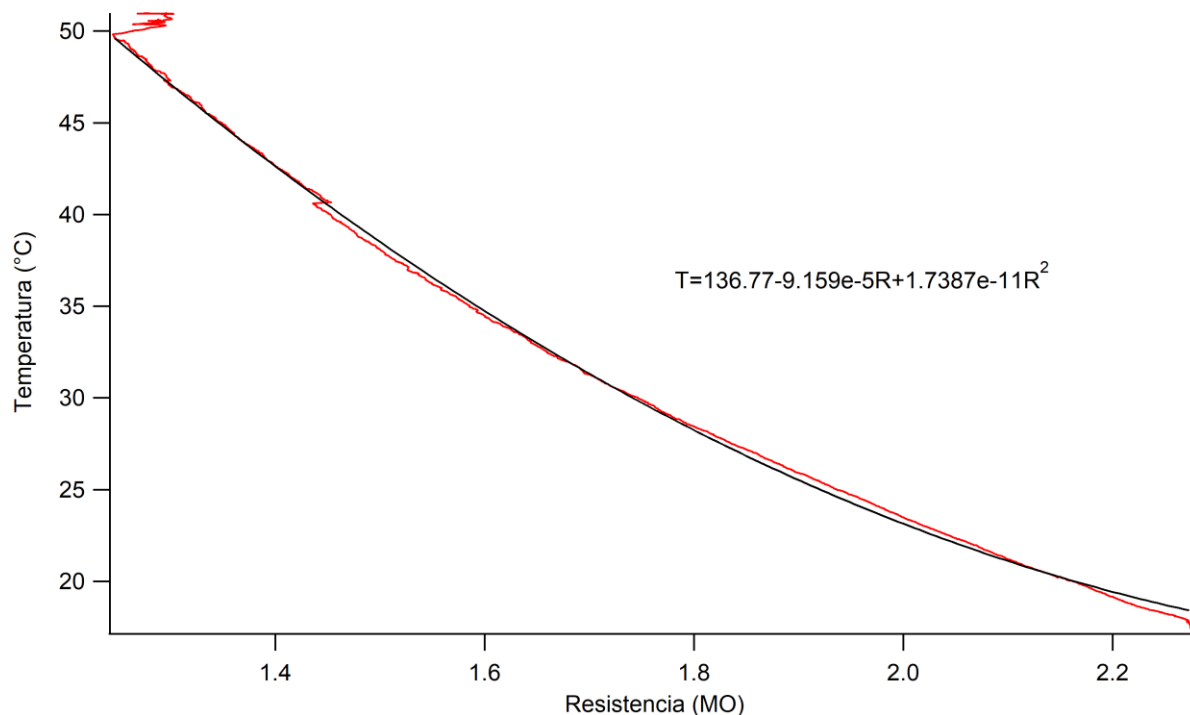


Fig. 15. Relación entre la temperatura y la resistencia de una pipeta abierta (línea roja), así como el ajuste a un polinomio de tres términos que da lugar a una ecuación que relaciona ambos parámetros (línea negra).

El segundo experimento consistió en colocar una pipeta abierta a cierta distancia del microcalentador, administrarle cierta corriente al microcalentador programada en la fuente de poder, entonces la corriente que detecta el electrodo en la pipeta abierta es registrada con PatchMaster, convertida a resistencia por la ley de Ohm y finalmente a temperatura con la ecuación obtenida en el ajuste (Fig. 15). Es importante tomar en cuenta la temperatura del baño de registro al realizar el ajuste. Así, se pueden programar diversas corrientes en la fuente de poder y se calcula la temperatura a la que equivalen.

VII. Estimulación por temperatura

Antes de iniciar el registro electrofisiológico se calibra la temperatura que alcanza el microcalentador, según la corriente que se programa en la fuente de poder. Una vez

que se tiene el parche en configuración *whole-cell*, éste se coloca a una distancia aproximada de 27 μm del microcalentador (Fig. 16) y se procede a aplicar los pulsos de temperatura.

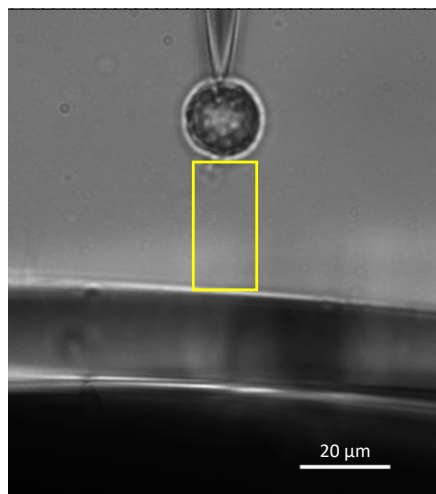


Fig. 16. Imagen obtenida con una cámara (Scion Corporation), controlada por Micromanager 1.3; muestra al microcalentador (debajo) y la pipeta con el sello (arriba) separados a una distancia aproximada de 27 μm , con el objetivo de 40X (recuadro amarillo o ROI, realizado con el programa Image J).

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

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

VIII. Activación por capsaicina

Se empleó un sistema de perfusión en el que un tubo con capsaicina conectado a una manguera termina en un capilar tipo pipeta de registro de *patch-clamp*, luego se monta sobre un motor de pasos, junto al microcalentador y la solución se administra a la cámara de registro por gravedad. Se usa una manguera de succión para intercambiar el baño de registro, así como otro sistema de perfusión que administra baño de registro.

IX. Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa Igor Pro 6.37, así como Microsoft Excel 2007.

RESULTADOS

En la primera parte de la tesis en la que se estandarizó el método de cultivo y registro de neuronas DRG se empleó el ratón blanco de la cepa CD1, con el cual se realizaron el cultivo celular y los registros electrofisiológicos de fijación de voltaje, fijación de corriente, registros con capsaicina y los primeros registros con calor.

I. Cultivo Celular

Las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) son una población heterogénea de células en la que se pueden observar varios tipos (neuronas y células de soporte) y tamaños celulares (Fig. 17).

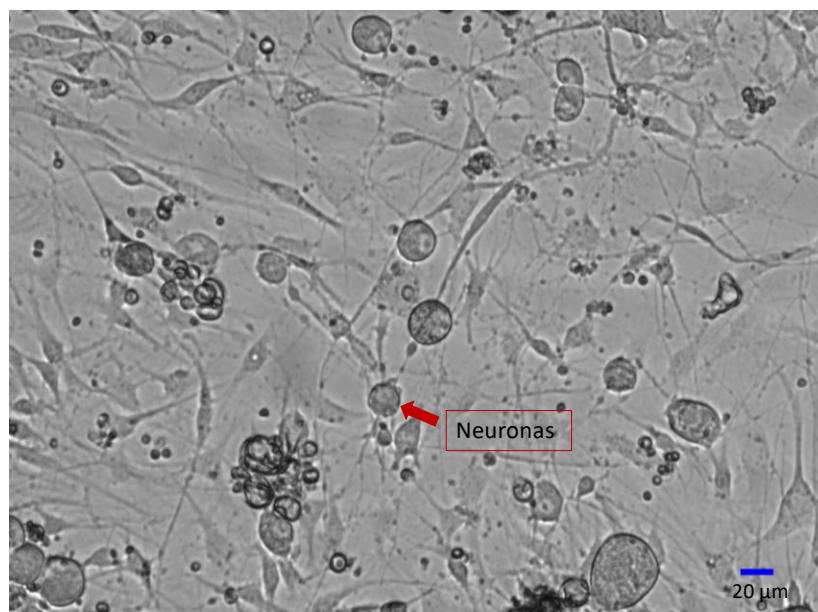


Fig. 17. Cultivo de neuronas DRG y células de soporte. Imagen tomada en campo claro con el objetivo 10X de un microscopio invertido, mediante una cámara Scion Corporation donde se observan distintos tipos y tamaños de células en el cultivo. Cultivo celular de ganglios de la raíz dorsal disgregados del ratón cepa CD1.

De éstas, son de particular interés las neuronas de tamaño pequeño y mediano, de tipo C y A δ , respectivamente, las neuronas que expresan TRPV1. Principalmente, las neuronas cuyo diámetro es aproximadamente menor a 30 μm (neuronas medianas y pequeñas) y sobre todo de aproximadamente 20 μm (las neuronas pequeñas) que responden a capsaicina (Fig. 18).

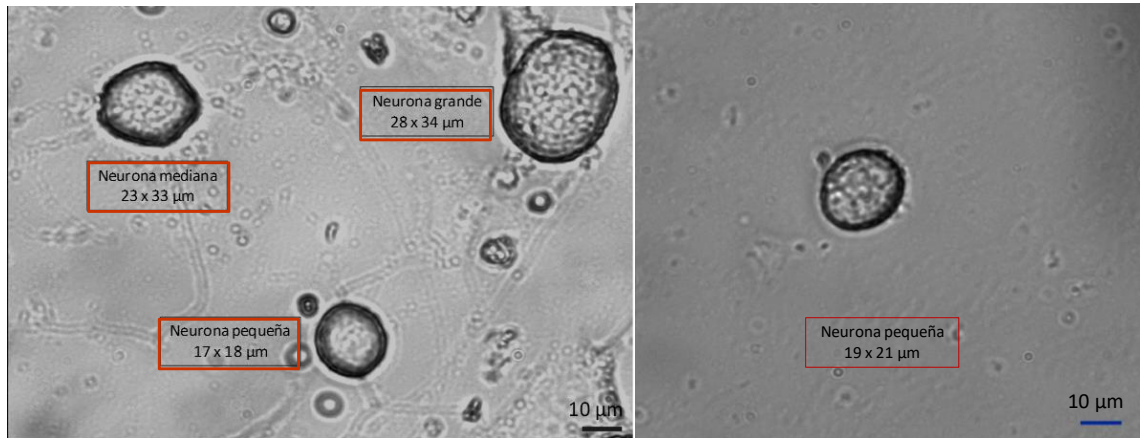


Fig. 18. Neuronas DRG de distintos tamaños. Tres tamaños distintivos de neuronas DRG (lateral izquierdo). Neurona DRG pequeña que responde a capsaicina (lateral derecha). Imagen tomada en campo claro con el objetivo 40X de un microscopio invertido mediante una cámara Scion Corporation.

II. Registro electrofisiológico de neuronas DRG

En un inicio, el registro electrofisiológico se realizó en células de todos los tamaños. A continuación, se muestran registros de corriente bajo fijación de voltaje (*voltage clamp*) en la modalidad *whole-cell* o célula completa (Fig. 19).

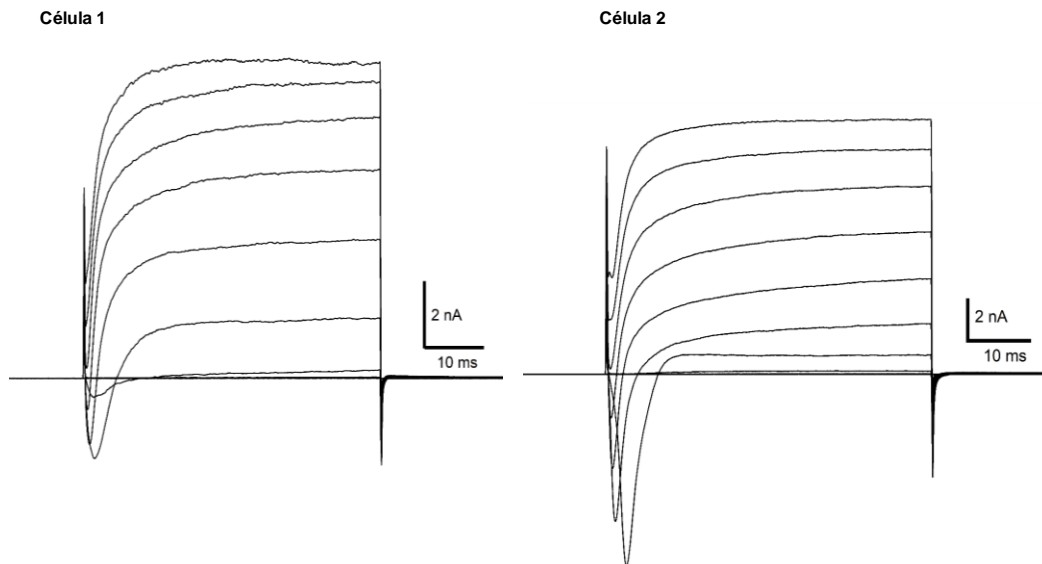


Fig. 19. Familias de corrientes de neuronas DRG de tamaños distintos en configuración *whole-cell*. Se muestran dos registros de dos neuronas de tamaño distinto. El protocolo de pulsos de voltaje tiene un potencial de mantenimiento de -80 mV, a partir del cual se aplican 10 pulsos de voltaje desde -80 mV, con incrementos de 20 en 20 hasta +100 mV. El pulso cuadrado dura 50 ms. Dos neuronas representativas de 6 células registradas.

De las células registradas, particularmente en la célula 2 se puede observar muy bien una corriente entrante que correspondería a los canales de sodio que dejan entrar sodio a la neurona (fase de despolarización del potencial de acción), así como corriente saliente que correspondería a los canales de potasio que dejan salir potasio de la neurona (fase de repolarización del potencial de acción). Incluso, se observa cierta corriente saliente de sodio a potenciales muy despolarizantes (Fig. 19); ahora, no todas las neuronas mostraron la misma corriente entrante de sodio, algunas mostraron menos, como en la célula 1 (Fig. 19).

Estos resultados indican que las células obtenidas del cultivo son neuronas y no alguna célula de soporte. Por lo que posteriormente las neuronas DRG registradas debían mostrar corriente entrante en la familia de corrientes.

III. Registro de potenciales de acción con fijación de corriente o *current clamp*

Sin embargo, para asegurar que las células registradas son neuronas, se realizaron registros de potencial de membrana bajo fijación de corriente o *current clamp* en la modalidad *whole-cell*, y se verificó el disparo de potenciales de acción.

Se utilizó un protocolo con una serie de escalones de corrientes progresiva desde corrientes negativas hasta aproximadamente 25 pA, para observar en cuál de ellas se logra el disparo de potenciales de acción. La siguiente neurona comienza a disparar potenciales de acción en 4 pA de corriente (Fig. 20B), pero la magnitud de dicha corriente puede variar en las distintas neuronas. También, como se puede apreciar, la forma y el tamaño del potencial de acción no cambia, aumenta la frecuencia de disparo de potenciales de acción conforme aumenta el pulso de corriente (Fig. 20C).

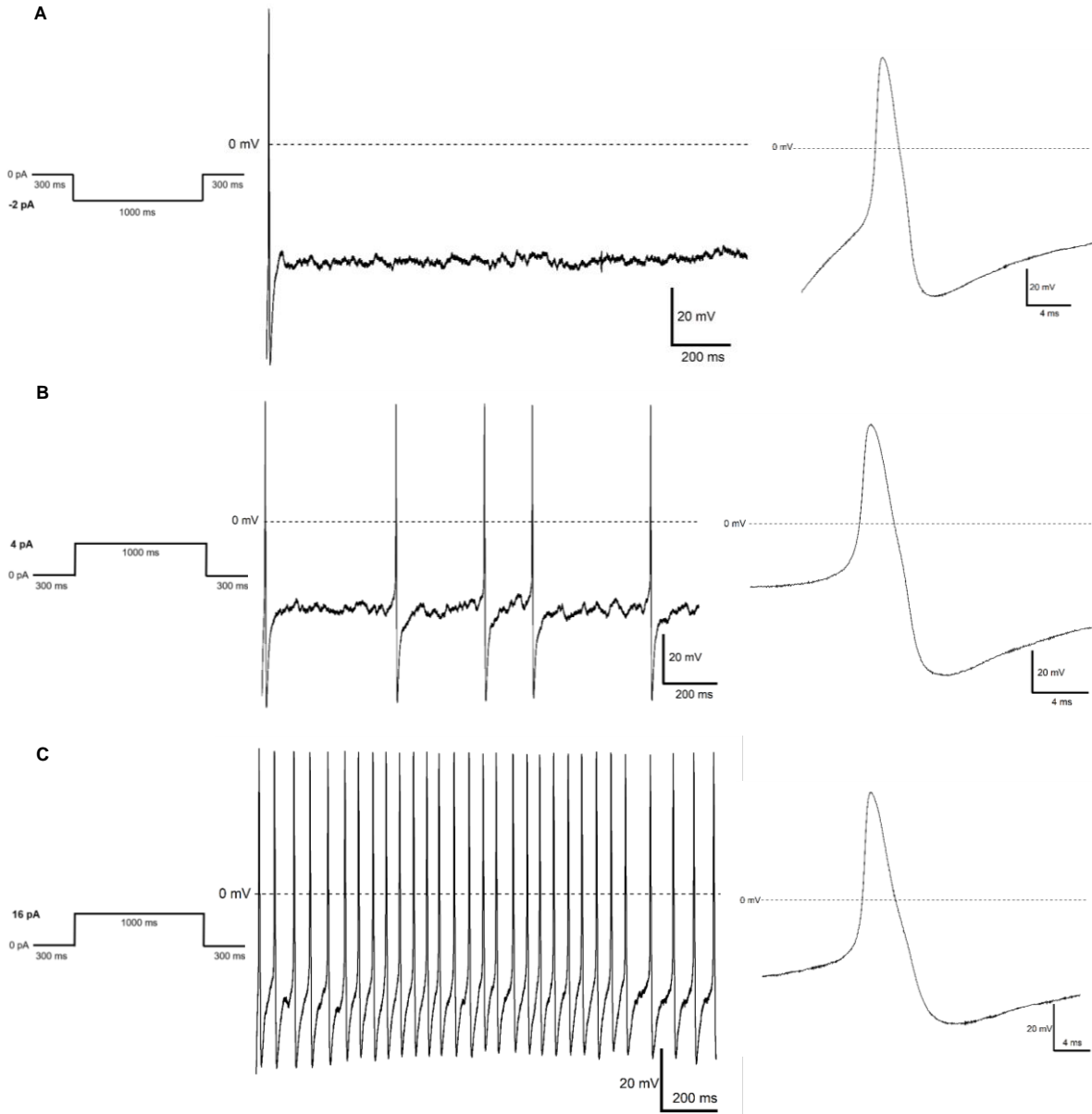


Fig. 20. Disparo de potenciales de acción en neuronas DRG por fijación de corriente o *current clamp*. Se muestran tres corrientes, -2, 4 y 16 pA, con las cuales se verifica el disparo de potenciales de acción en una neurona DRG, así como el acercamiento a uno de los potenciales de acción en cada corriente. La serie progresiva de fijación de corrientes tiene 10 pulsos que van desde -2 pA hasta 16 pA con incrementos de 2 pA, cada corriente dura 1000 ms. El potencial de reposo de la neurona es de -77 mV y su umbral de disparo está en -34 mV aproximadamente. Registro representativo de una neurona DRG.

En lo sucesivo, se utilizó una serie progresiva de corrientes para verificar el disparo de potenciales de acción en las células de registro y asegurar que son neuronas.

IV. Registro de potenciales de acción por capsaicina en presencia de calcio extracelular

Ahora bien, se sabe que son neuronas DRG mediante el registro de potenciales de acción, pero es necesario registrar neuronas que expresen TRPV1, una forma de marcar dichas células es mediante el disparo de potenciales de acción al estimular con capsaicina, puesto que TRPV1 es el receptor de capsaicina.

Entonces, se intentó registrar potenciales de acción al perfundir capsaicina en la solución extracelular en ausencia de algún pulso de corriente y en un inicio en presencia de calcio extracelular. Se observó una despolarización y luego el disparo de potenciales de acción algunos segundos después de perfundir capsaicina (Fig. 21).

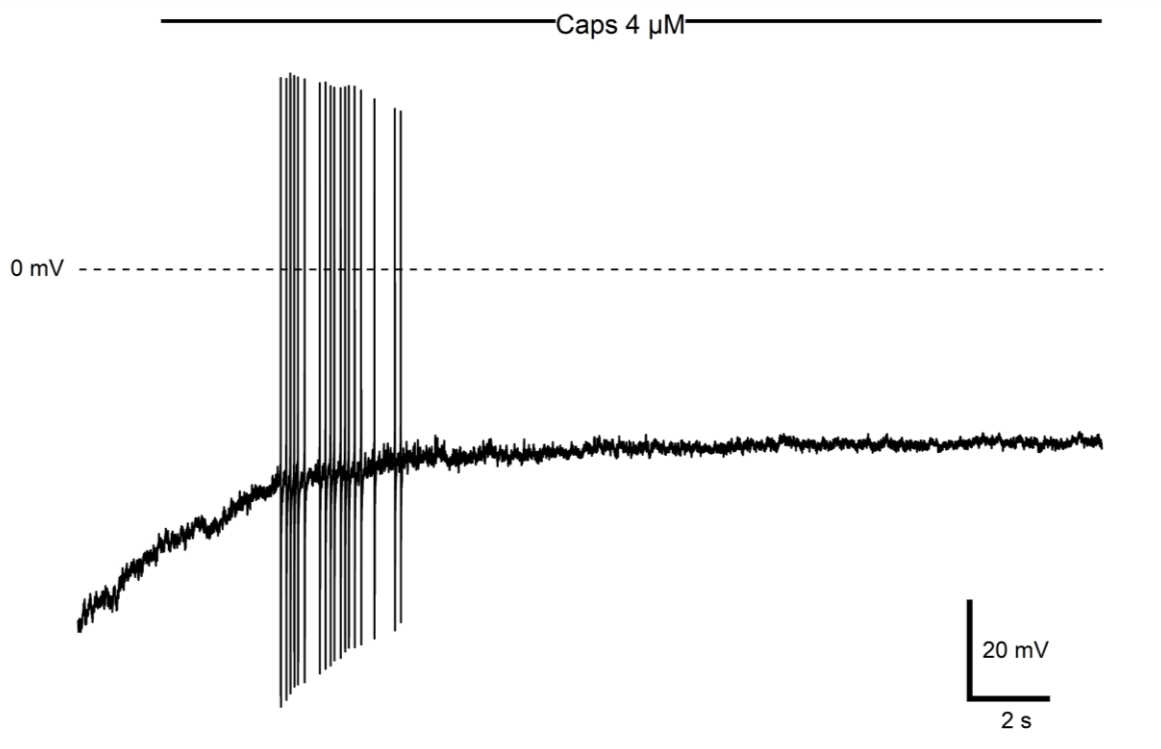


Fig. 21. Registro de potenciales de acción en una neurona DRG al estimular con capsaicina 4 μ M en presencia de calcio extracelular. Neurona con fijación de corriente a 0 pA, su potencial de reposo es de -70 mV (el potencial de reposo fue modificado según el potencial de reposo de la mayoría de las células) y el umbral de disparo está en -40 mV aproximadamente. Célula representativa de cuatro células registradas.

No obstante, se obtenían muy pocos registros de neuronas que dispararan potenciales de acción con capsaicina 4 μ M, así que se intentó disminuir la concentración de capsaicina, puesto que ésta puede resultar tóxica para la célula (Caterina et al., 1997); y la activación se realizó con fijación de voltaje.

V. Registro de corriente activada por capsaicina

Entonces, con el fin de encontrar neuronas DRG pequeñas que expresaran TRPV1, se perfundi6 capsaicina 1 μM en el medio (Koplas et al., 1997), y en lugar de registrar el disparo de potenciales de acci6n mediante *current clamp*, se registraron corrientes mediante fijaci6n de voltaje o *voltage clamp* en la modalidad *whole-cell*.

En la mayoría de las neuronas se observaron corrientes entrantes activadas por capsaicina con un pulso continuo de -60 mV, de m6s de 1 nA como se ha reportado anteriormente (Koplas et al., 1997) (Fig. 22). Adem6s, al perfundir capsaicina, se observ6 corriente entrante que se comienza a desensibilizar antes de detener la perfusi6n de capsaicina y comenzar a lavar con soluci6n de registro, esto debido a la presencia de calcio extracelular (Fig. 22).

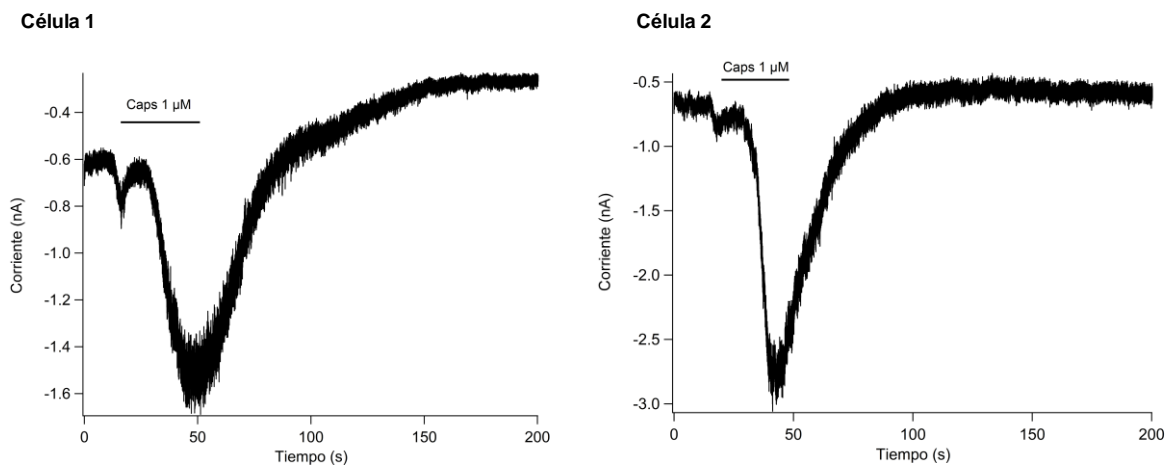


Fig. 22. Corriente de TRPV1 activada por capsaicina en neuronas DRG en presencia de calcio extracelular. Pulso continuo a -60 mV. Dos neuronas representativas de tres neuronas registradas.

Y es que TRPV1 tiene un fen6meno de desensibilizaci6n por calcio, en el que se reduce la actividad del canal durante el est6mulo de capsaicina o al aplicar pulsos de capsaicina repetidos pero breves (Caterina et al., 1997; Koplas et al., 1997; Planelles-Cases et al., 2011), el cual puede interferir con el fen6meno de inactivaci6n por temperatura que se pretende probar en esta tesis y tambi6n puede dar cuenta de la ausencia en el disparo de potenciales de acci6n por las neuronas DRG estimuladas con capsaicina 4 μM en presencia de calcio extracelular.

Debido a ello, se realiz6 el experimento antes descrito en ausencia de calcio y magnesio extracelular (Fig. 23) y se observ6 corriente entrante de magnitud similar a la observada en presencia de calcio extracelular (Fig. 22), pero dicha corriente no se desensibiliza antes de detener la perfusi6n de capsaicina, su retorno a la corriente basal es m6s lento (Fig. 23).

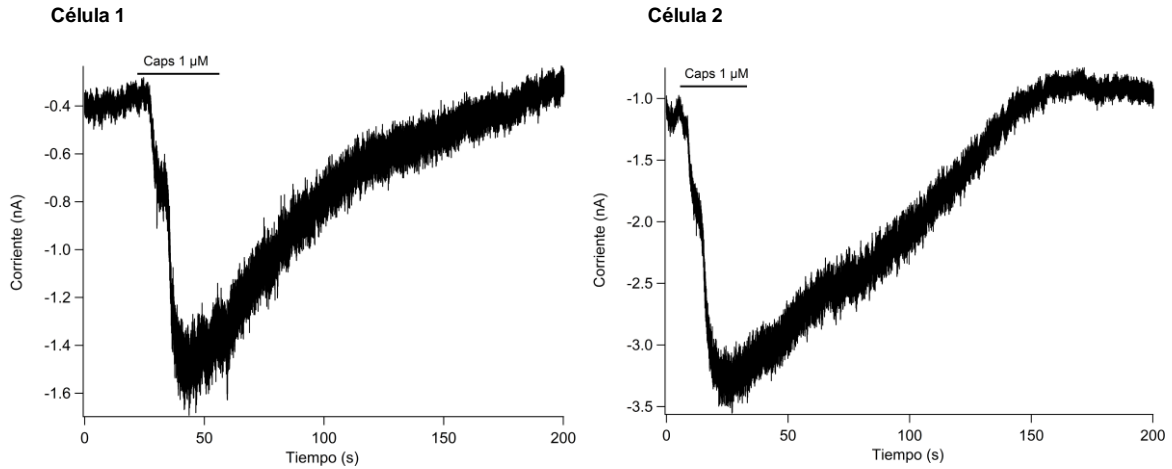


Fig. 23. Corriente de TRPV1 activada por capsaicina en neuronas DRG en ausencia de calcio y magnesio extracelular. Pulso continuo a -60 mV. Dos neuronas distintas de tres neuronas registradas.

Así, se puede concluir que hay más desensibilización de la corriente activada por capsaicina en el tiempo en los registros con calcio comparados con los registros en los que éste no se encuentra presente (Fig. 24).

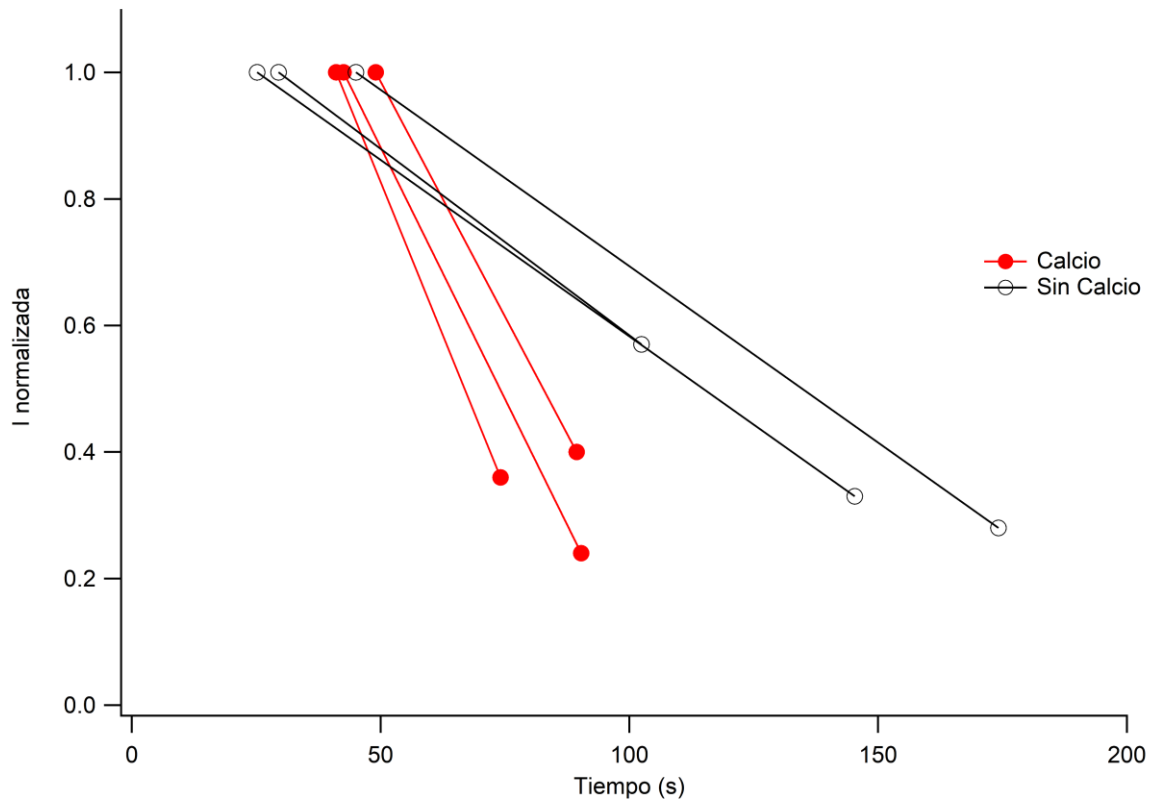


Fig. 24. Desensibilización de la corriente activada por capsaicina en presencia de calcio extracelular. Se muestra la corriente activada por capsaicina normalizada con respecto al tiempo, en presencia y ausencia de calcio extracelular. El primer punto de cada experimento muestra la corriente máxima que se alcanza en el registro y el segundo punto muestra cuando la corriente ha decaído hasta alcanzar el punto basal. Tres experimentos en cada condición.

Con base en todo esto, en adelante las neuronas DRG registradas fueron elegidas según el tamaño y la forma de las células que respondieron a capsaicina, y se tomó en cuenta la desensibilización por calcio observada en las neuronas DRG.

VI. Registro de potenciales de acción por capsaicina en ausencia de calcio extracelular

A continuación, con el fin de corroborar si la concentración de capsaicina era el motivo por el que no se podían registrar potenciales de acción en las neuronas DRG al estimular con capsaicina, y no algún problema con el cultivo celular que afectara la expresión de TRPV1, se registraron potenciales de acción con capsaicina 1 μM y 30 nM (Koplas, et al., 1997) en ausencia de calcio extracelular (Fig. 25).

Se observan potenciales de acción con capsaicina 1 μM (Fig. 25A) e inclusive con una concentración más baja de capsaicina: 30 nM (Fig. 25B), los cuales se obtuvieron rápidamente en dos neuronas registradas. Por lo que se concluye que la concentración de capsaicina es un factor importante al registrar potenciales de acción en neuronas DRG pequeñas, así como la presencia de calcio extracelular.

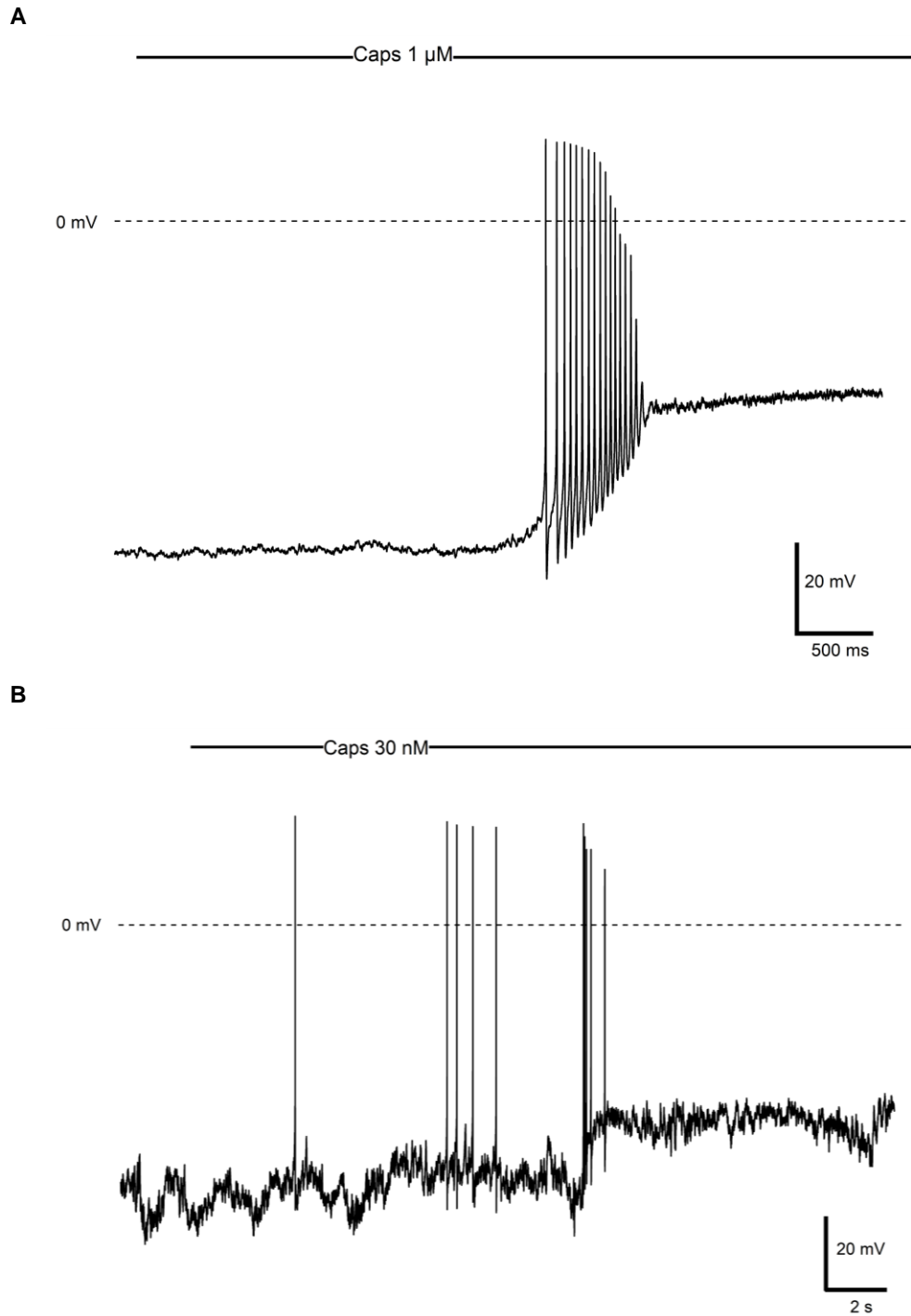


Fig. 25. Registro de potenciales de acción en neuronas DRG al estimular con capsaicina en ausencia de calcio extracelular. Fijación de corriente a 0 pA. A. Neurona con un potencial de reposo de -70 mV (el potencial de reposo fue modificado según el potencial de reposo de la mayoría de las células), umbral de disparo de -65 mV aproximadamente. B. Neurona con un potencial de reposo de -70 mV (el potencial de reposo fue modificado según el potencial de reposo de la mayoría de las células), umbral de disparo de -60 mV aproximadamente. Dos neuronas registradas.

VII. Activación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas de ratón WT CD1

Posteriormente, se comenzó a estimular por calor a neuronas DRG pequeñas del ratón CD1, con el que se había estado trabajando desde el inicio de la tesis.

Para ello, se registraron corrientes con fijación de voltaje en configuración *whole-cell* a un potencial de -60 mV, donde se estimula por calor a las neuronas DRG con una rampa simétrica de 2 s de calentamiento y 2 s de enfriamiento, la cual se aplica repetidamente cada 30 s, todo esto sin calcio extracelular (Fig. 26). Se observó una potenciación de la corriente, puesto que la corriente aumenta al aplicar cada rampa de temperatura (Fig. 26).

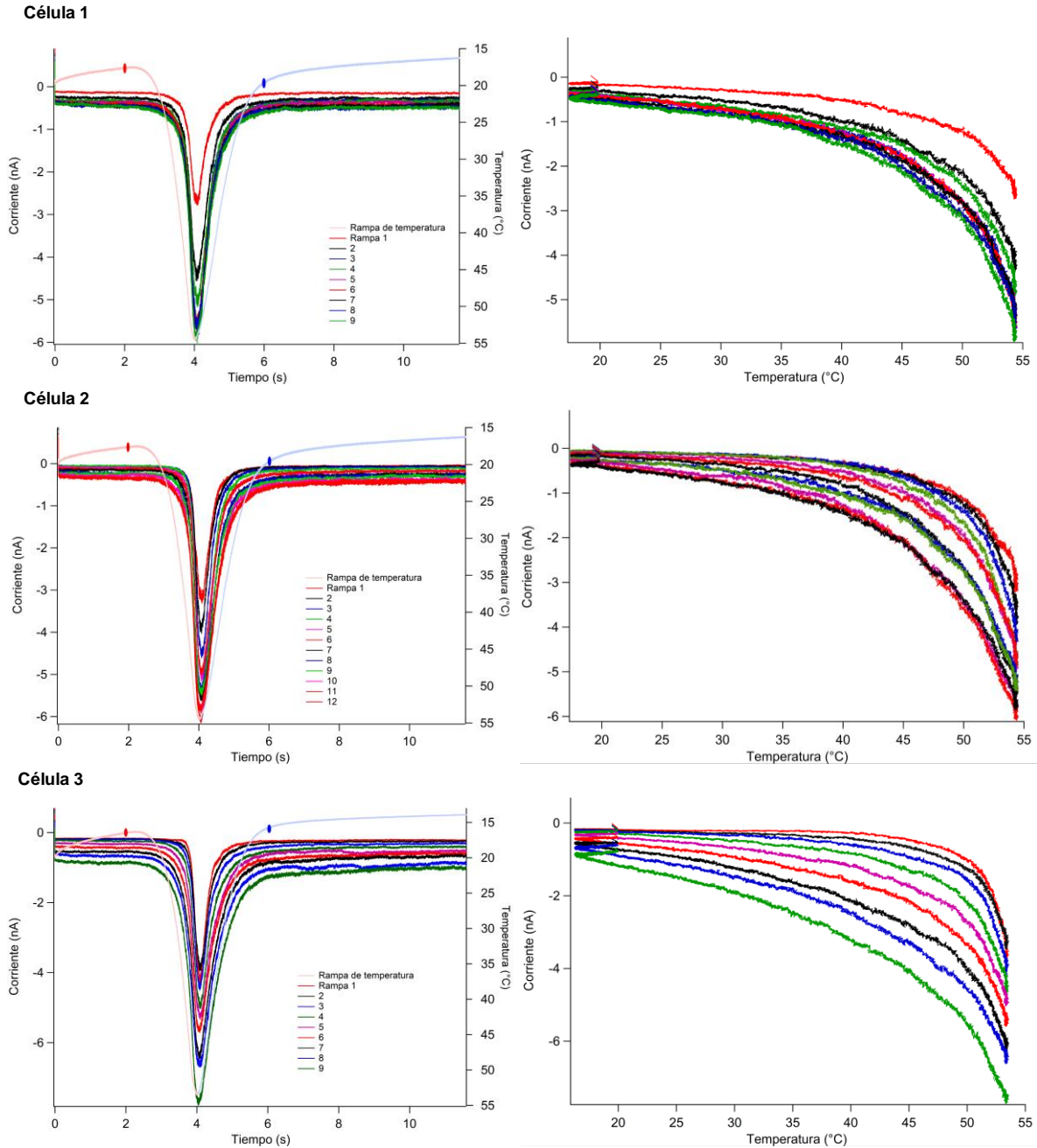


Fig. 26. Estimulación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas de ratón WT CD1. Tres células distintas estimuladas por una rampa de temperatura cada 30 s. La rampa simétrica de temperatura tiene 2 s de calentamiento (línea roja tenue) y 2 s de enfriamiento (línea azul tenue); cuyo inicio y final están indicados por los puntos rojo y azul, respectivamente. En el lado izquierdo se muestra la respuesta en corriente de las células a las rampas de temperatura en cada punto de tiempo; y en el lado derecho las curvas corriente vs. temperatura de cada célula, según la relación con la rampa de calibración de temperatura, donde solo se toma en cuenta la fase de calentamiento de la rampa de temperatura. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell*, con *voltage clamp* a -60 mV, sin calcio extracelular.

Cuando la corriente de cada una de las rampas aplicadas se normaliza, con respecto a la corriente máxima de la primera rampa (I_{max}), se observa que la corriente aumenta progresivamente hasta casi el doble de la corriente inicial (Fig. 27).

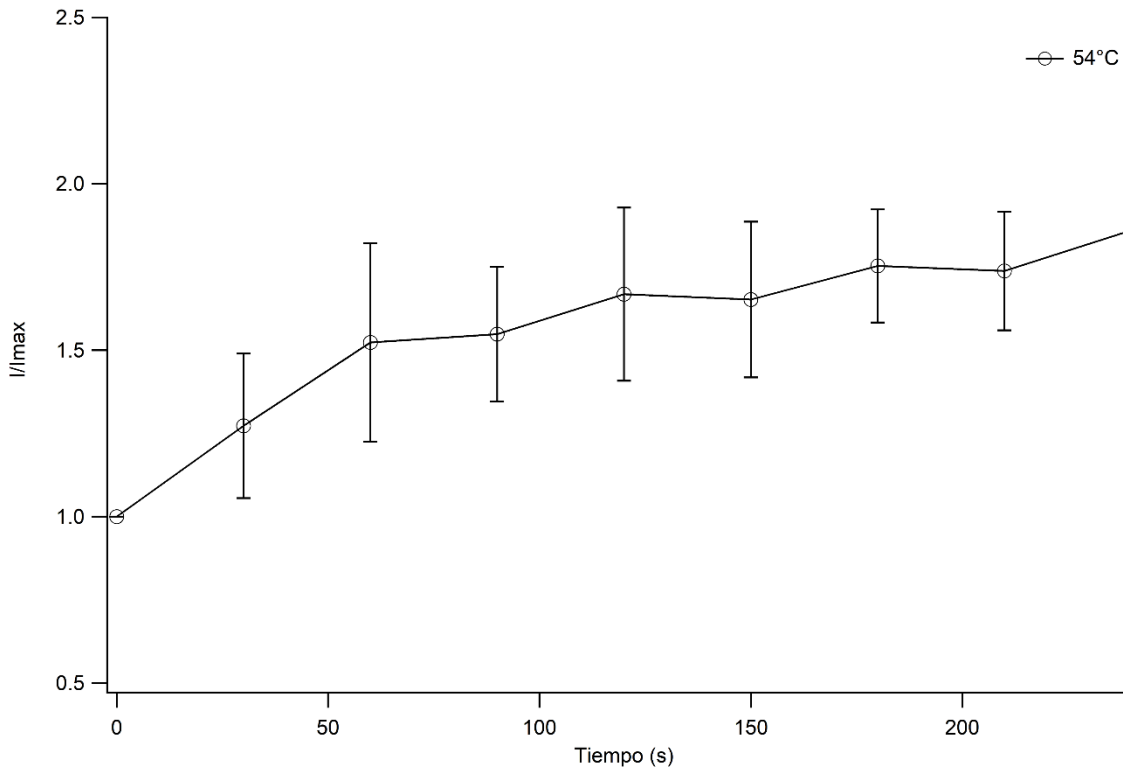


Fig. 27. Corriente normalizada de las neuronas activadas por temperatura del ratón WT CD1. Se muestra el cociente de la corriente de cada una de las rampas (la corriente neta se obtiene restando la corriente de fuga o *leak* de la corriente en el punto más alto), sobre la corriente máxima o la corriente de la primera rampa en cada punto de tiempo con su respectiva barra de error estándar. Es un promedio de tres experimentos con una rampa de temperatura que alcanza 54°C.

Este resultado discrepa de los resultados previos obtenidos en células HEK 293 que expresan de manera heteróloga TRPV1, donde la corriente disminuye con cada rampa de calor.

Ahora bien, la respuesta en corriente de las neuronas a las rampas de calor involucra varios canales activados por temperatura en la célula, una forma de tratar de identificar específicamente a TRPV1 consiste en calcular la entalpía (ΔH) de activación por temperatura, ya que el proceso cerrado a abierto de TRPV1 involucra una cantidad de entalpía grande (Baez et al., 2014), la cual también se ha calculado en el laboratorio al expresar a TRPV1 de manera heteróloga y al comparar dicho

valor con el que se halle en las neuronas DRG nos podría dar una idea de su presencia en éstas.

En ese sentido, para el cálculo de la entalpía de activación por temperatura, la corriente de activación por temperatura (I) se relaciona con la probabilidad de apertura (P_0) según la ecuación:

$$I = P_0 * i * N$$

Donde la corriente unitaria (i) de los canales en principio no varía mucho, tiene cierta dependencia de la temperatura, pero al final no cambia demasiado el valor y el número total de canales (N) no cambia, por lo que la corriente de activación por temperatura (I) solo dependería de la probabilidad de apertura (P_0).

Si se asume el modelo más simple de dos estados, en la ecuación de Van't Hoff (Baez et al., 2014):

$$\ln(K_{eq}) = -\Delta H / R (1/T) + \Delta S/R$$

Se podría considerar:

$$\ln(I) = -\Delta H/R (1/T) + \Delta S/R$$

Puesto que no se ha medido la constante de equilibrio (K_{eq}), pero la probabilidad de apertura cambia porque la constante de equilibrio cambia, según la ecuación:

$$P_0 = 1/1+K_{eq}$$

Es decir, se considera la ecuación de Van't Hoff en función de la probabilidad de apertura, en lugar de la constante de equilibrio, y las curvas corriente vs. temperatura serían en realidad curvas de probabilidad de apertura.

Con base en esto, el cambio en la corriente ($\ln(I)$) con respecto a $1/T$ (Inverso de la temperatura absoluta) es una línea recta y la pendiente es $\Delta H/R$ (donde R es la constante de los gases). Por lo que, a partir de los datos de la gráfica corriente vs. temperatura se obtiene $\ln(I)$ vs. $1/T$ (Fig. 28A).

En esta gráfica, se calcula primero la entalpía del *leak* o corriente de fuga de la neurona, la cual corresponde a la entalpía de la membrana de la célula y los receptores o canales iónicos que con un potencial de -60 mV tienen fuga de corriente con una dependencia de temperatura muy baja, que corresponde a la primera parte de la gráfica con una pendiente más baja (Fig. 28A); luego, esta entalpía de la corriente de fuga se resta del resto de la gráfica, para obtener sólo la entalpía de los canales, e identificar qué tanta contribución hay en ésta de TRPV1 (Fig. 28B).

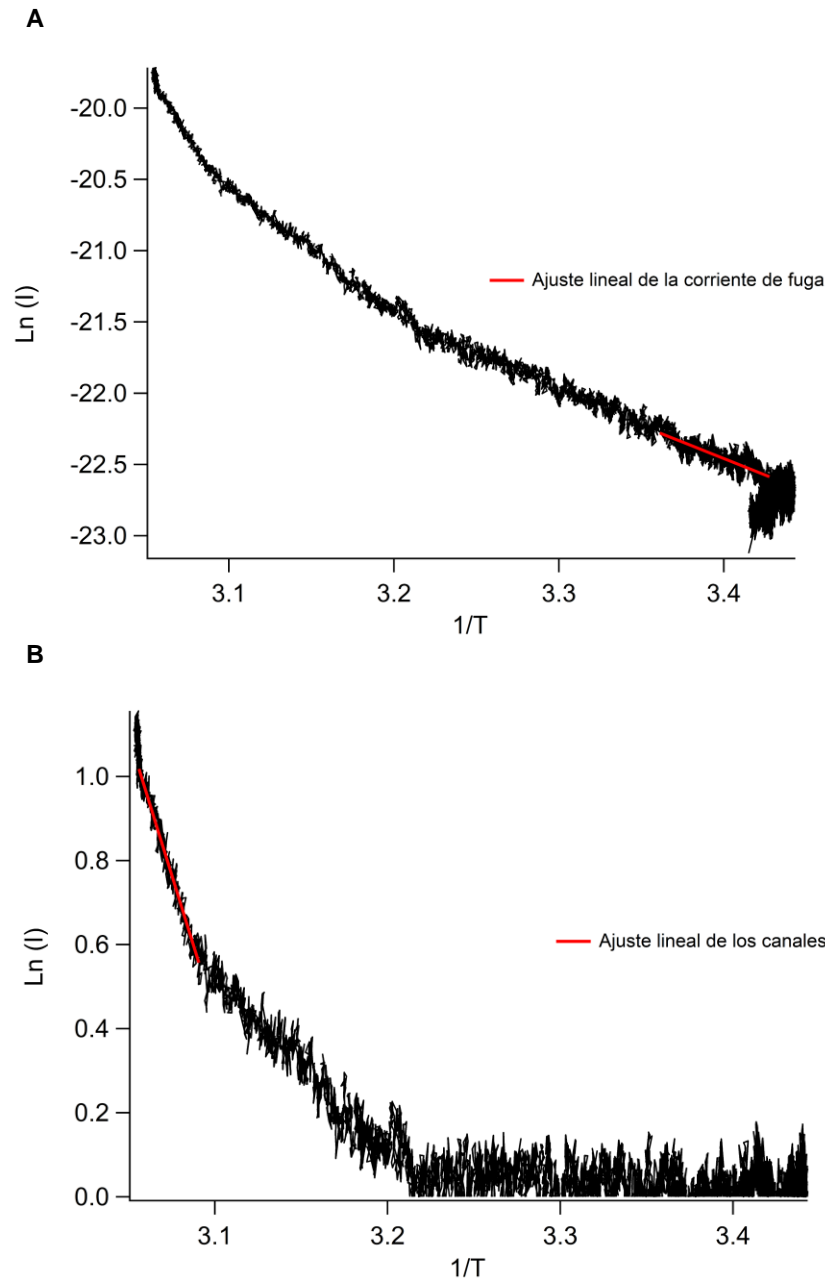


Fig. 28. Cálculo de la entalpía de activación por temperatura en una neurona DRG. Se muestra un ejemplo del cálculo de la entalpía con base en lo mencionado en el texto. Se realiza un ajuste a una línea recta, de cuya ecuación se obtiene la pendiente, la cual será multiplicada por R o la constante de los gases para obtener el valor de entalpía. A. Cálculo de la entalpía de la corriente de fuga de la neurona. B. Cálculo de la entalpía de los canales al restar la entalpía de la corriente de fuga de la célula.

Con base en ello, la entalpía de activación por temperatura de los experimentos realizados en el ratón CD1 fue calculada (Fig. 29) y los resultados muestran que la entalpía es menor con respecto a la entalpía obtenida para TRPV1 en sistemas de

expresión heteróloga (Baez et al., 2014), lo cual probablemente se debe a la contribución de los demás canales expresados en la neurona DRG que también se activan por temperatura a la entalpía de toda la célula.

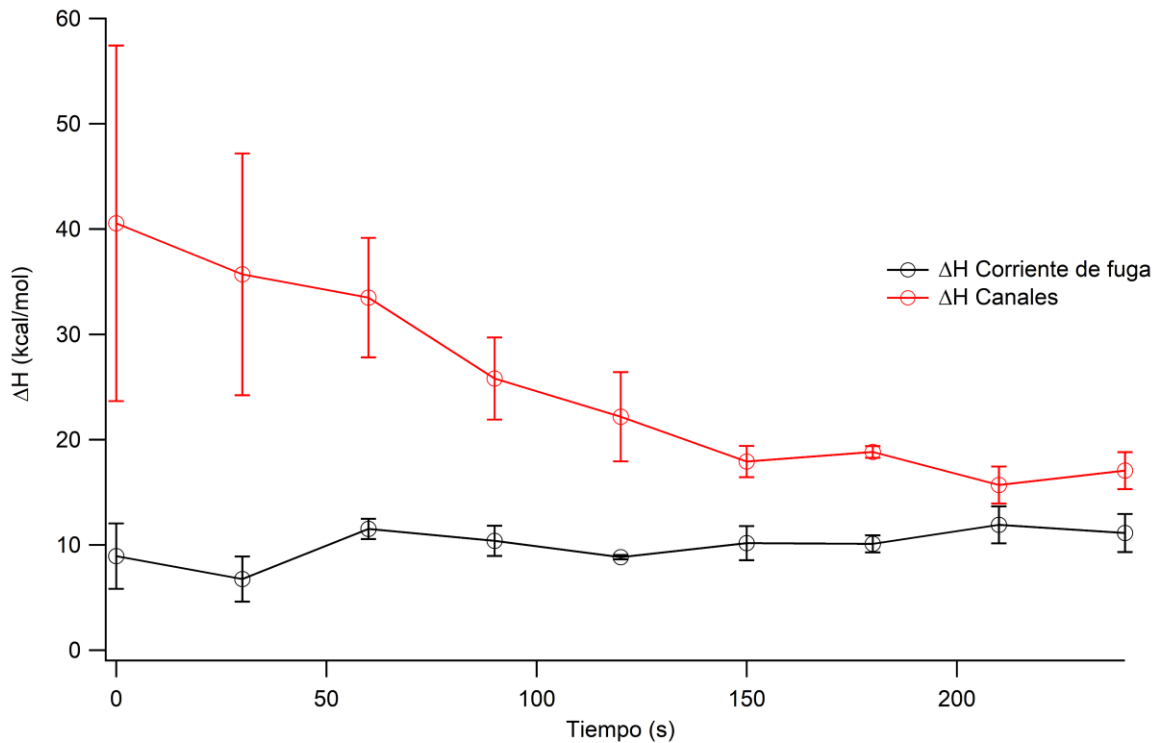


Fig. 29. Entalpía de activación por temperatura de los experimentos realizados en neuronas DRG del ratón CD1. Se muestran las entalpías correspondientes a la corriente de fuga y de los canales. La gráfica está escalada en el eje de la entalpía al valor de entalpía que se ha obtenido para TRPV1 en células HEK293 que expresan de manera heteróloga el canal, según experimentos llevados a cabo en el laboratorio. Cada punto representa el promedio de las entalpías con su error estándar de cada una de las rampas en ese punto de tiempo. Es un promedio de tres experimentos.

Por otra parte, una de las estrategias de esta tesis para aislar a TRPV1 de un sistema tan complejo como la neurona DRG, consiste en utilizar al ratón knock-out de TRPV1 (TRPV1^{-/-}) y observar cómo responde a la estimulación por rampas de temperatura consecutivas. Este ratón se encuentra en la cepa C57 BL6-J, así que se comenzaron a emplear ratones de esta cepa para los registros electrofisiológicos de temperatura y se dejaron de utilizar ratones de la cepa CD1.

VIII. Activación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1-/-

Los ratones knock-out de TRPV1 (TRPV1-/-) están genotipificados como hermanos homocigotos y al estimular sus neuronas DRG pequeñas con capsaicina no se observa corriente (Fig. 30).

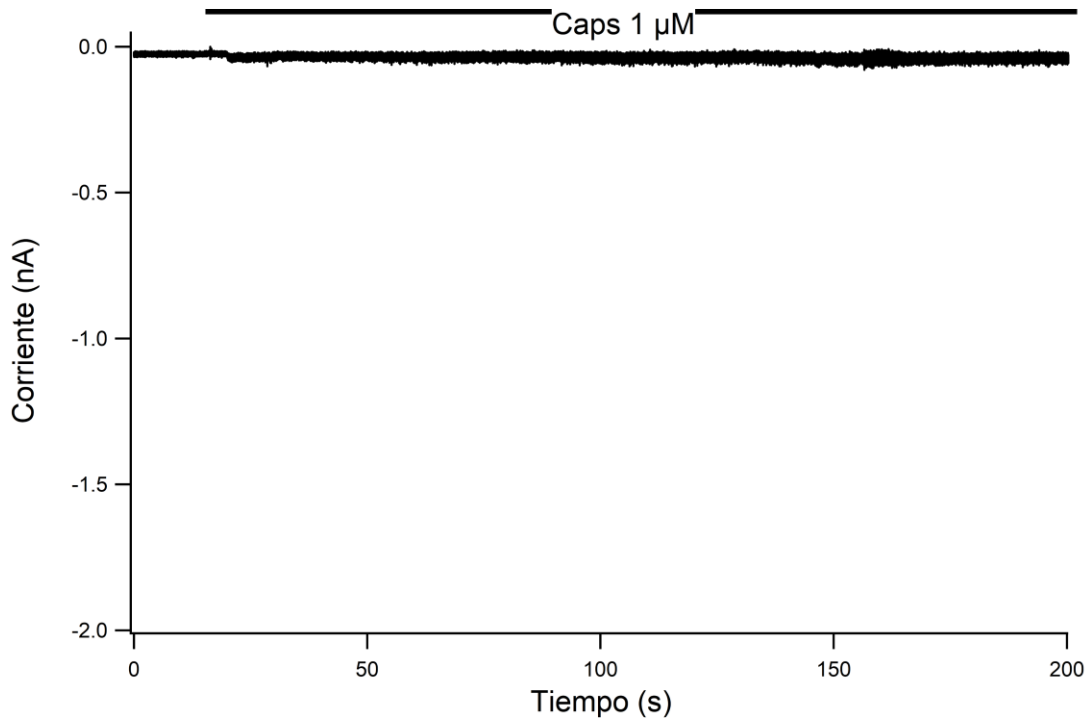


Fig. 30. Las neuronas DRG pequeñas del ratón TRPV1-/- no responden a capsaicina. Se muestra una neurona DRG pequeña que fue estimulada con capsaicina 1 μ M. La gráfica está escalada a la corriente aproximada que se obtuvo en neuronas DRG WT con el canal TRPV1. La célula fue registrada en configuración *whole-cell* en modo *voltage clamp* a -60 mV sin calcio extracelular. Es una célula representativa de dos células registradas.

Entonces, se realizó el mismo experimento antes mencionado de estimulación por rampas de calor consecutivas en neuronas DRG pequeñas del ratón C57 BL6-J TRPV1-/-, y las rampas de calor muestran muy poca corriente, de tal forma que se confunde con el *leak* o corriente de fuga de la célula (Fig. 31), por ende, se vuelve difícil observar si hay un aumento o descenso en la corriente, pero ésta parece traslaparse, es decir, permanece igual.

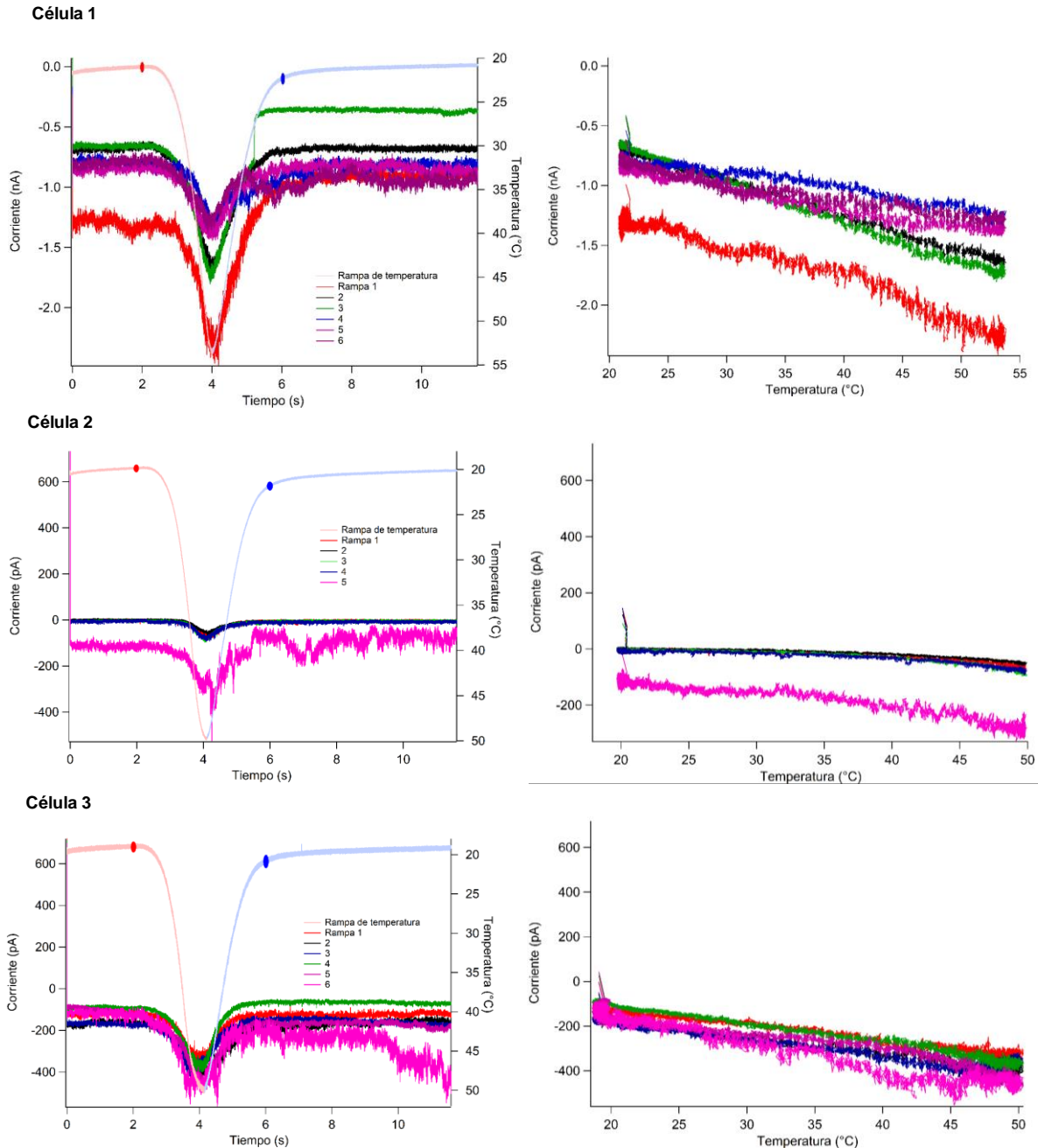


Fig. 31. Estimulación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas del ratón C57 BL6-J TRPV1^{-/-}. Tres células distintas estimuladas por una rampa de temperatura cada 30 s. La rampa simétrica de temperatura tiene 2 s de calentamiento (línea roja tenue) y 2 s de enfriamiento (línea azul tenue); cuyo inicio y final están indicados por los puntos rojo y azul, respectivamente. En el lado izquierdo se muestra la respuesta en corriente de las células a las rampas de temperatura en cada punto de tiempo; y en el lado derecho las curvas corriente vs. temperatura de cada célula, según la relación con la rampa de calibración de temperatura, donde solo se toma en cuenta la fase de calentamiento de la rampa de temperatura. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell*, con *voltage clamp* a -60 mV, sin calcio extracelular.

Al normalizar la corriente de cada una de las rampas aplicadas con respecto a la corriente máxima de la primera rampa (I_{max}), se observa que la corriente tiende a aumentar y después de algunas rampas a descender (Fig. 32).

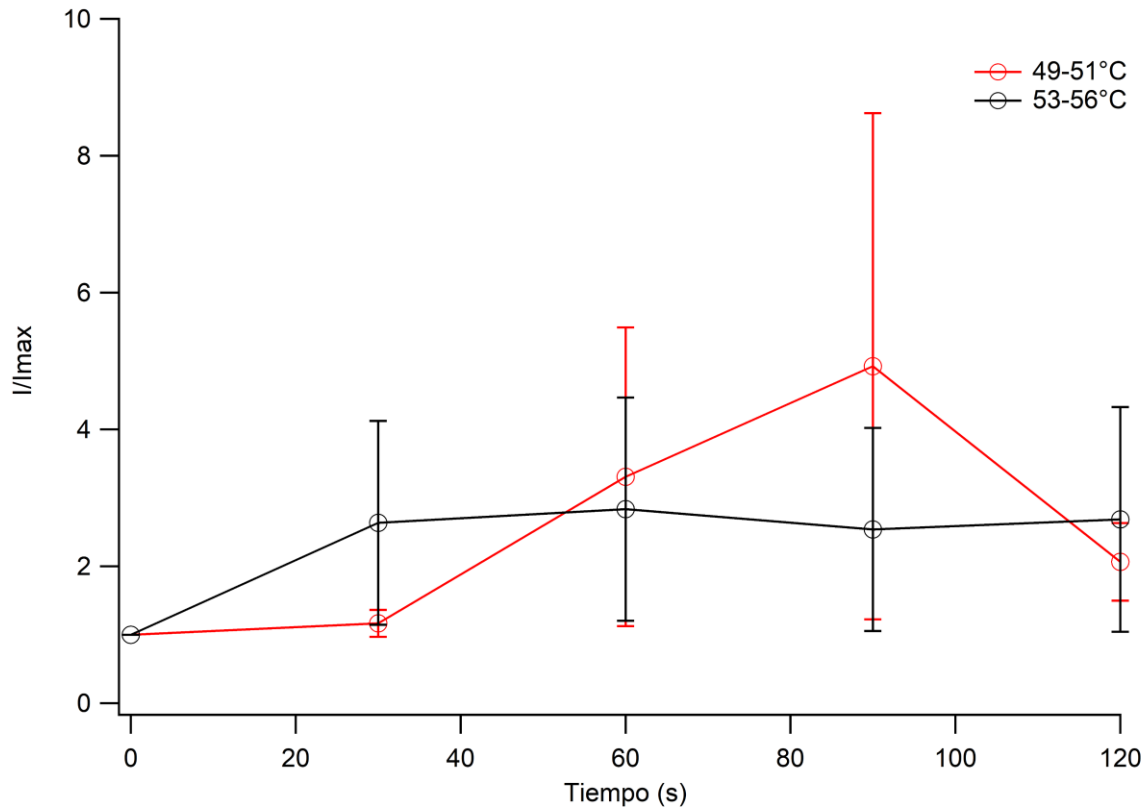


Fig. 32. Corriente normalizada de las neuronas activadas por temperatura del ratón TRPV1^{-/-}. Se muestra el cociente de la corriente de cada una de las rampas sobre la corriente máxima o la corriente de la primera rampa en cada punto de tiempo con su respectiva barra de error estándar. La línea roja muestra los experimentos realizados con rampas de calor que alcanzan de 49 a 51°C, es un promedio de tres experimentos. La línea negra muestra los experimentos realizados con rampas de calor que alcanzan de 53 a 56°C, es un promedio de 4 experimentos.

Entonces, la corriente activada por temperatura tan pequeña y el poco descenso de ésta con la estimulación por rampas de calor consecutivas es un buen indicador de la ausencia de TRPV1 en estas neuronas, por lo que se comporta como un control negativo.

También, se calcularon las entalpías de activación por temperatura (Fig. 33) y se parecen mucho a las correspondientes con la corriente de fuga de las neuronas, muy pequeñas con respecto a los valores esperados de TRPV1.

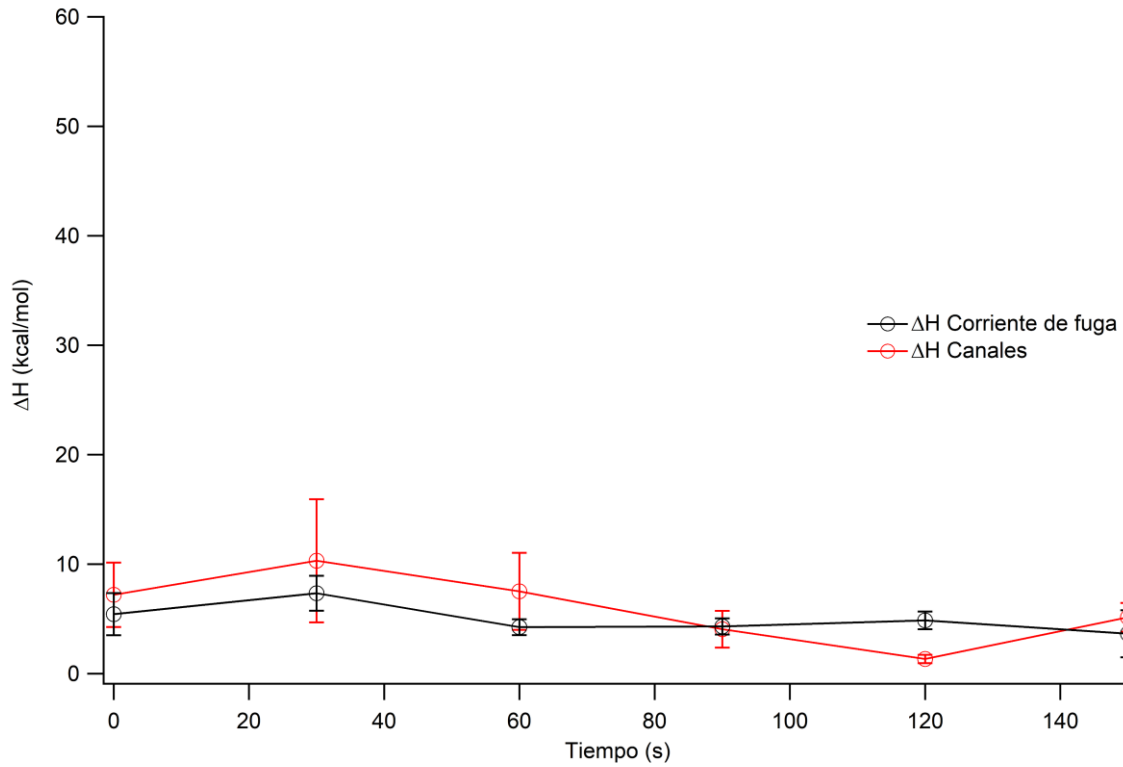


Fig. 33. Entalpía de activación por temperatura de los experimentos realizados en neuronas DRG del ratón C57 BL6-J TRPV1^{-/-}. Se muestran las entalpías correspondientes a la corriente de fuga y de los canales. Cada punto representa el promedio de las entalpías con su error estándar de cada una de las rampas en ese punto de tiempo. Es un promedio de siete experimentos.

IX. Potenciales de acción por temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1-/-

Con base en el resultado anterior, ahora se verificó si las neuronas DRG pequeñas del ratón C57 BL6-J TRPV1-/- son capaces de producir potenciales de acción cuando son estimuladas por calor, considerando que su corriente activada por temperatura es muy pequeña (Fig. 31).

Para ello, se aplicó una rampa de temperatura un poco más larga, con 3 s de calentamiento y 3 s de enfriamiento y se registraron potenciales de acción en modo *current clamp*, sin calcio extracelular. Muy interesantemente, las neuronas DRG del ratón TRPV1-/- producen potenciales de acción cuando son estimuladas por calor, aunque tienen comportamientos distintos (Fig. 34).

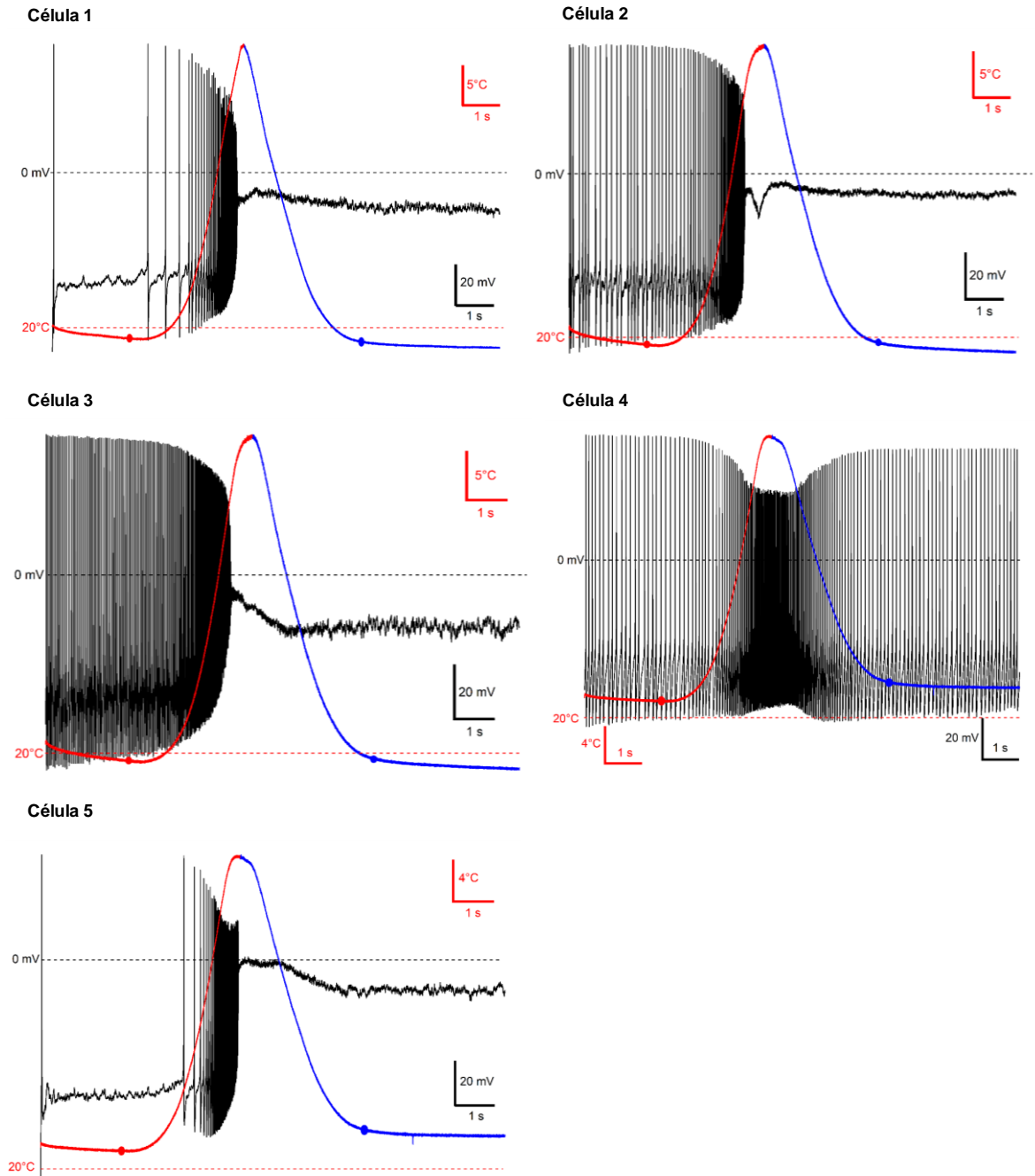


Fig. 34. Potenciales de acción producidos por temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1^{-/-}. Cinco células distintas estimuladas por una rampa simétrica de temperatura con 3 s de calentamiento (línea roja) y 3 s de enfriamiento (línea azul), cuyo inicio y final están indicados por los puntos rojo y azul, respectivamente. Se muestran los potenciales de acción producidos en el tiempo. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell*, mediante *current clamp* a 0 pA, sin calcio extracelular.

Al analizar la frecuencia de los potenciales de acción con respecto al tiempo (Fig. 35A) y con base en la calibración de temperatura, la frecuencia de los potenciales de acción con respecto a la temperatura (Fig. 35B), se observan cuatro comportamientos distintivos: las células 1 y 5 tienen un aumento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción aproximadamente entre 48 a 52°C, las células 2 y 3 entre 42 y 45 °C (aunque éstas células disparaban potenciales de acción incluso antes de aplicar la rampa de calor) y finalmente la célula 4 no tiene un aumento en la frecuencia de disparo, pareciera que no se activa por calor (Fig. 35).

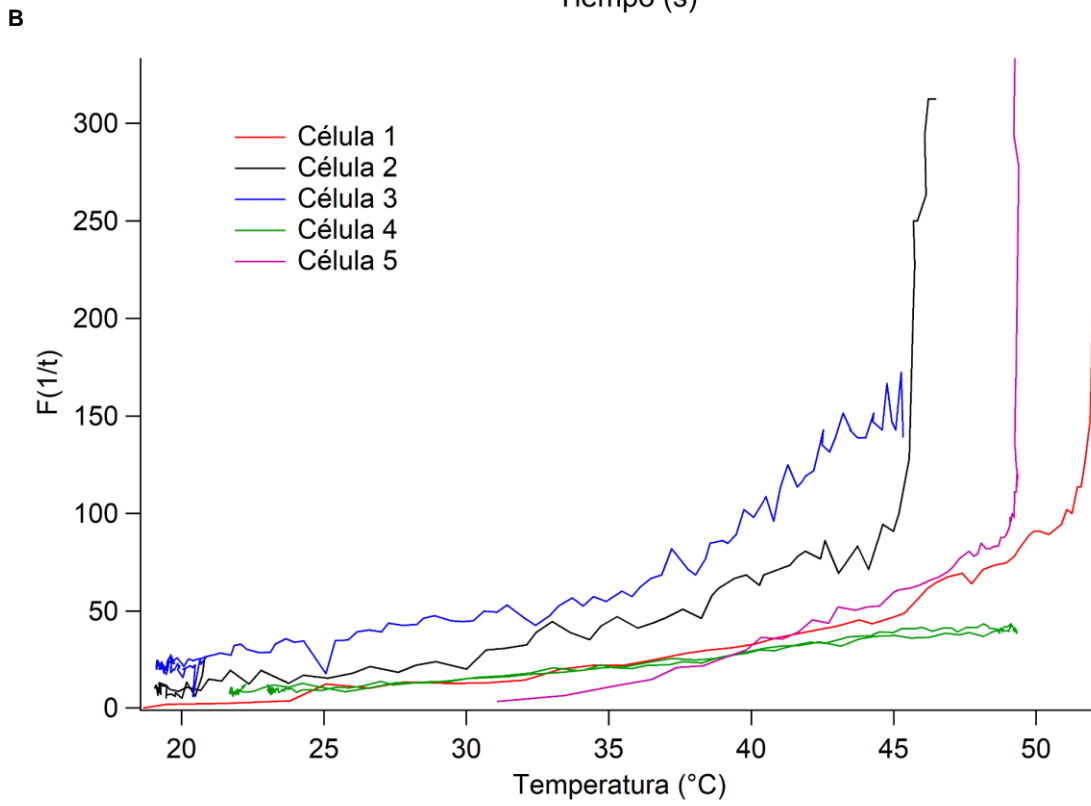
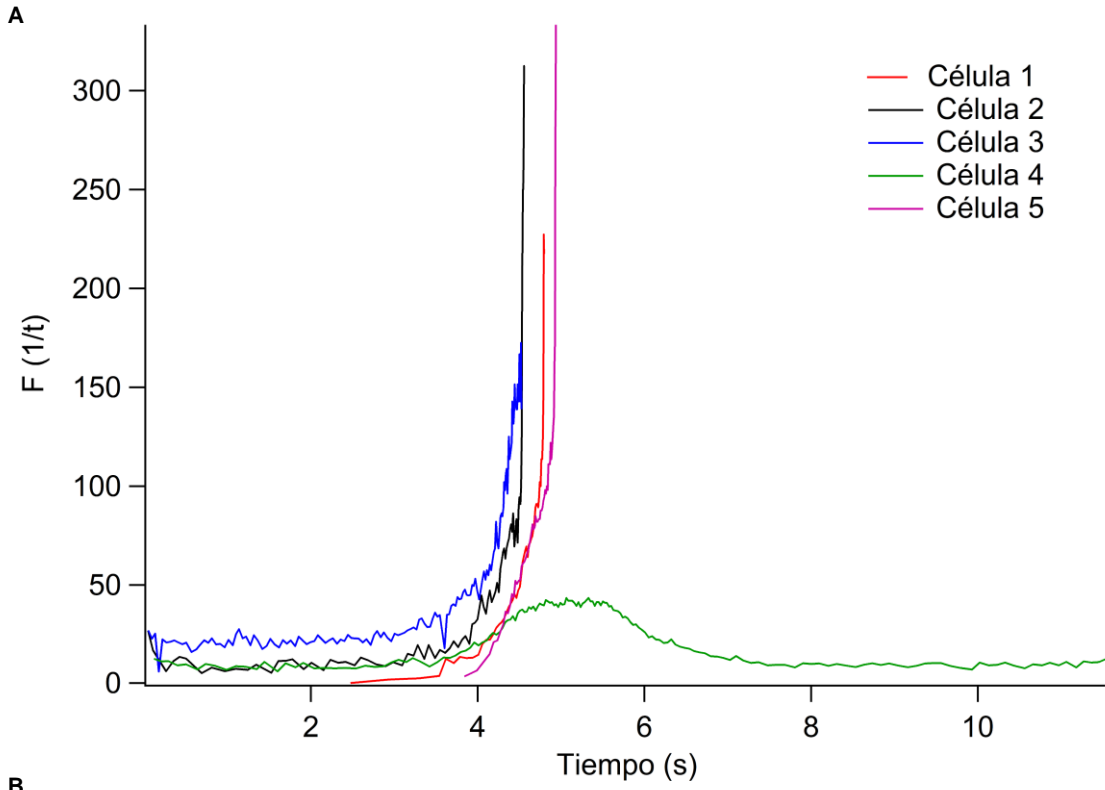


Fig. 35. Frecuencia de disparo de los potenciales de acción por temperatura en neuronas DRG del ratón C57 BL6-J TRPV1 -/- sin calcio extracelular. Se muestran las frecuencias de disparo de los potenciales de acción, donde la frecuencia se calcula como 1 sobre el intervalo de tiempo en que se producen cada dos potenciales de acción contiguos. A. Frecuencia de disparo de los potenciales de acción con respecto al tiempo en que se producen los potenciales de acción, la gráfica comienza en el punto de tiempo en que se produce el primer potencial de acción y termina hasta donde la neurona deja de disparar potenciales de acción. B. Frecuencia de disparo de los potenciales de acción con respecto a la temperatura, según los puntos de tiempo correspondientes con la calibración de temperatura.

Ahora bien, considerando la dependencia de uso o la repetición del estímulo de calor que se estudia en esta tesis, ¿qué pasa cuando las neuronas son estimuladas por segunda vez con la misma rampa de calor en el disparo de potenciales de acción? Se observó una disminución en el disparo de potenciales de acción en la mayoría de las células (3 de las 5 células registradas, las células 1, 2 y 3) (Fig. 36), lo cual parece provenir de una despolarización sostenida desde la primera rampa (parte final de la rampa) (Fig. 35), y esta respuesta disminuida se mantiene en las rampas sucesivas.

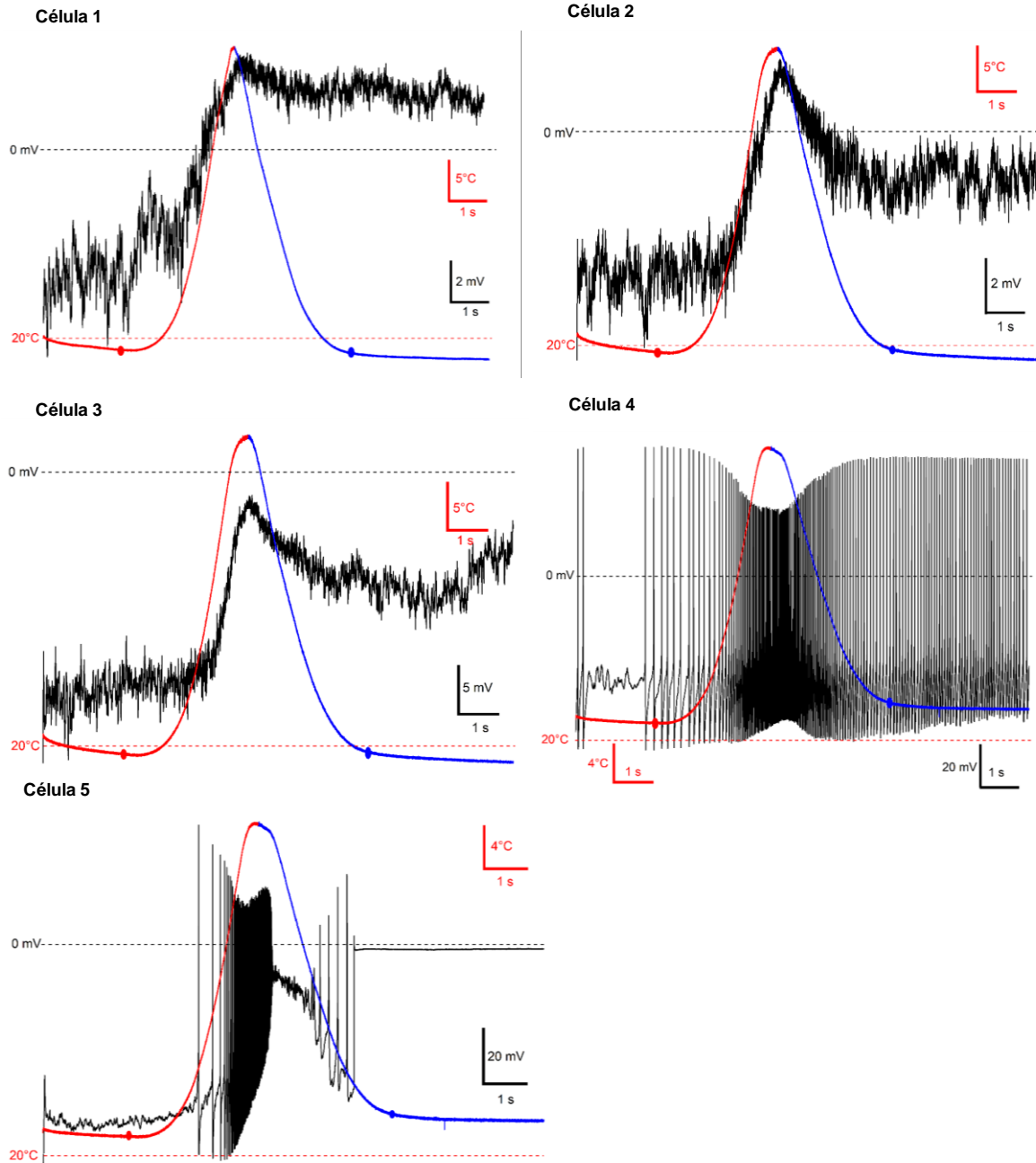


Fig. 36. Potenciales de acción producidos por una segunda rampa de temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1^{-/-}. Las cinco células mostradas en la figura anterior (fig. 35) son estimuladas por segunda vez, 30 segundos después, con la rampa simétrica de temperatura de 3 s de calentamiento (línea roja) y 3 s de enfriamiento (línea azul); cuyo inicio y final están indicados por los puntos rojo y azul, respectivamente. Se muestran los potenciales de acción producidos en el tiempo. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell*, mediante *current clamp* a 0 pA, sin calcio extracelular.

X. Ausencia de potenciales de acción por temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1-/- con calcio extracelular

Por añadidura, se probó si la respuesta a las rampas de calor cambia en presencia de calcio extracelular que es el ambiente fisiológico de la célula, con respecto a los experimentos sin calcio extracelular, y los resultados muestran que así es, en presencia de calcio extracelular prácticamente no se producen potenciales de acción por calor, sólo una de las células registradas muestra potenciales de acción por calor, sólo una de las células registradas muestra potenciales de acción por calor, sólo una de las células registradas muestra potenciales de acción por calor (célula 4) (Fig. 37).

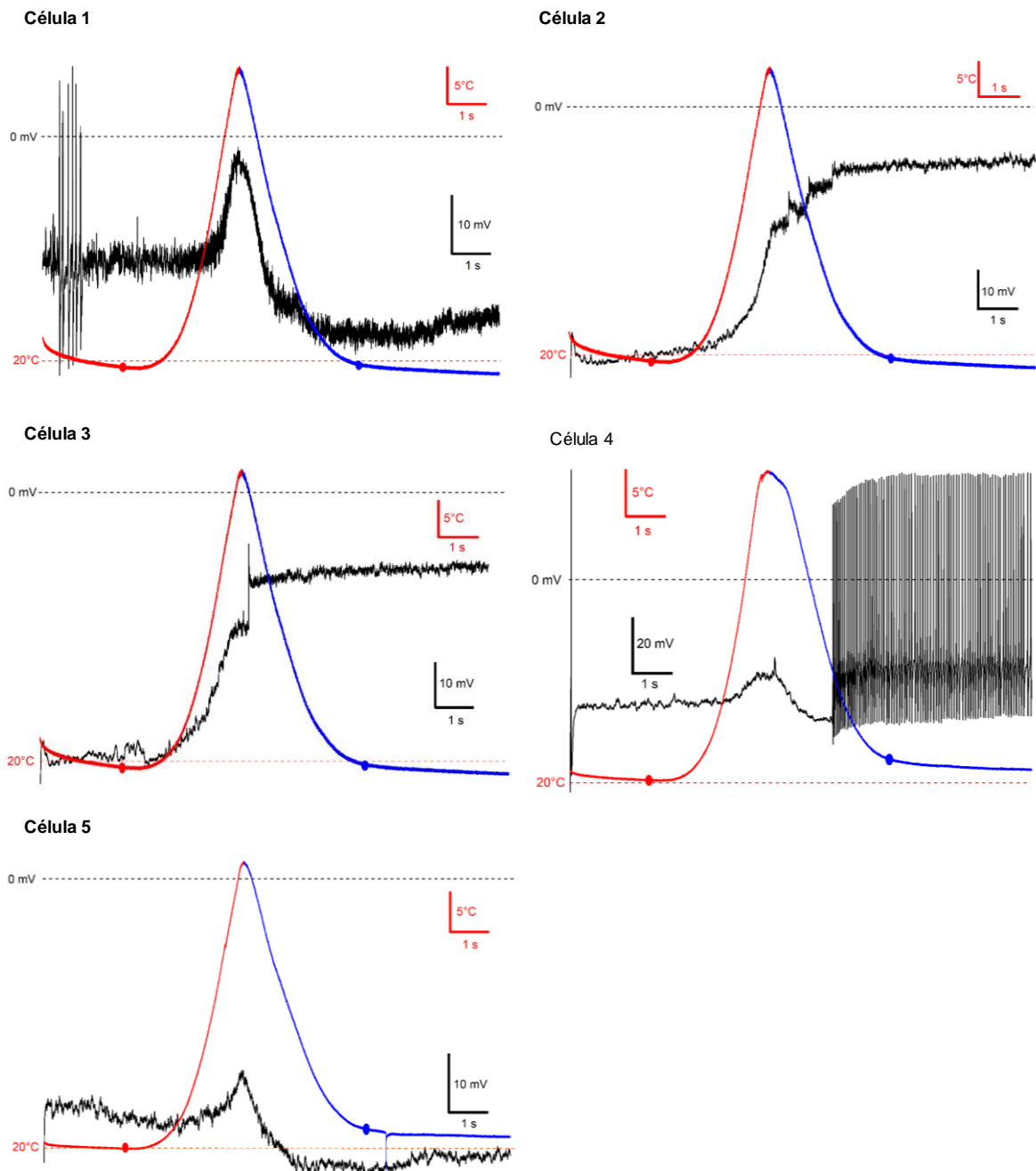


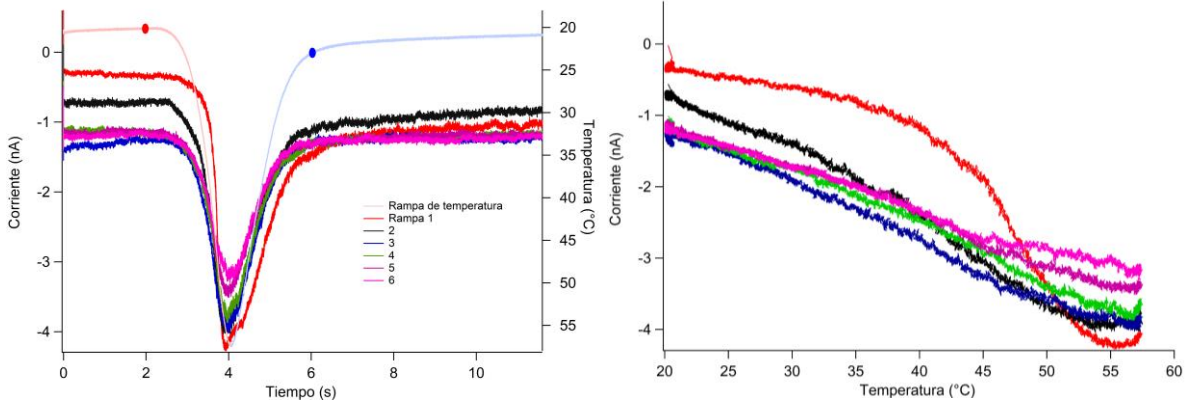
Fig. 37. Ausencia de potenciales de acción por temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón C57 BL6-J TRPV1-/- en presencia de calcio extracelular. Cinco células distintas estimuladas por una rampa simétrica de temperatura con 3 s de calentamiento (línea roja) y 3 s de enfriamiento (línea azul); cuyo inicio y final están indicados por los punto rojo y azul, respectivamente. Se muestran los potenciales de acción producidos en el tiempo. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell*, modo *current clamp* a 0 pA, con calcio extracelular.

XI. Activación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas del ratón WT C57 BL6-J

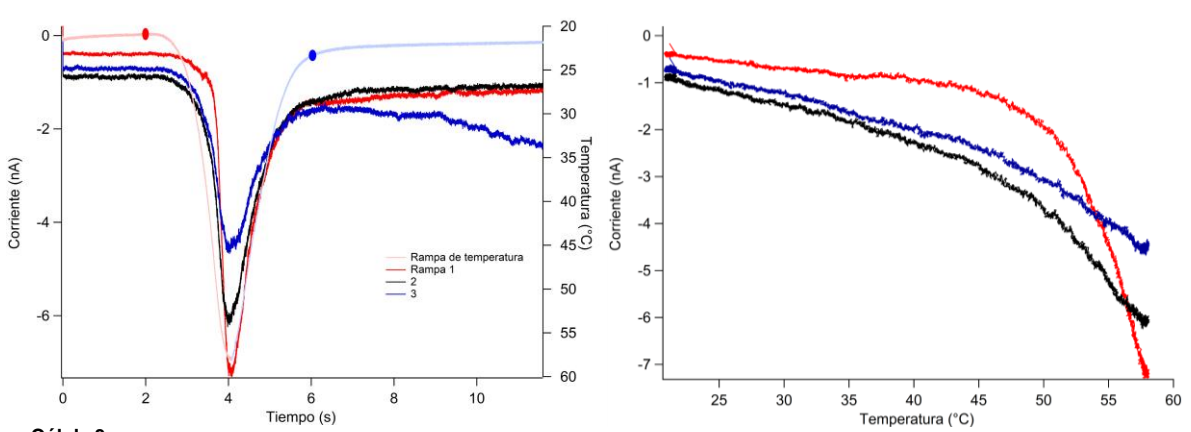
A continuación, dado que los experimentos del ratón TRPV1-/- corresponden a la cepa C57 BL6-J, los experimentos del ratón WT también deben realizarse en dicha cepa.

De esta manera, la respuesta de las neuronas DRG pequeñas del ratón WT C57 BL6-J al ser estimuladas con rampas simétricas de temperatura de 2 s de calentamiento y 2 s de enfriamiento cada 30 s, muestra que la corriente disminuye con cada estímulo (Fig. 38), es decir, se inactivan por calor como las células HEK 293 que expresan TRPV1 de forma heteróloga (Fig. 9).

Célula 1



Célula 2



Célula 3

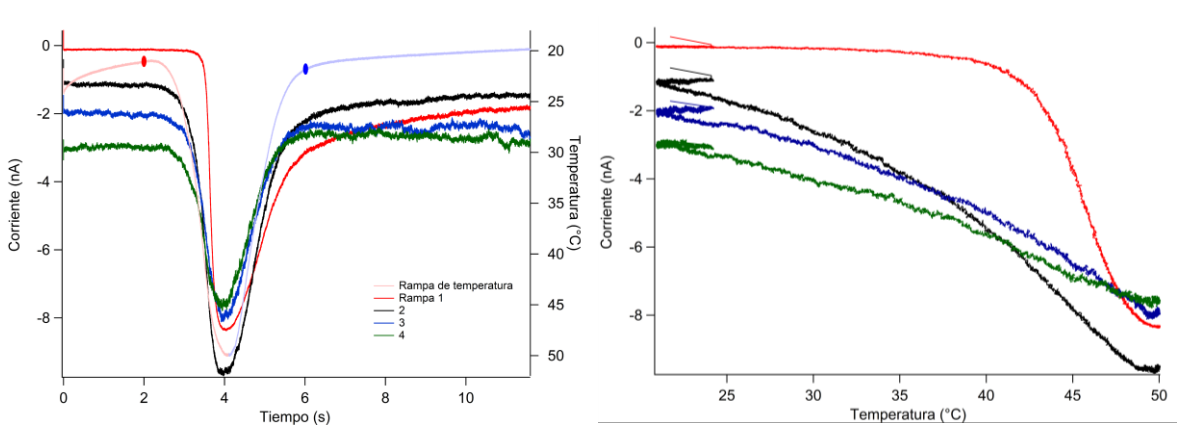


Fig. 38. Estimulación por rampas de temperatura consecutivas en neuronas DRG pequeñas de ratón WT C57 BL6-J. Tres células distintas estimuladas por una rampa de temperatura cada 30 s. La rampa simétrica de temperatura tiene 2 s de calentamiento (línea roja tenue) y 2 s de enfriamiento (línea azul tenue); cuyo inicio y final están indicados por los puntos rojo y azul, respectivamente. En el lado izquierdo se muestra la respuesta en corriente de las células a las rampas de temperatura en cada punto de tiempo; y en el lado derecho las curvas corriente vs. temperatura de cada célula, según la relación con la rampa de calibración de temperatura, donde solo se toma en cuenta la fase de calentamiento de la rampa de temperatura. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell*, con *voltage clamp* a -60 mV, sin calcio extracelular.

La corriente obtenida de cada rampa normalizada con respecto a la corriente de la primera rampa o corriente máxima (I_{max}), muestra que se pierde alrededor de la mitad de la corriente al aplicar las rampas sucesivas (Fig. 39).

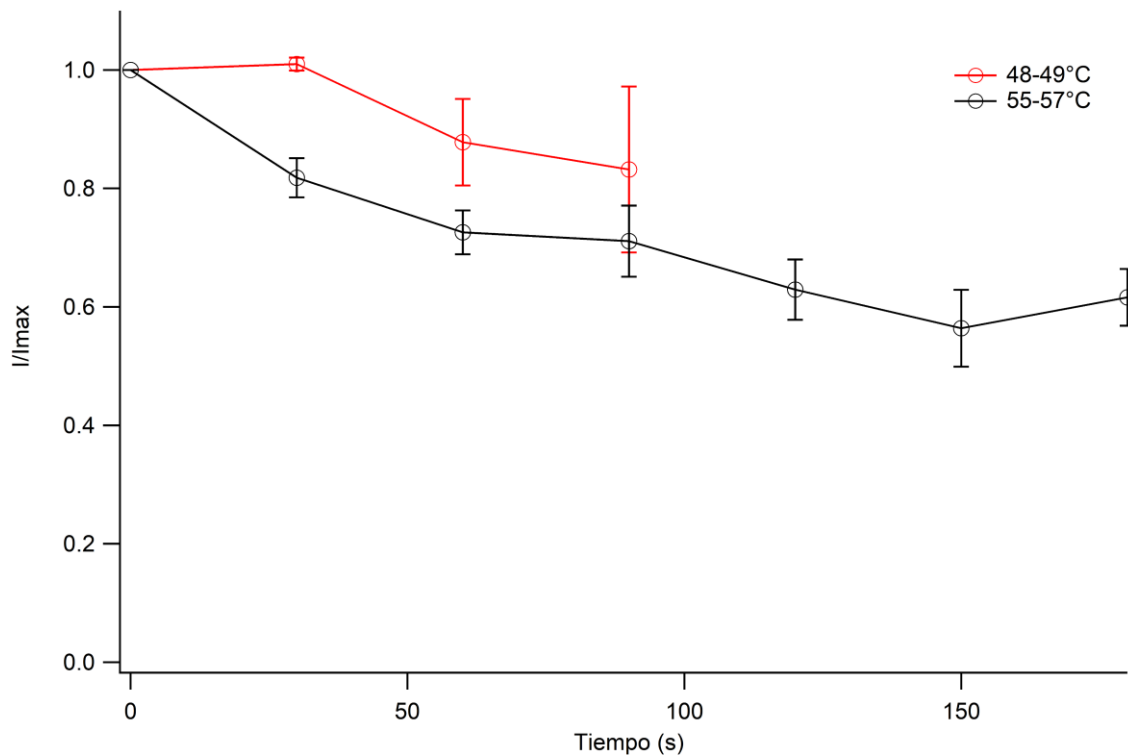


Fig. 39. Corriente normalizada de las neuronas activadas por temperatura del ratón WT C57 BL6-J. Se muestra el cociente de la corriente de cada una de las rampas sobre la corriente máxima (I_{max}) o la corriente de la primera rampa, en cada punto de tiempo con su respectiva barra de error estándar. La línea roja muestra los experimentos realizados con rampas de calor que alcanzan de 48-49°C, es un promedio de 3 experimentos. La línea negra muestra los experimentos realizados con rampas de calor que alcanzan de 55-57°C, es un promedio de siete experimentos.

Y se calcularon las entalpías de activación por temperatura correspondientes, donde se observa que la entalpía disminuye en el tiempo con respecto a las rampas sucesivas de calor, hasta que se parece a la entalpía de la corriente de fuga (Fig. 40), lo cual sucede también con las entalpías de activación por temperatura cuando se expresa TRPV1 de manera heteróloga, si bien la entalpía inicial no es tan alta como se ha observado en TRPV1.

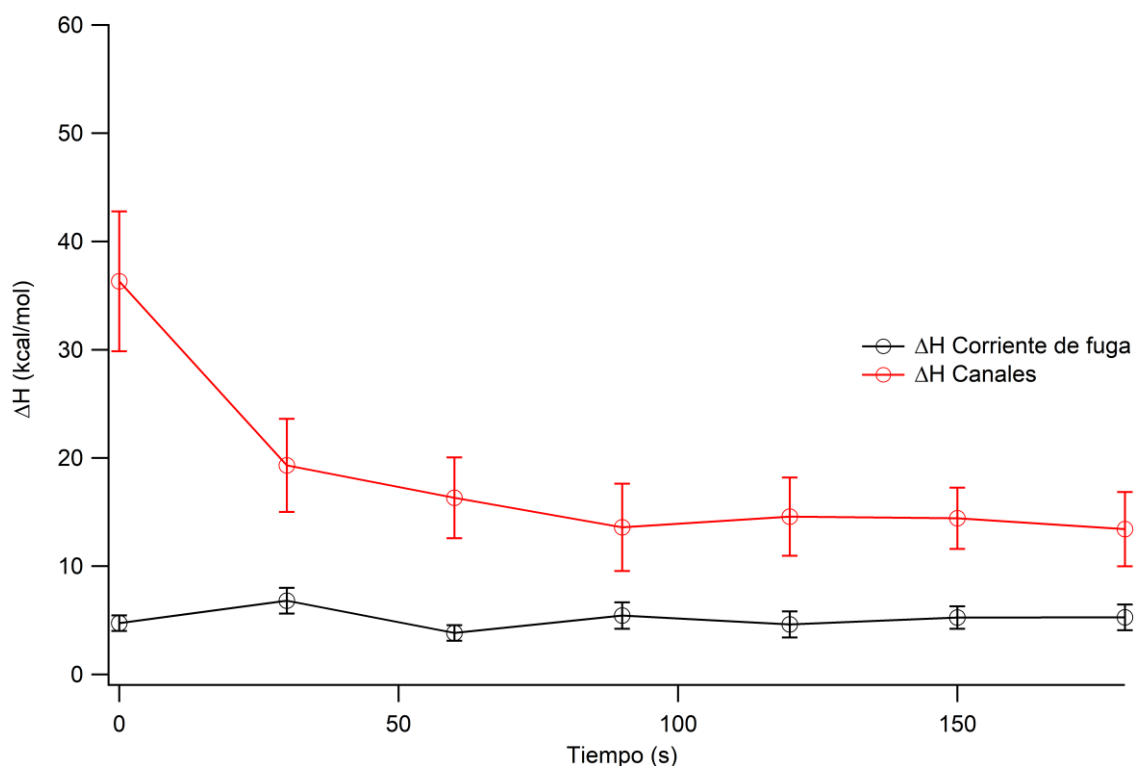


Fig. 40. Entalpía de activación por temperatura de los experimentos realizados en neuronas DRG del ratón WT C57 BL6-J. Se muestran las entalpías correspondientes a la corriente de fuga y de los canales. Cada punto representa el promedio de las entalpías con su error estándar de cada una de las rampas en ese punto de tiempo. Es un promedio de diez experimentos.

XII. Potenciales de acción por temperatura de neuronas DRG pequeñas del ratón WT C57 BL6-J

Posteriormente, se comprobó el disparo de potenciales de acción por calor en las neuronas DRG del ratón WT C57 BL6-J sin calcio extracelular, como un control positivo del disparo de potenciales de acción por calor de las neuronas del ratón TRPV1 $-/-$. Como se esperaba, las neuronas responden con potenciales de acción cuando son estimuladas por calor, si bien, como en las neuronas del ratón TRPV1 $-/-$ tienen comportamientos distintos (Fig. 41).

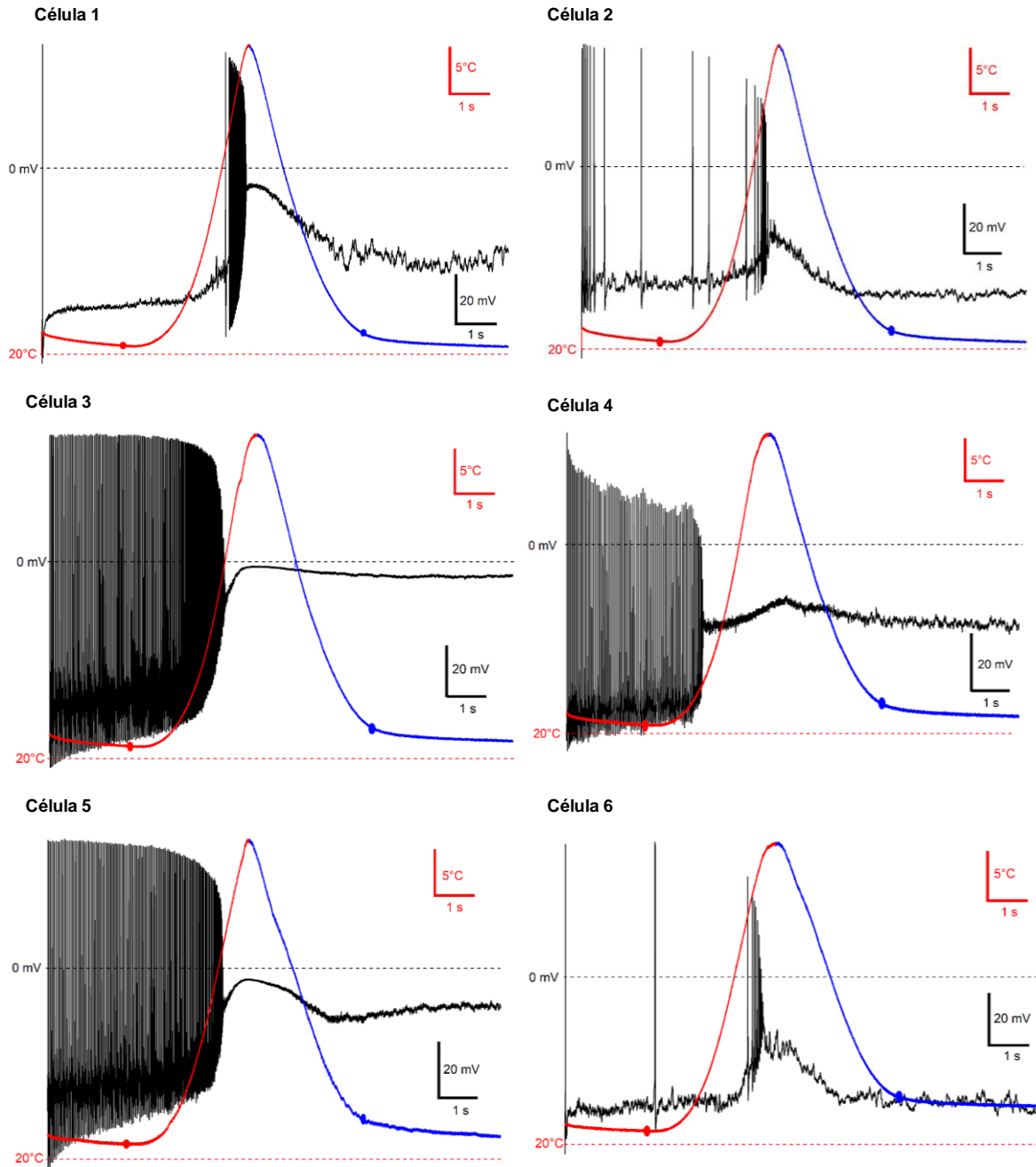


Fig. 41. Potenciales de acción producidos por temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón WT C57 BL6-J. Seis células distintas estimuladas por una rampa simétrica de temperatura con 3 s de calentamiento (línea roja) y 3 s de enfriamiento (línea azul); cuyo inicio y final están indicados por los puntos rojo y azul, respectivamente. Se muestran los potenciales de acción producidos en el tiempo. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell*, mediante *current clamp* a 0 pA, sin calcio extracelular.

Al analizar la frecuencia de disparo de los potenciales de acción con respecto al tiempo (Fig. 42A) y con base en la calibración de temperatura, la frecuencia de

disparo de los potenciales de acción con respecto a la temperatura (Fig. 42B), se observaron tres tipos de respuestas distintas: algunas neuronas tienen un aumento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción alrededor de 43°C (las células 1, 2 y 6), otras células tienen un aumento en la frecuencia de disparo alrededor de 37°C (células 3 y 5) y una más no parece responder a calor (célula 4) (Fig. 42).

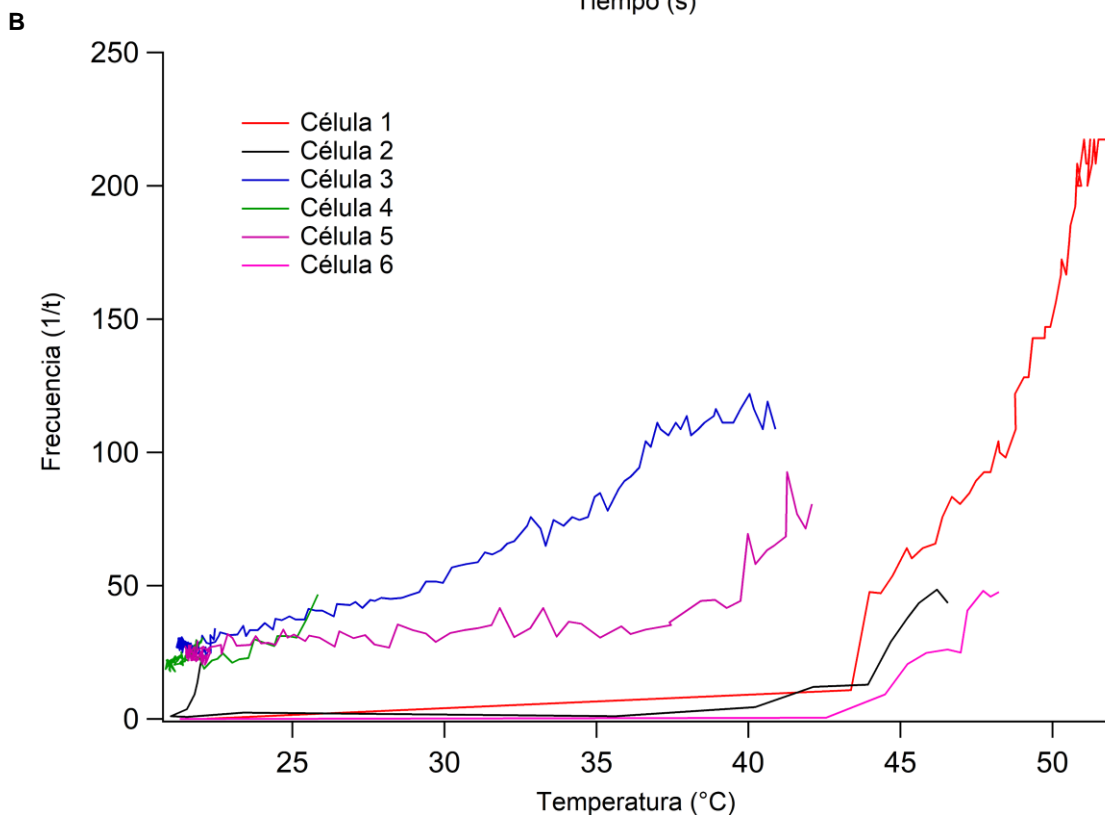
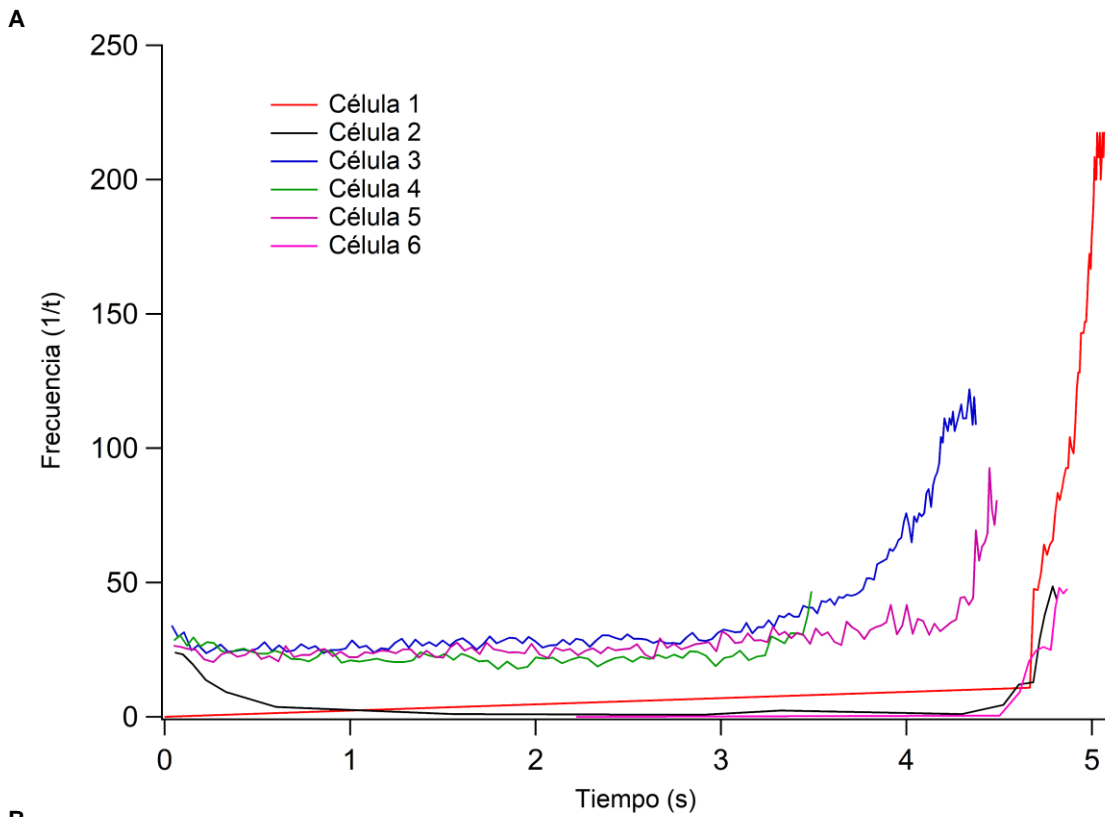


Fig. 42. Frecuencia de disparo de los potenciales de acción por temperatura en neuronas DRG del ratón WT C57 BL6-J sin calcio extracelular. Se muestran las frecuencias de disparo de los potenciales de acción, donde la frecuencia se calcula como 1 sobre el intervalo de tiempo en que se producen cada dos potenciales de acción contiguos. A. Frecuencia de disparo de los potenciales de acción con respecto al tiempo en que se producen los potenciales de acción, la gráfica comienza en el punto de tiempo en que se produce el primer potencial de acción y termina hasta donde la neurona deja de disparar potenciales de acción. B. Frecuencia de disparo de los potenciales de acción con respecto a la temperatura, según los puntos de tiempo correspondientes con la calibración de temperatura.

Luego, con respecto a la dependencia de uso en los potenciales de acción producidos por calor, al aplicar una segunda rampa de calor 30 s después, 3 de las neuronas registradas no producen potenciales de acción (células 2, 3 y 5), 2 producen potenciales de acción en menor cantidad (células 4 y 6) y una neurona parece responder igual que cuando se aplicó la primera rampa (célula 1); es decir, se puede concluir que las neuronas responden con una disminución en el disparo de potenciales de acción como en el ratón TRPV1-/- (Fig. 43).

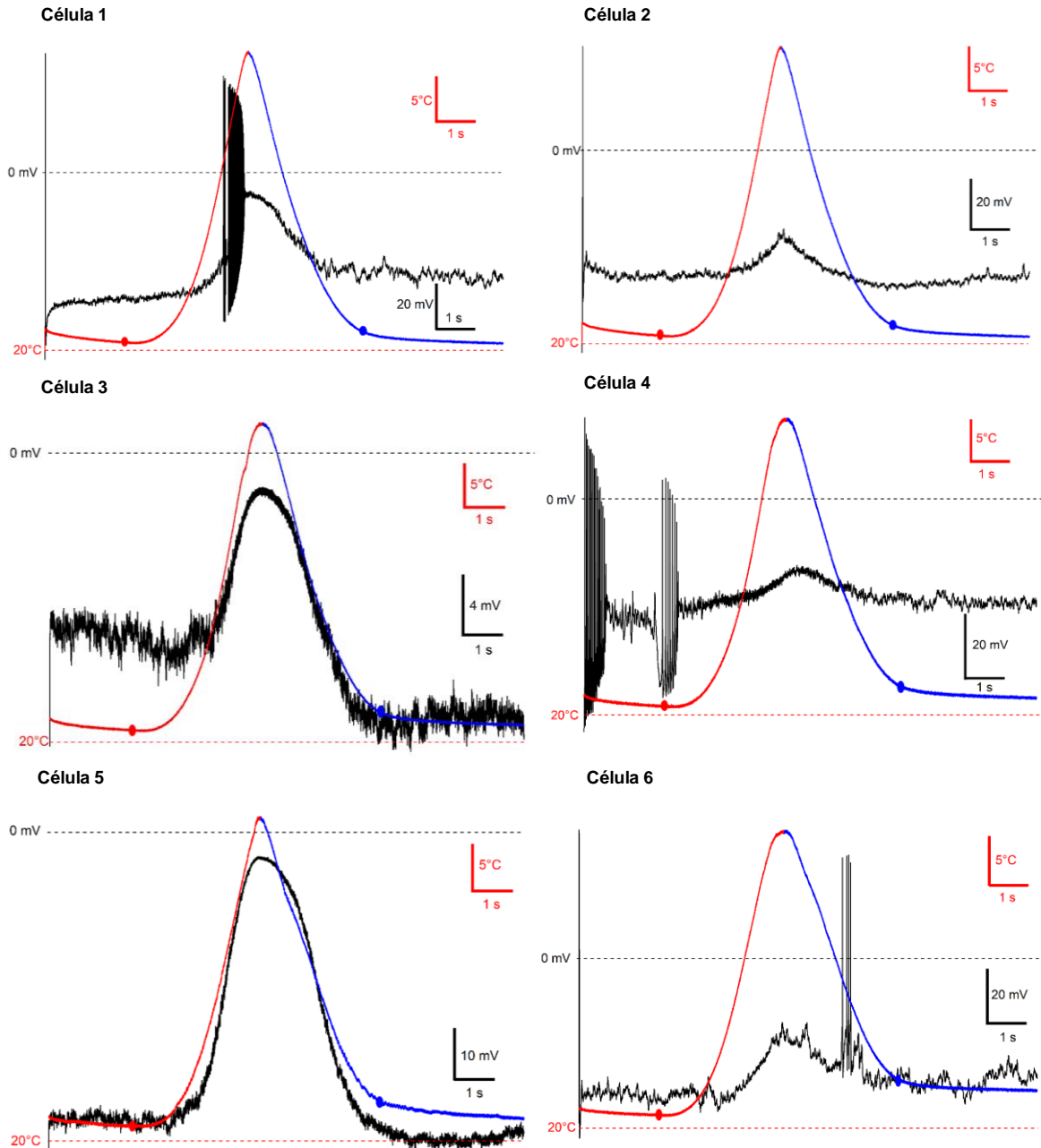


Fig. 43. Potenciales de acción producidos por una segunda rampa de temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón WT C57 BL6-J sin calcio extracelular. Las seis células mostradas en la figura anterior (fig. 42) son estimuladas por segunda vez, 30 s después, con la rampa simétrica de temperatura de 3 s de calentamiento (línea roja) y 3 s de enfriamiento (línea azul); cuyo inicio y final están indicados por los puntos rojo y azul, respectivamente. Se muestran los potenciales de acción producidos en el tiempo. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell* mediante *current clamp* a 0 pA sin calcio extracelular.

XIII. Ausencia de potenciales de acción por temperatura de neuronas DRG pequeñas del ratón WT C57 BL6-J con calcio extracelular

Con respecto a los potenciales de acción por calor en presencia de calcio extracelular, las neuronas DRG del ratón WT muestran una respuesta prácticamente nula (Fig. 43), puesto que no producen potenciales de acción (células 2, 3, 5 y 6), o bien producen potenciales de acción cuando la rampa de temperatura no está en la fase de calentamiento (células 1 y 4); lo cual es similar a lo observado en el ratón TRPV1^{-/-}.

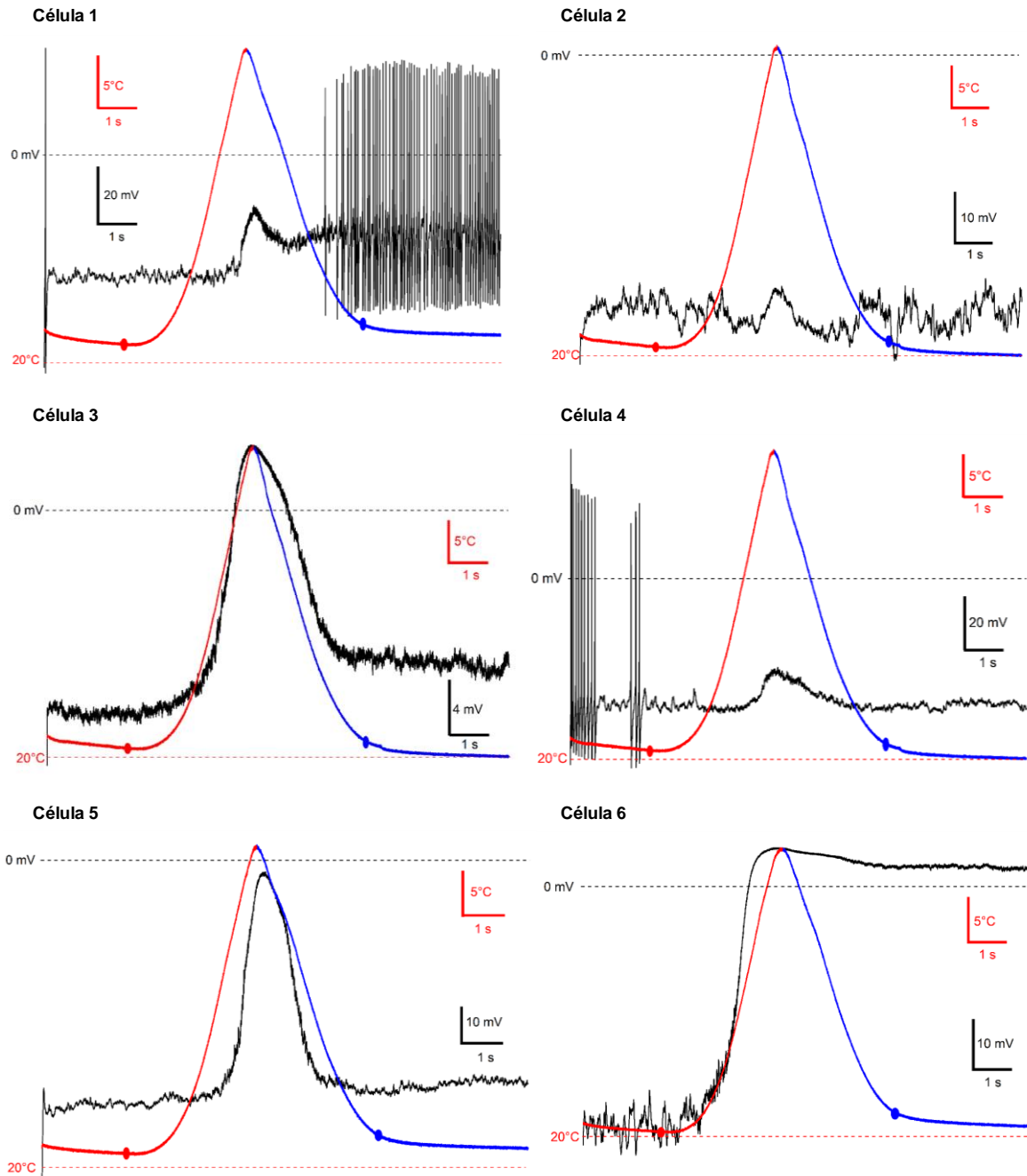


Fig. 43. Ausencia de potenciales de acción por temperatura en neuronas DRG pequeñas de ratón WT C57 BL6-J con calcio extracelular. Seis células distintas estimuladas por una rampa simétrica de temperatura con 3 s de calentamiento (línea roja) y 3 s de enfriamiento (línea azul); cuyo inicio y final están indicados por los puntos rojo y azul, respectivamente. Se muestran los potenciales de acción producidos en el tiempo. Las células fueron registradas en configuración *whole-cell*, en modo *current clamp* a 0 pA, con calcio extracelular.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) son una población heterogénea de células, en la que se pueden distinguir neuronas de tamaño grande, mediano y pequeño (Fig. 17, Fig. 18), de las cuales, las neuronas de aproximadamente 20 μm o las neuronas pequeñas que responden a capsaicina (Fig. 18), son las neuronas que fueron registradas en esta tesis, puesto que expresan el canal iónico de interés, TRPV1.

Las neuronas DRG pequeñas presentan corriente entrante al aplicar una serie de pulsos de voltaje (Fig. 19) y producen potenciales de acción al aplicar una serie progresiva de pulsos de corriente (Fig. 20). También, producen potenciales de acción por capsaicina 4 μM (Fig. 21), pero más fácilmente con una concentración menor de capsaicina de 1 μM y en ausencia de calcio extracelular (Fig. 25).

Sin embargo, las neuronas DRG pequeñas activadas por capsaicina se pueden identificar de mejor manera al registrar corrientes mediante fijación de voltaje o *voltage clamp*, donde la corriente activada por capsaicina registrada es mayor a 1 nA (Fig. 22, Fig. 23) y se puede notar que se desensibiliza más rápido en presencia de calcio extracelular (Fig. 23, Fig. 24).

Ahora bien, con respecto a la hipótesis de trabajo de esta tesis, que consiste en conocer si existe inactivación por temperatura de TRPV1 en las neuronas DRG, cuando se estimula a las neuronas DRG pequeñas del ratón WT C57 BL6-J con rampas de temperatura consecutivas, éstas se comportan igual a las células HEK 293 que expresan TRPV1 de manera heteróloga, puesto que en ambas la corriente activada por calor disminuye en el tiempo (Sánchez-Moreno, et al., 2018) (Fig. 38, Fig. 39); es decir, las neuronas DRG pequeñas donde se expresa TRPV1 de manera endógena, puesto que corresponden al tamaño y la forma de las neuronas que responden a capsaicina (Fig. 22, Fig. 23), también se inactivan por calor. Este fenómeno ya se había observado antes (Fig. 8), pero no se había investigado como un fenómeno propio del canal iónico TRPV1.

Lo anterior se sustenta, además, mediante la corriente activada por temperatura de las neuronas del ratón knock-out de TRPV1 (TRPV1^{-/-}), cuya respuesta en corriente a las rampas de calor es muy pequeña (muy parecida a la corriente de fuga) (Fig. 31) comparada con las neuronas del ratón WT, por lo que los resultados sugieren que TRPV1 contribuye mayoritariamente a la corriente activada por temperatura en las neuronas DRG pequeñas, y ésta se inactiva.

No obstante, a diferencia de las neuronas del ratón de la cepa C57 BL6-J, en las neuronas DRG pequeñas del ratón CD1 la corriente activada por temperatura aumenta o se potencia al aplicar las rampas de calor consecutivas (Fig. 26, Fig. 27).

Lo cual puede estar relacionado con la heterogeneidad de las neuronas DRG pequeñas de tipo C que son las que se registran en esta tesis (Fig. 18), pues hay algunas neuronas polimodales, otras que sólo responden a calor, otras que responden a frío y otras más que no responden a calor (Basbaum, et al., 2009). Aunado a que se realizó un número de experimentos pequeño, puesto que los ratones CD1 se emplearon sólo en la fase de estandarización de esta tesis, y estrictamente no fueron tomados en cuenta para probar la hipótesis de trabajo.

Con respecto al cálculo de entalpías de activación por temperatura, si bien en las neuronas del ratón CD1 la corriente aumenta al aplicar las rampas de calor sucesivas, su entalpía disminuye con cada rampa hasta que se parece a la entalpía de la corriente de fuga (Fig. 29), aunque se haya alcanzado la corriente máxima en las rampas de calor.

En ese mismo punto, extrañamente las entalpías de activación por temperatura son bajas en ambas cepas del ratón WT (Fig. 29, Fig. 40), comparadas con las entalpías que corresponden a TRPV1 expresado de manera heteróloga (Baez et al., 2014). Esto se puede deber a la contribución de los demás canales activados por temperatura como TRPV2, TRPA1, TRPV3 (Baez et al., 2014), que se expresan en las neuronas DRG a la entalpía global de la célula completa, si bien TRPV1 es el canal que más contribuye a la corriente activada por temperatura.

En cuanto al disparo de potenciales de acción por temperatura, con base en la corriente activada por temperatura de las neuronas del ratón TRPV1^{-/-}, se esperaría que estas neuronas no produjeran muchos potenciales de acción al ser estimuladas por calor. Sin embargo, dichas neuronas producen potenciales de acción de manera robusta (Fig. 34), muy similar a las neuronas del ratón WT en ausencia de calcio extracelular (Fig. 41). Esto podría dar cuenta del hecho de que en el ratón TRPV1^{-/-} la respuesta a calor no se ve afectada en los ensayos de conducta (Vriens et al., 2014).

Muy interesantemente, en estos experimentos se pueden observar tres comportamientos distintivos que corresponderían a tres subpoblaciones de neuronas DRG pequeñas: algunas neuronas responden alrededor de 35°C, otras responden a más de 42°C y otras que no responden a calor (Fig. 42). Aunque es importante mencionar que fue una n pequeña, si se toma en cuenta que el número de células que se registran para observar patrones de disparo de potenciales de acción es mayor, pero fue consistente en las neuronas del ratón WT y TRPV1^{-/-}.

Al considerar la dependencia de uso o la repetición del estímulo de temperatura en el disparo de potenciales de acción, tanto en el ratón TRPV1^{-/-} como el ratón WT la respuesta disminuye en la segunda rampa (Fig. 36, Fig. 43). Sin embargo, aquí es

muy importante considerar el período refractario de la neurona sensorial, así como los fenómenos de adaptación de éstas (Purves et al., 2012), comparado con los 30 s de lapso entre rampas de temperatura que se emplearon en este trabajo. Aunque en el caso del ratón WT, la inactivación que se observa en la disminución de corriente en el tiempo presumiblemente debido a TRPV1, podría estar afectando el disparo de potenciales de acción al repetir el estímulo de temperatura.

En presencia de calcio extracelular, las neuronas del ratón TRPV1^{-/-} y las neuronas del ratón WT no producen potenciales de acción (Fig. 37, Fig. 44), lo cual sugiere un papel muy importante del calcio, que finalmente se encuentra de manera fisiológica en el ambiente de la neurona. Podría estar modulando a los canales de sodio, que son los que producen los potenciales de acción en las neuronas DRG (Basbaum et al., 2014). Aunque, son los experimentos sin calcio extracelular los que se toman en cuenta en esta tesis, debido al fenómeno de desensibilización por calcio de TRPV1 (Fig. 22, Fig. 24), que podría interferir con la inactivación por calor.

Finalmente, en un panorama global, TRPV1 jugaría un papel de freno en la activación por temperatura cuando el estímulo de temperatura se prolongue en el tiempo, o bien cuando sea aplicado repetidamente con un período de entre pulsos, dando cuenta así de un fenómeno de adaptación de las neuronas sensibles a temperatura como el de otras neuronas sensoriales que responden a estímulos de olor, sonido, entre otros.

REFERENCIAS

- Baez, D., Raddatz, N., Ferreira, G., Gonzalez, C., Latorre, R. (2014). Gating of thermally activated channels. *Current Topics in Membranes*, 74, 51-87.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139 (2), 267-284.
- Calixto, J. B., Kassuya, C. A. L., André, E., Ferreira, J. (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics*, 106, 179-208.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398, 436-441.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J.D., Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389 (23), 816-824.
- Chowdhury, S., Jarecki, B. W., Chanda, B. (2014). A molecular framework for temperature-dependent gating of ion channels. *Cell*, 158, 1148-1158.
- Cohen, M. R., Moiseenkova-Bell, V. Y. (2014). Structure of thermally activated TRP channels. *Current Topics in Membranes*, 74, 181-211.
- Dhaka, A., Viswanath, V., Patapoutian, A. (2006). TRP ion channels and temperature sensation. *The Annual Review of Neuroscience*, 29, 135-161.
- Islas, L. D., De-la-Rosa, V., Rodríguez-Cortés, B., Rangel-Yescas, G. E., Elias-Viñas, D. (2015). A simple method for fast temperature changes and its application to thermal activation of TRPV1 ion channels. *Journal of Neuroscience Methods*, 243, 120-125.
- Jara-Oseguera, A., Islas, L. (2013). The role of allosteric coupling on thermal activation of thermo-TRP channels. *Biophysical Journal*, 104, 2160-2169.
- Koplas, P. A., Rosenberg, R. L., Oxford, G. S. (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience*, 17 (10), 3525-3537.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., Cheng Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504, 107-112.
- Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*, 54, 905-918.
- Malin, S. A., Davis, B. M., Molliver, D. C. (2007). Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nature Protocols*, 2 (1), 152-160.

- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., Viswanath, V. (2003). Thermotrp channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 529-539.
- Planelles-Cases, R., Valente, P., Ferrer-Montiel, A., Qin, F., Szallasi, A. (2011). Complex regulation of TRPV1 and related Thermo-TRPs: implications for therapeutic intervention. Islam, M. S. (Ed.). *Transient receptor potential channels, advances in experimental medicine and biology*. USA: Springer Science-Business Media B.V. Chapter 27.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A., White, W. E. (Ed). (2012). *Neuroscience* (5th edition). USA: Sinauer Associates, Inc.
- Randall, D., Burggren, W., French, K. (2001). *Eckert animal physiology: mechanism and adaptations* (5th edition). USA: W.H. Freeman and Company.
- Rosenbaum, T., Simon, S. A. (2007). TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades. Liedtke, W. B., Heller, S. (Eds.). *TRPV1 receptors and signal transduction*. USA: CRC Press. Chapter 5.
- Sanchez-Moreno, A., Guevara-Hernández, E., Contreras-Cervera, R., Rangel-Yescas, G., Ladrón-de-Guevara, E., Rosenbaum, T., Islas, L. D. (2018). Irreversible temperature gating in trpv1 sheds light on channel activation. *eLife*, 7, e36372.
- Schwarz, S., Greffrath, W., Busselberg, D., Treede, R. (2000). Inactivation and tachyphylaxis of heat evoked inward currents in nociceptive primary sensory neurons of rats. *Journal of Physiology*, 528 (3), 539-549.
- Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., et al. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21, 531-543.
- Veitinger, S. (2011). The patch-clamp technique. Obtenido el 11 de febrero de 2017 de <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>
- Volkers, L., Mechioukhi, Y., Coste, B. (2015). Piezo channels: from structure to function. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 467, 95-99.
- Vriens, J., Nilius, B., Voets, T. (2014). Peripheral thermosensation in mammals. *Nature reviews, Neuroscience*, 15, 573-589.
- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S., Stab, J., Chen, X. et al. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron*, 70, 482-494.
- Vyklický, L., Vlachová, V., Vitásková, Z., Dittert, I., Kabát, M., Orkand, R. K. (1999). Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurons in the rat. *Journal of Physiology*, 517 (1), 181-192.
- Winter, Z., Buhala, A., Ötvös, F., Jósvay, K., Vizler, C., Dombi, G., Szakonyi, G., Oláh, Z. (2013). Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential

vanilloid 1 (TRPV1) ion channel, an overview of the current mutational data. *Molecular Pain*, 9 (30).

Yarmolinsky, D., Peng, Y., Pogorzala, L., Rutlin, M., Hoon, M. Zuker, C. (2016). Coding and plasticity in the mammalian thermosensory system. *Neuron*, 92, 1-14.