



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Mecanismo Molecular que regula la
respuesta al dolor asociada al canal
TRPV1 por efecto de la Testosterona”.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Óscar Enciso Pablo



DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Sara Luz Morales Lázaro

Los Reyes Iztacala, Edo de México 2021



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 Institucionales.

Investigación realizada gracias al financiamiento del Programa de la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGPA)-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IA202717 y No.IN206819.

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

Agradecimientos Formales.

Al comité asesor integrado por Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, Dr. José Alejandro Sandoval Romero, Dr. Hugo Virgilio Perales Vela y Dr. Jaime Barral Caballero por sus observaciones y apoyo a este trabajo.

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

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

Al laboratorista Félix Sierra Ramírez por su apoyo técnico.

A la M.V.Z. Claudia V. Rivera Cerecedo y al Dr. Héctor Alfonso Malagón Rivero por su apoyo con el mantenimiento y manipulación de animales (Unidad de Bioterio del Instituto de Fisiología, UNAM).

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

Agradecimientos personales.

A mis padres, Roselia y Jesús. Gracias por haberme cuidado y guiado hasta aquí, por confiar aun en los momentos difíciles, enseñarme lo que es importante y nunca dejarme solo. Gracias por todo el esfuerzo, su cariño y compañía. Son las personas más hermosas, todo lo bueno que hay en mi se los debo a ustedes. Los amo.

A mis hermanas, Estefany y Verónica. Gracias por su enorme paciencia conmigo y su cariño, por todos los buenos momentos y su apoyo. Prometo estar siempre para ustedes y cuidarlas. Las quiero mucho.

A Blanca. Gracias por estar conmigo, por dejarme crecer a tu lado y todas las cosas buenas que me enseñas. Haces de mí una mejor persona. No hay nada en el mundo tan especial como tú. Te quiero.

A Elizabeth, mi mejor amiga y bióloga preferida. Gracias por tus buenos consejos, los libros, las buenas conversaciones y todo el apoyo.

A mis amigos Esteban, Jorge, Aritzel, Karina, Diego y Álvaro. Gracias por todo lo que me enseñaron, dentro y fuera de la carrera y por hacer de esta una de las mejores etapas de mi vida. Todos ustedes forman parte de mí. Los quiero.

A la Dra. Sara. Le agradezco la oportunidad y la confianza que me brindo para formar parte del laboratorio. Gracias por todas sus enseñanzas, consejos, paciencia y el tiempo dedicado.

A mis compañeras de laboratorio, Rebeca y Angelica por su apoyo, consejos y ayuda para seguir mejorando mi formación.

Índice

Resumen	1
Abreviaturas	2
1. Introducción	4
1.1 Nocicepción.....	4
1.2 Receptores de Potencial Transitorio (TRP).....	5
1.3 Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide tipo 1 (TRPV1).	7
1.4 Modulación del canal TRPV1 por hormonas sexuales.	10
1.5 Testosterona y el Receptor de Andrógenos.....	12
2. Hipótesis	16
3. Objetivo General.....	16
3.1 Objetivos Particulares	16
4. Materiales y métodos	17
4.1 Animales.....	17
4.2 Ensayos conductuales de dolor nociceptivo.	17
4.3 Obtención de DRG y cultivo primario.....	18
4.4 Tratamiento de Testosterona	19
4.5 Obtención de proteína y cuantificación.....	20
4.6 Western Blot	21
4.7 Extracción de ARN	25
4.8 RT-PCR semicuantitativa	26
4.8.1 Transcripción reversa (RT).....	26
4.8.2 PCR-semicuantitativa	27
4.9 Análisis <i>In silico</i>	29
4.10 Análisis estadístico	30
5. Resultados.....	31
5.1 Efectos de la testosterona en la respuesta de dolor agudo.....	31
5.2 Respuesta de dolor a capsaicina en ratones pretratados con testosterona.....	33
5.3 Detección de la expresión del receptor de andrógenos en cultivos primarios de neuronas DRG.....	34

5.4 Determinación de los niveles de ARNm de TRPV1 en neuronas DRG tratadas con testosterona.....	35
5.5 Determinación de los niveles de proteína TRPV1 en neuronas DRG tratadas con testosterona.....	36
5.6 Determinación de posibles sitios de interacción para el Receptor de Andrógenos en la región 5' del gen TRPV1.....	38
6. Discusión.....	40
7. Conclusiones.....	47
8. Perspectivas.....	48
9. Referencias.....	49

Resumen

El receptor vaniloide tipo 1 (TRPV1) es un canal catiónico no selectivo que puede activarse en respuesta a estímulos térmicos y químicos. Esta capacidad le permite actuar como un sensor para la detección de aquellos estímulos que puedan ser potencialmente dañinos, que finalmente generan una sensación dolor. El papel fundamental de este canal en la nocicepción y su relación con procesos de dolor crónico lo convierten en un blanco molecular para la búsqueda de alternativas terapéuticas que disminuyan el dolor asociado a su activación. Algunos compuestos esteroideos, incluyendo a la testosterona, han demostrado tener la capacidad de modificar la actividad de algunos canales TRP. De manera general, se reconoce que esta hormona actúa a través del Receptor de Andrógenos, un factor de transcripción que modifica la expresión de genes específicos, además, la testosterona puede activar múltiples vías de señalización y desencadenar respuestas celulares en intervalos de tiempo que pueden ocurrir en segundos. Sin embargo, el mecanismo por el cuál la testosterona ejerce sus efectos sobre TRPV1 no ha sido descrito. Debido a esto, el objetivo de este proyecto fue determinar el posible mecanismo molecular por el cual la testosterona regula el dolor mediado por el canal TRPV1. Inicialmente se realizaron ensayos de conducta que permitieron determinar los efectos agudos de esta hormona. Los datos obtenidos mostraron que la administración de testosterona produce una respuesta de dolor mediada por el canal. Posteriormente, el efecto crónico se evaluó con la respuesta de dolor de ratones pretratados con testosterona al agonista de TRPV1 (capsaicina), los cuales presentaron una respuesta exacerbada de dolor con respecto a los controles. Se determinó que el Receptor de Andrógenos se expresa en ganglios de la raíz dorsal, sistema de máxima expresión de TRPV1. Y que el tratamiento de estas células con el esteroide (100 nM por 24 horas), produce un aumento de ARNm y proteína. Finalmente se determinó mediante ensayos *In silico* que una región analizada río arriba del exón 1 del gen de TRPV1 posee sitios putativos para la unión del Receptor de Andrógenos.

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AR: Receptor de Andrógenos (Androgen Receptor)

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

BCA: Ácido bicinconínico

CFA: Adyuvante completo de Freund

CTR: Control.

DBD: Dominio de unión a ADN

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DRG: Ganglios de la raíz dorsal (Dorsal Root Ganglion)

ER: Receptor de Estrógenos. (Estrogen Receptor)

Hsp90: Proteína de Choque térmico

KO-V1: Ratones Knockout para la expresión de TRPV1

LBD: Dominio de unión a ligando

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NLS: Secuencia de Localización Nuclear

PBS: Buffer de fosfatos salino.

PBS-T: Buffer de Fosfatos salino con Tween 20.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PVDF: Membranas de fluoruro de polivinilideno

PKA: Proteína cinasa A, dependiente de AMP cíclico

PKC: Proteína cinasa C, dependiente de calcio

RT: Transcripción Inversa

SHBG: Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales

Sig-1R: Receptor Sigma 1

T: Testosterona

TAD: Dominio de Transactivación

TG: Ganglios del trigémino (Trigeminal ganglion)

TRP: Receptores de potencial Transitorio (Transient Receptor Potential)

TRPM: Receptor de Potencial Transitorio Melastatina

TRPV: Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide

WT: Silvestres

1. Introducción

1.1 Nocicepción

La capacidad de detectar estímulos nocivos y responder de manera adecuada para evitar daños reales o potenciales es esencial para la supervivencia y mantenimiento de la homeostasis de un organismo. La detección de estos estímulos es por medio de receptores especializados localizados en neuronas periféricas; estos receptores poseen propiedades biofísicas y moleculares muy particulares que les permiten responder selectivamente a señales potencialmente dañinas (Basbaum 2009).

En este proceso conocido como nocicepción los estímulos de tipo mecánico, químico y térmico son convertidos en señales eléctricas por neuronas especializadas conocidas como nociceptores, posteriormente estas señales se transmiten a regiones del sistema nervioso central donde son moduladas. Finalmente, esta información es integrada en la corteza cerebral y es percibida como dolor agudo o primario, Figura 1 (Foulkes y Wood. 2008).

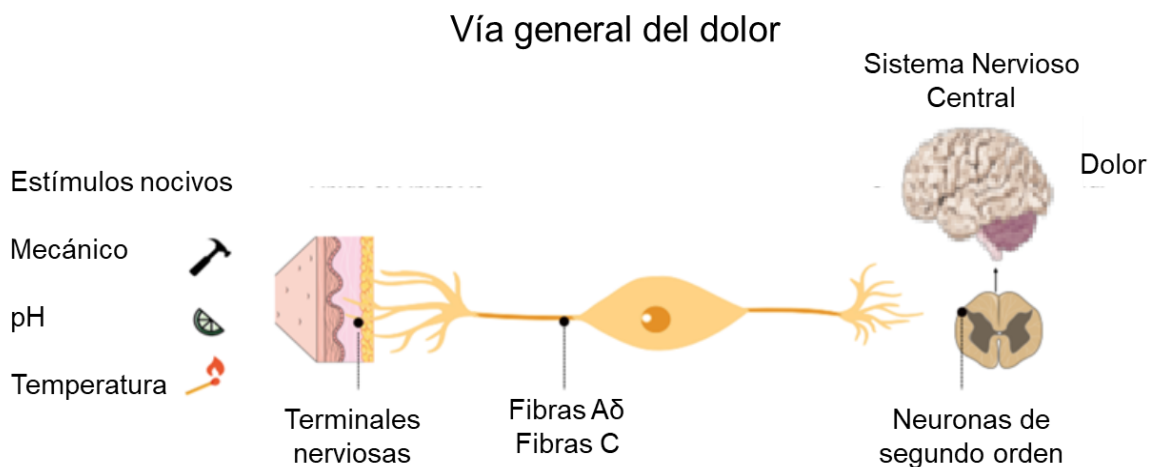


Figura 1. Vía general de la nocicepción. Esquema representativo del circuito fisiológico del dolor. Modificado de Juárez, 2018.

La morfología de los nociceptores se encuentra altamente conservada. Estas neuronas somatosensoriales son de tipo pseudounipolar, en las que el soma se encuentra ubicado en los ganglios del trigémino (TG) y ganglios de la raíz dorsal (DRG), a partir del soma se origina un axón que bifurca, un extremo dirige sus terminales para inervación de zonas cutáneas, viscerales o articulaciones, mientras que el otro forma una sinapsis con neuronas de segundo orden (Dubin y Patapoutian. 2010). Las fibras que forman estas neuronas se clasifican por la presencia o no de mielinización, por su diámetro y velocidad de conducción (Sneddon. 2017).

Entre estas fibras se encuentran los tipos A δ y C de carácter polimodal, que son de gran importancia para la nocicepción. Las primeras participan en la detección de estímulos que producen dolor agudo bien localizado, se caracterizan por una velocidad de conducción media, por ser de pequeño diámetro y se dividen en tipo I y II. Las fibras A δ tipo I son principalmente sensibles a altas presiones mecánicas y solo después de un proceso de sensibilización responden a temperatura, mientras que las fibras A δ tipo II tienen umbrales a temperaturas nocivas más bajos y mayores a estímulos mecánicos. Por otro lado, las fibras C no poseen mielina y su conducción es relativamente más lenta que las anteriores, tienen una mejor respuesta a compuestos químicos como la capsaicina e histamina y son importantes en la detección de estímulos que producen dolores crónicos y en un contexto de lesión (Basbaum 2009). La capacidad de las fibras de percibir estos estímulos se debe a la gran variedad de receptores que poseen en sus membranas celulares, entre ellos un gran número de canales iónicos.

1.2 Receptores de Potencial Transitorio (TRP).

Entre los canales iónicos presentes en las neuronas involucradas en nocicepción se encuentran los Receptores del Potencial Transitorio (TRP, por sus siglas en inglés: Transient Receptor Potential). El gen de TRP se identificó por primera vez en fotorreceptores de *Drosophila* mutantes, en los cuáles un estímulo continuo de

luz producía potenciales transitorios en lugar de sostenidos como se presentan en la mosca silvestre. De esta manera se utilizó el término TRP para designar a una familia de genes relacionados (Katz et al. 2017).

La familia de canales TRP se clasifica con base a la homología de su secuencia; de esta manera se derivan 7 subfamilias: TRPV (Vaniloide), TRPC (Canónica), TRPA (Anquirina), TRPM (Melastatina), TRPP (Policistina), TRPML (Mucopolina) y TRPN (potencial no mecanorreceptor), Figura 2 (Kaneko et al. 2014; Pedersen et al. 2005; Ramsey et al. 2007; Zheng 2013). Para el caso de mamíferos se han identificado un total de 27 canales pertenecientes a las primeras seis subfamilias, con excepción del canal TRPN. Este último canal solo se encuentra en invertebrados y vertebrados no mamíferos (Rosasco y Sharona 2017).

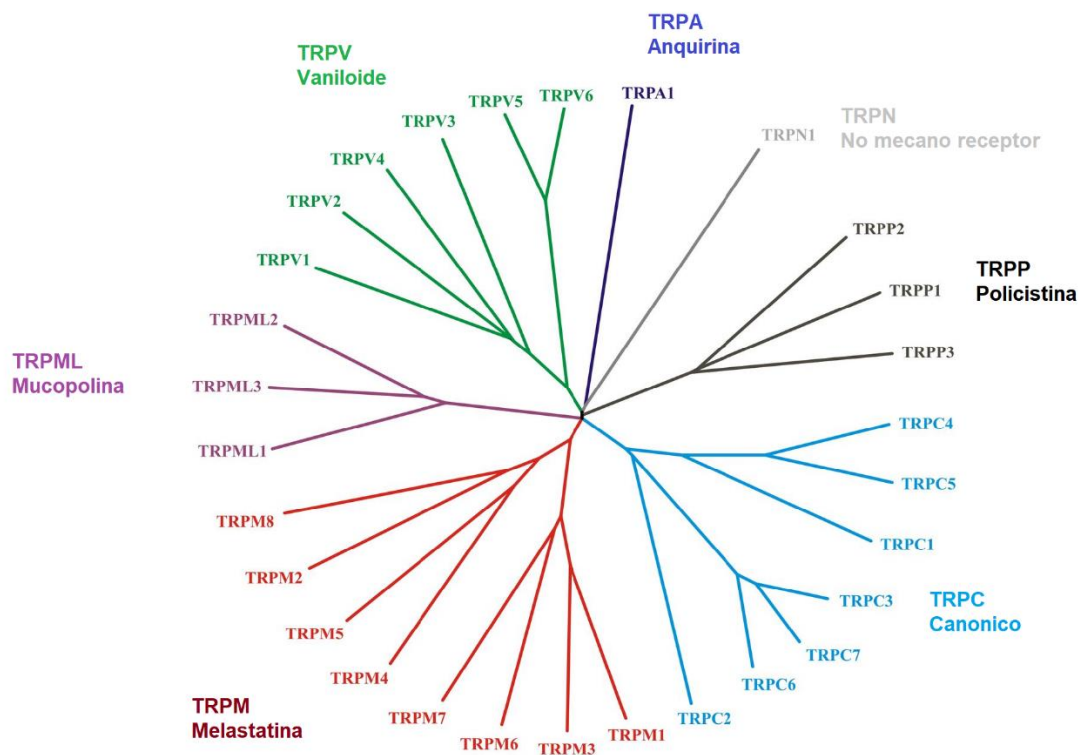


Figura 2. Clasificación de canales TRP basado en homología de secuencia. TRPV (Vaniloide), TRPC (Canónica), TRPA (Anquirina), TRPM (Melastatina), TRPP (Policistina), TRPML (Mucopolina) y TRPN (potencial no mecanorreceptor). Modificado de Li, 2017.

De manera general los TRP presentan una arquitectura básica compuesta por homotetrámeros o heterotetrámeros, siendo la primera la más común (Rosasco y Sharona 2017), son selectivamente permeables a cationes, principalmente a Ca^{2+} , a excepción de los canales TRPV5 y TRPV6, que permean selectivamente Ca^{2+} y de los canales TRPM4 y TRPM5 que únicamente permiten el paso de cationes monovalentes (Kaneko et al 2014). La secuencia de aminoácidos más conservada entre las distintas familias se encuentra en el dominio carboxilo, esta secuencia de aproximadamente 25 residuos entre el segmento transmembranal 6 y el C-terminal se conoce como caja TRP (Ramsey et al, 2006).

Estos canales actúan como sensores que detectan cambios en el ambiente celular. La mayoría de ellos son de tipo polimodal, es decir, responden a una variedad de estímulos, además su actividad es modulada por varias moléculas en el interior y exterior de la célula (Kaneko et al 2014). Su activación produce cambios en el potencial de membrana lo que puede desencadenar potenciales de acción, cambios en el metabolismo celular, producir endocitosis y exocitosis, por mencionar algunas. Es por ello que los canales TRP son de gran importancia para múltiples procesos fisiológicos (Zheng, 2013).

1.3 Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide tipo 1 (TRPV1).

La subfamilia de canales Vaniloide (TRPV) se encuentra constituida por seis miembros (V1-V6) (Ramsey et al.2006). El nombre de la subfamilia deriva del compuesto vaniloide capsaicina, molécula actúa como agonista selectivo del primer miembro caracterizado, el canal TRPV1, además este compuesto es responsable de la sensación de picor o ardor generada cuando se ingieren chiles (Caterina, et al 1997).

Actualmente el canal TRPV1 es considerado el miembro de la familia los TRP más estudiado en mamíferos. En humanos el gen de TRPV1 se encuentra ubicado en el cromosoma 17, de este gen se deriva un ARN mensajero que consta de 17

exones los cuales codifican para una proteína de 839 aminoácidos (Beavan et al. 2014).

La expresión de esta proteína en un inicio se consideró exclusiva de neuronas de ganglios sensoriales, principalmente en neuronas sensitivas primarias de pequeño diámetro. Estudios posteriores demostraron que también se encuentra en distintas áreas del sistema nervioso central (Morales et al 2013; Morales et al 2014). Hasta la fecha se sabe que TRPV1 se expresa también en tejidos no neurales como vejiga, piel, capilares, microvasculatura cerebral, corazón, hígado, vasos y pulmones (Szallasi y Blumberg, 2006).

La estructura de la proteína TRPV1 presenta la topología característica de los canales TRP (Beavan et al. 2014). Cada subunidad se compone de tres dominios: el dominio amino terminal en el que se encuentran los 6 repetidos de estructura tipo anquirina; el dominio de carboxilo terminal que contiene una secuencia de aminoácidos altamente conservada entre la familia TRP (la caja TRP), este último resulta ser de gran importancia para la interacción de la proteína TRPV1 con lípidos de membrana y proteínas de citoesqueleto. Finalmente, TRPV1 posee un dominio transmembrana compuesto por seis segmentos (S1-S6) de los cuales S5 y S6 forma un asa entrante que es un componente del poro. Estas subunidades se asocian en forma de homotetrámeros que integran la estructura funcional del canal (Figura 3) (Morales et al 2013).

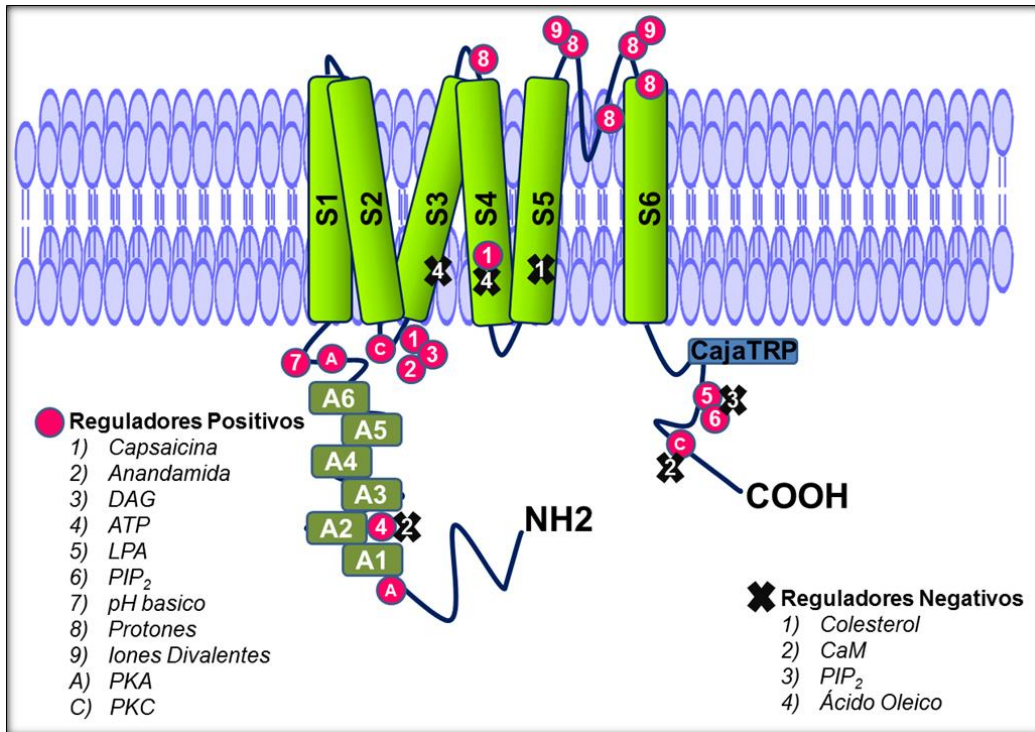


Figura 3. Esquema representativo del canal iónico TRPV1. La figura muestra los seis segmentos transmembranales (S1-S6), los extremos amino (NH₂) y carboxilo (COOH) que se encuentran intracelularmente, los 6 repetidos de anquirina (A1-A6), se señalan los sitios de interacción directa de varios reguladores positivos (círculos en rosa) y algunos reguladores negativos (cruces negras) del canal. Modificado de Morales et al. 2013.

En mamíferos, la proteína TRPV1 forma parte de un grupo de canales iónicos especializados en la detección de cambios de temperatura conocidos como termo TRP. Específicamente este canal es activado a temperaturas mayores a 43°C (Nazıroğlu y Braidı, 2017) (Caterina, et al 1997). También actúa como un sensor polimodal debido a que es activado por distintos compuestos químicos, tanto endógenos como exógenos, además responde a pH ácido y básico. Gracias a esta característica, el canal se considera un sensor a nivel de membrana que detecta cambios en el ambiente celular (Szallasi y Blumberg, 2007).

Un aspecto importante de TRPV1 es su modulación durante procesos inflamatorios en los cuales se favorece su activación. Bajo estas condiciones, el canal TRPV1 puede ser activado por estímulos inocuos (por ejemplo, temperaturas menores de 43°C), evento denominado “sensibilización” del canal (Morales et al 2013). Esto se

debe a que TRPV1 es blanco de la acción de algunas proteínas quinasas (PKA, PKC y CaMKII), que son capaces de fosforilar aminoácidos específicos, lo que conduce a un estado del canal en el que su activación ocurre con mayor facilidad (Rosebaum y Simon, 2006). Por otra parte, existen moléculas como ATP, ácido lisofosfatídico y anadamida, que son liberadas en tejidos dañados y que se unen directamente al canal promoviendo su apertura (Morales et al 2013). Además, otras proteínas como el Factor de crecimiento nervioso (NGF), son reguladores positivos del canal TRPV1, ya que promueven la transcripción del canal, adicionalmente favorece el tráfico de canales hacia la membrana plasmática. Todos estos mediadores moleculares liberados durante la inflamación o daño tisular favorecen la activación del canal TRPV1, que a su vez inicia con la transducción de la señal de dolor. Es por esta razón que esta proteína se ha convertido en un importante blanco en la búsqueda de terapias para contrarrestar el dolor agudo y crónico (Szallasi y Blumberg, 2007).

1.4 Modulación del canal TRPV1 por hormonas sexuales.

Las hormonas sexuales como estrógenos, andrógenos y progesterona son moléculas que participan en un gran número de funciones celulares. El análisis de resultados obtenidos a lo largo de varios estudios ha propuesto a estos esteroides como moduladores de la función y expresión de algunos miembros de la familia TRP, incluyendo a TRPV1 (Artero et al. 2018). Dentro de ellos existen estudios genómicos en rata, ratón y humano de las secuencias regulatorias de la expresión (promotores) de canales TRP, donde se han identificado varias regiones que contienen elementos indicadores de regulación transcripcional por estos esteroides (Kumar et al. 2014). Sumado a esto, la colocalización de TRPV1 con receptores a estrógenos (ER) α , β y GPR30 (Artero et al. 2018) y el receptor a andrógenos (Lee et al. 2016) en neuronas sensoriales ha reforzado esta hipótesis.

Payrits y colaboradores en 2017 examinaron el papel del 17β estradiol en la modulación de la expresión de TRPV1 en ratón. Determinaron que un pre-

tratamiento con esta hormona aumenta los niveles de ARN mensajero de TRPV1. De manera interesante, ratones hembra que fueron ovariectomizadas el umbral mecánico y termociceptivo fue más alto que en grupos control. Previamente Cho y Chaban en 2012 encontraron una disminución de proteína de TRPV1 en neuronas de DRG de ratones que carecen de la expresión de ER α o ER β , resaltando la importancia de los ER para la regulación de la expresión de TRPV1.

Por otro lado, la progesterona tiene efectos sobre TRPV1 a través del receptor Sigma 1 (Sig-1R). Sig-1R es una proteína chaperona que ayuda al correcto plegamiento del canal. La progesterona actúa como un antagonista de este receptor lo que le impide realizar su función, esto tiene como consecuencia un mal plegamiento de TRPV1 que resulta en su degradación por vía del proteasoma. Este evento disminuye la cantidad de canal en la membrana plasmática y, con ello, una disminución en las respuestas inducidas por capsaicina (Ortiz et al. 2017).

Entre los andrógenos, dehidroepiandrosterona (DHEA) es una de las hormonas que interactúa directamente con el canal modificando su función. La DHEA inhibe las corrientes generadas por capsaicina en neuronas del ganglio de la raíz dorsal. Aunque se desconoce si esto se debe a la competencia por unión al sitio vaniloide o modificación alostérica (Chang et al. 2004).

Para este trabajo resulta de gran importancia la testosterona y su efecto sobre TRPV1, pero a la fecha existe muy pocos de estudios realizados al respecto. Entre ellos destaca la investigación de Bai y colaboradores en 2018, utilizando un modelo de inflamación inducido por adyuvante completo de Freund (CFA) reportaron que la testosterona actúa como un regulador negativo de la expresión de TRPV1 debido a que reduce la cantidad de ARNm y proteína en dichas condiciones. Sin embargo, no se propone un mecanismo mediante el cual esté ocurriendo este efecto.

1.5 Testosterona y el Receptor de Andr6genos.

La testosterona es el andr6geno de mayor circulaci3n en sangre y es sintetizado principalmente en c6lulas de Leydig ubicadas en los test6culos (Michels y Hoppe, 2008; Lee y Chang, 2003). En hombres la concentraci3n en suero es de 300–800ng / dL (10.40 nM – 27.73 nM), mientras que para mujeres es de 30–50ng / dL (1.40 nM – 1.73 nM) (Mukaddam y Snyder, 2013). La testosterona realiza entre el 90-95% de la acci3n total de los andr6genos, en suero, la mayor parte (97-99%) se encuentra asociada a prote6nas como globulina fijadora de hormonas sexuales (en ingl3s, SHBG) o albumina y muy poca cantidad (1-3%) se encuentra de manera libre. Este esteroide principalmente participa en el desarrollo del fenotipo masculino (Michels y Hoppe, 2008), pero otras de sus funciones se encuentran a nivel celular donde modulan la proliferaci3n, diferenciaci3n y homeostasis (Foradori et al. 2008).

La testosterona ejerce sus efectos de manera cl3sica a trav3s del Receptor de Andr6genos (AR), un factor de transcripci3n que pertenece a la superfamilia de receptores a esteroides. El gen del AR se ubica en el cromosoma X, su ARNm est3 compuesto por 8 exones que codifican para una prote6na de masa molecular aproximada de 110 kDa (Contreras et al. 2017). Esta forma del receptor, tambi3n llamada AR-B, es la isoforma completa. Estudios posteriores identificaron una prote6na m3s peque1a (87 kDa) codificada por el mismo gen, pero con el N-terminal truncado que constituye del 4-26% del total de AR inmunoreactivo en tejidos, conocido como AR-A (Lee y Chang, 2003), ambas isoformas presentan actividad funcional similar (Gao y McPahul, 1998).

El Receptor a Andr6genos se expresa principalmente en test6culos, adicionalmente se ha reportado su expresi3n en tejidos perif3ricos. Tambi3n se ha identificado en regiones del sistema nervioso, incluyendo cerebro (Contreras et al. 2017). En las c6lulas el AR se ubica en el citoplasma en complejo con prote6nas de choque t3rmico Hsp90 (Cutrees et al. 2008).

La estructura del AR es similar a la encontrada en los otros receptores nucleares de respuesta a hormonas con cuatro dominios funcionales bien identificados (Cutrees

et al. 2008). El primer dominio del N-terminal o dominio de transactivación (TAD) encargado de modulación de la transcripción, el dominio central de unión a ADN (DBD), un tercer dominio de unión a ligando (LBD) en el C-terminal y un dominio que enlaza a DBD y LBD conocido como dominio de bisagra que media cambios conformacionales en la proteína por unión de ligando (Lee y Chang, 2003; Contreras et al. 2017; Cutrees et al. 2008).

El mecanismo de acción clásico de la testosterona por medio del AR comienza cuando esta se difunde a través de la membrana plasmática, gracias a su naturaleza lipídica, y se une al receptor que se encuentra en el citoplasma. Esta unión tiene como consecuencia cambios conformacionales que permiten la separación del AR de las proteínas de choque térmico y su posterior homodimerización (Foradori et al. 2007). La modificación estructural, además, expone una región de localización nuclear (NLS) reconocida por importinas encargadas de su transporte al interior del núcleo, evento que es indispensable para llevar a cabo su función (Cutrees et al. 2008). Dentro del núcleo el AR reconoce secuencias específicas del ADN, principalmente en regiones promotoras conocidas como Elementos de Respuesta a Andrógenos. En este punto el AR puede modificar la expresión del gen, ya sea promoviendo o reprimiendo la transcripción del gen blanco dependiendo de los correguladores que sean reclutados (Figura 4) (Michels y Hoppe, 2008; Foradori et al. 2008).

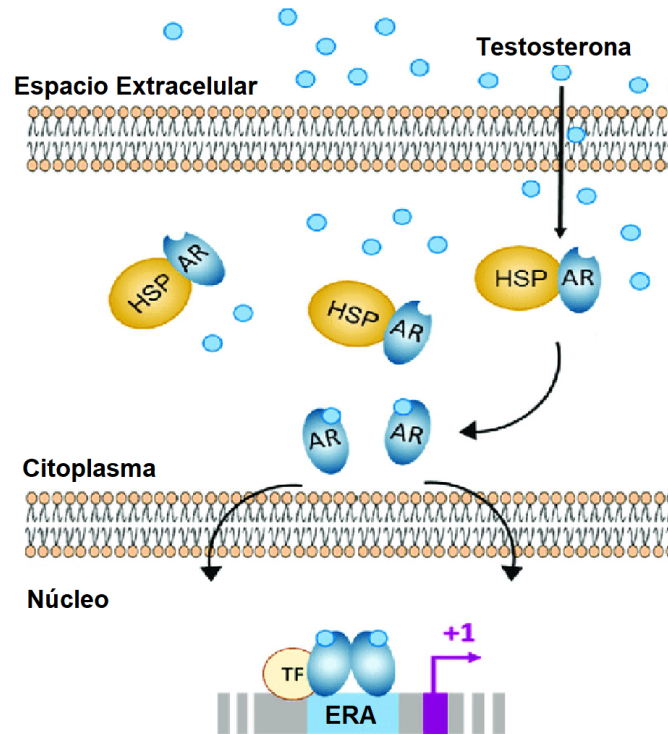


Figura 4. Mecanismo de acci3n cl1sico de la testosterona mediado por el Receptor de Andr6genos (AR). La testosterona se difunde a trav6s de la membrana plasm1tica y se une al AR, una vez que esto sucede se separa de prote3nas de choque t6rmico (HSP) y es transportado al n6cleo. Finalmente se une a regiones espec3ficas del ADN conocidas como elementos de respuesta a Andr6genos (ERA), para modular su transcripci3n. Modificado de Edelsztein y Rey, 2019.

Sumado a los efectos cl1sicos de la testosterona se han reportado en gran cantidad de estudios la participaci3n de este esteroide en procesos celulares que ocurren en intervalos de tiempo de segundos a minutos y son independientes de la participaci3n del AR (Foradori et al. 2008). Estas respuestas van desde activaci3n directa de canales i3nicos y transportadores de membrana, cambios en la concentraci3n de Ca^{2+} intracelular, activaci3n de prote3nas quinasas (PKA, PKC, MAPK), e inicio de cascadas de se1alizacion a trav6s de receptores acoplados a prote3nas G, (Michels y Hoppe, 2008).

Como se mencion3 anteriormente, las hormonas sexuales juegan un papel clave en la modulaci3n de TRPV1. La testosterona al parecer regula la expresi3n de este canal en un modelo de inflamaci3n, aunque, no queda claro si esto es resultado de

la acción clásica descrita para este esteroide mediado por AR o se debe a alguna acción no clásica del mismo. TRPV1 es un canal iónico fundamental para el proceso nociceptivo, por lo que es de suma importancia determinar el mecanismo por el cual la testosterona ejerce sus efectos sobre este.

2. Hipótesis

La testosterona regula el dolor mediado por el canal TRPV1 a través de efectos genómicos clásicos.

3. Objetivo General

Determinar el efecto de la Testosterona sobre la regulación del dolor mediado por el canal TRPV1.

3.1 Objetivos Particulares

- Evaluar la respuesta de dolor mediada por el canal TRPV1 en ratones de la cepa C57BL/6J inyectados con testosterona (evaluación de los posibles efectos agudos del esteroide).
- Evaluar la respuesta de dolor por capsaicina en ratones pretratados con testosterona (posibles efectos a largo plazo del esteroide).
- Determinar posibles cambios en la expresión del canal TRPV1 (ARNm y proteína) en cultivos primarios de neuronas de ganglios de la raíz dorsal tratados con Testosterona.

4. Materiales y métodos

4.1 Animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando ratones macho silvestres (WT) de la cepa C57BL/6. También fueron usados ratones macho que carecen de la expresión del gen TRPV1 (Knockout, KO-V1), cepa transgénica comercialmente distribuida por The Jackson Laboratory. Todos los animales utilizados fueron de 10 a 12 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en un fotoperiodo de 12 horas luz / 12 horas oscuridad, con acceso a comida (LabDiet 5001) y agua *ad libitum*. El cuidado de los animales se realizó conforme a la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidados y Uso de los Animales de Laboratorio” y circunscritos al Título Tercero del bienestar de los animales, capítulo I del bienestar de los animales, artículo 20 del párrafo I al IV. El protocolo de investigación utilizado (SML127-18) se encuentra aprobado por el CICUAL del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

4.2 Ensayos conductuales de dolor nociceptivo.

Con el fin de determinar si la testosterona produce dolor por medio de la activación del canal TRPV1, se realizaron ensayos de evaluación del tiempo de lamido de la pata (Paw Licking time) (Caterina et al 2000). Esta prueba se utiliza para evaluar el dolor producido por la aplicación de un compuesto químico el cual es administrado en solución por medio de inyección intradérmica en la extremidad delantera. Posteriormente se mide el tiempo acumulado de lamido de la extremidad inyectada por un intervalo de 10 minutos. Esta respuesta es considerada como reflejo ante un estímulo doloroso.

La evaluación del efecto de la testosterona sobre la generación de dolor agudo se realizó en ratones WT y KO-V1 que fueron divididos en dos grupos; control (CTR) y testosterona (T). Todos los experimentos se realizaron en una habitación con la

menor cantidad de estímulos olfativos y auditivos. Antes de comenzar las pruebas conductuales los ratones fueron colocados en cajas individuales para su aclimatación por un periodo de 1 hora. La administración de la solución control o con testosterona se realizó de manera intradérmica en la palma de la extremidad delantera del ratón. La inyección del grupo CTR consistió en solución Salina + vehículo de testosterona (1.5 % de metanol); el grupo T fue inyectado con solución salina + 3 µg de testosterona (preparada previamente como un stock de 20 µg/µl en metanol). Ambos tratamientos fueron administrados en un volumen final de 10 µL adicionado con solución salina. Posterior a la inyección el ratón fue colocado en su respectiva caja, y se midió el tiempo acumulado que el animal lame la extremidad. Con el objetivo de evaluar si la testosterona ejerce efectos sensibilizadores para la respuesta del dolor, 24 horas después del ensayo anteriormente mencionado, estos mismos animales fueron utilizados para ser inyectados en la extremidad delantera contraria con 10 µl de solución salina adicionada con 1.5 % de metanol (estímulo inocuo) y se evaluó la respuesta de dolor nociceptivo.

Para la evaluación de la respuesta de dolor nociceptivo en ratones WT pretratados con testosterona, el estímulo consistió en la inyección intradérmica de 2.8 µg capsaicina (la cual, se preparó previamente como un stock de 20 µg/µl en etanol) contenida en 10 µL de solución salina. Después de una hora de la primera inyección los ratones fueron nuevamente inyectados, esta vez en la extremidad contraria, con solución salina adicionada con 0.14% de etanol (vehículo de la capsaicina). El tiempo acumulado de lamido se midió en un intervalo de tiempo 10 minutos.

4.3 Obtención de DRG y cultivo primario.

Los animales fueron sacrificados por decapitación y colocados en una base de unicel. Inicialmente se retiró la piel y músculo de la parte dorsal para exponer la columna vertebral, a continuación, esta fue cortada para permitir el acceso a los ganglios. Una vez que los DRG fueron extraídos, se colocaron en 2 ml de medio de cultivo DMEM, se realizaron lavados, primero centrifugando a 1200 rpm por 3 min y

eliminando el sobrenadante para luego resuspender en 2 ml de DMEM, esto se repitió dos veces. Posteriormente se colocaron en un tubo con DMEM adicionado 2.5 mg de tripsina y 8 mg de colagenasa, se incubaron durante 30 min a 37° C. Nuevamente se realizaron lavados pero esta vez agregando medio D10 (medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico). Después del segundo lavado se agregaron 300 µl de D10 y las células se homogenizaron con una micropipeta de 100-1000 µl. Los 300 µl fueron divididos en dos cultivos colocados en cajas petri de 35 mm de diámetro. Finalmente se adiciono medio D10 y el respectivo tratamiento en un volumen final de 2 ml.

4.4 Tratamiento de Testosterona

La testosterona (Sigma-Aldrich, ≥98%) fue diluida en metanol (vehículo). Para tratamiento de cultivo primario de neuronas de DRG se preparó un stock de 10 mM, a partir de este se realizaron diluciones en medio de cultivo D10 hasta una concentración de 100 nM en 2 ml de medio, posteriormente fue agregado a las células. El cultivo de células control, consistió en agregar 2 ml de medio D10 complementado con 0.000004% de metanol (vehículo de la testosterona). El tratamiento con el esteroide se realizó por un periodo de 24 horas.

Para el experimento de ratones pretratados con testosterona se aplicó una dosis de 110 µg/Kg. Los animales fueron pesados y a partir de una solución stock de 1 mg/ml se preparó la dosis respectiva al peso de cada individuo en un volumen final de 100 µl completado con solución salina. La inyección fue aplicada de manera subcutánea en la zona interescapular del animal, para un tratamiento de 24 horas. De igual forma para el grupo de ratones control fueron pesados y se aplicó el volumen de vehículo (metanol) diluido en solución salina, el cuál correspondió un volumen equivalente a la dosis de testosterona (110 µg/Kg).

4.5 Obtención de proteína y cuantificación.

Finalizado el tiempo de tratamiento fue retirado el medio D10 de los cultivos primarios. Las células fueron lavadas en su caja Petri con 300 µl de PBS dos veces, posteriormente se agregó 120 µl de buffer de lisis 1x (tabla 1), este fue recuperado en un tubo eppendorf y agitado en vórtex por 15 segundos. Finalmente, la muestra se centrifugó a 13500 rpm x 5 minutos y el sobrenadante que contenía a las proteínas fue recuperado y almacenado a -70 °C. Para el caso de la proteína total de testículo de ratón después de ser extraídos se colocaron en PBS frío en un tubo eppendorf y se homogenizaron con ayuda de un pistilo. Las muestras fueron lavadas dos veces con 1 ml PBS para eliminar restos de sangre, una vez concluidos se agregaron 300 µl de buffer de lisis 1x y fueron agitados en vórtex por 15 segundos, la muestra se centrifugó a 13500 rpm x 5 minutos, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se almaceno a -70 °C.

Tabla 1. Buffer de lisis 1x.

Reactivo	Concentración final
Tris Cl pH 8	50 mM
NaCl	150 mM
Tritón	1%
Complete 25x (inhibidor de proteasas cOplete, Roche)	1x
NaF	25 mM

La cuantificación de proteína total se llevó a cabo por el método de ácido bicinónico (BCA). Esta técnica permite su cuantificación gracias a la reacción que ocurre entre las proteínas y Cu^{2+} alcalino (reacción de Biuret). Como resultado de esta reacción se produce un cambio de coloración (morado) en la mezcla que

aumenta su intensidad de manera proporcional a la cantidad de proteína. Por métodos de comparación es posible determinar una concentración desconocida a través de una curva estándar de concentraciones conocidas (Smith et al. 1985).

La curva estándar se realizó con distintas concentraciones de BSA. Las muestras de la curva, así como las problema, se cargaron por duplicado en una placa de 96 pozos, cada pozo contenía 160 μ l de solución de trabajo (50 partes de ácido bicinónico y 1 parte CuSO_4), 10 μ l de agua y 10 μ l de proteína. Se incubaron por 30 minutos a 37° C y se midió absorbancia de las muestras con ayuda de un espectrofotómetro ELx80 (BioTek) a una longitud de onda de 562 nm. Con los valores obtenidos se realizó una regresión lineal y se interpolaron las absorbancias de las muestras problema para determinar su concentración utilizando el programa GraphPad Prism.

4.6 Western Blot

El Western Blot es una técnica utilizada para el análisis de proteínas por inmunodetección. Este ensayo permite identificar una proteína de interés aprovechando su peso molecular y la especificidad de anticuerpos por la misma. La separación de proteínas se realiza por electroforesis en gel de poliacrilamida donde su migración depende de su peso molecular. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF donde finalmente se realiza la inmunodetección. Para esto se utiliza un anticuerpo primario que reconoce a la proteína. Finalmente, un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano se une al anticuerpo primario. Posterior a este proceso se proporciona el sustrato de la enzima peroxidasa que produce una reacción de quimioluminiscencia que puede ser detectada por una película de rayos X, la intensidad de la señal es dependiente de la cantidad de proteína unida al anticuerpo. Esta señal puede ser utilizada para el análisis de la proteína en distintas condiciones (Gavini y Parameshwaran, 2019).

Una vez obtenida la concentración de proteína total se ajustó el volumen añadido de muestra para cargar la misma cantidad de proteína en cada pozo (25 µg). La mezcla cargada contenía 8 µL de buffer de carga 6x (Tabla 2) en una concentración final al 1x más H₂O y proteína en un volumen final de 48 µL.

Las muestras se corrieron en geles de acrilamida dividido en dos fases: gel concentrador y gel separador (Tabla 3). La electroforesis se realizó en una cámara horizontal con buffer de electroforesis (Tabla 4) a un amperaje constante (20 mA) por dos horas. La transferencia se realizó a una membrana de PVDF en un sistema semi seco en una cámara TE70XP (Hoefer) con buffer de transferencia (Tabla 5) a un amperaje constante de 220 mA por dos horas. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 6% (3 g de leche descremada en 50 ml de PBS con Tween20 al 0.1% PBS-T) durante una hora. Una vez terminado el bloqueo se realizaron 3 lavados de las membranas con PBS-T.

Tabla 2. Buffer de carga 6x.

Compuesto	Concentración
4x Tris Cl/SDS pH 6.8	0.35 M
DTT	0.6 M
Glicerol	30 %
SDS	10%
Azul de Bromo fenol	0.012%

Tabla 3. Gel separador y concentrador de acrilamida.

Gel Separador	
Solución	Volumen
30% acrilamida./0.8% bisacrilamida	5 ml
4x Tris Cl/SDS pH 8.8	3.75 ml
10% persulfato de amonio	50 µL
TEMED	20 µL
Agua	6.25 ml

Gel Concentrador	
Solución	Volumen
30% acrilamida/0.8% bisacrilamida	0.65 ml
4x Tris Cl/SDS pH 6.8	1.25 ml
10% persulfato de amonio	25 µL
TEMED	10 µL
Agua	3.05 ml

Tabla 4. Buffer de electroforesis.

Compuesto	Concentración
Tris base	0.125 M
Glicina	0.96 M
SDS	0.5%

Tabla 5. Buffer de transferencia.

Compuesto	Concentración
Tris base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0.037%
Metanol	20%

Posteriormente las membranas se incubaron con anticuerpos primarios específicos para cada proteína (Tabla 6). Todas las membranas se incubaron a una temperatura de 4°C con agitación constante durante toda la noche a excepción de aquellas con anticuerpo para Receptor de Andrógenos las cuales fueron incubadas por un periodo de 96 horas. Después de este proceso se retiraron los anticuerpos primarios y las membranas fueron lavadas en tres ocasiones con PBS-T. Luego se agregó el anticuerpo secundario (Tabla 7) para cada blanco de detección el cual tiene acoplada la peroxidasa de rábano y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas fueron nuevamente lavadas con PBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo. Para la inmunodetección de la proteína se adicionó el sustrato de la peroxidasa de rábano (Immobilon-Western) y la señal emitida por quimioluminiscencia fue captada por una placa radiográfica. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas con ayuda del programa ImagenJ.

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot.

Proteína	Anticuerpo Especie	Peso (KDa)	Dilución	Marca
TRPV1	Policlonal Conejo	95	1:1000 Leche 3%	Santa Cruz (P19)
AR	Conejo	110	1:1000 Leche 3%	Abcam ab133273
Actina	Monoclonal Ratón	42	1:500 PBS-T	-----

Tabla 7. Anticuerpos secundarios.

Inmunoglobulina	Dilución	Marca
Anti-Ratón	1:5000 Leche al 3%	GE Healthcare life Sciences
Anti-Conejo	1:5000 Leche 3%	GE Healthcare life Sciences

4.7 Extracción de ARN

La extracción de RNA se realizó mediante el uso de TRIzol. Esta técnica permite la separación de una mezcla de moléculas por solubilidad individual en una solución de fenol-cloroformo separada en fases por centrifugación. El TRIzol es una solución monofásica de tiocianato de guanidinio y fenol, el primero actúa como un desnaturalizante de proteínas y el fenol permite solubilizar la muestra. Con la adición de cloroformo ocurre una separación en fases, las proteínas permanecen en la fase orgánica, el ADN en una fase intermedia y el ARN en la fase acuosa (Rio et al 2010). Lo anterior ocurre debido a la polaridad de las moléculas y del solvente, los ácidos nucleicos poseen cargas negativas que son altamente solubles en la fase acuosa, mientras que en la fase orgánica el fenol interactúa con regiones hidrofóbicas de las proteínas causando su precipitación, en esta fase también se encuentran lípidos y algunos polímeros de carbohidratos. Finalmente, la separación de ADN y ARN es gracias al pH del fenol. En un pH neutro o ligeramente básico (7-8) ambos permanecen en la fase acuosa a diferencia de lo ocurre cuando este es ácido (4.8), aquí las cargas del ADN son neutralizadas, de esta manera se precipita en la fase intermedia y orgánica (Zumbo, 2014).

Para obtener el ARN total de DRG y cultivos primarios de neuronas de DRG, a cada muestra se le agrego 1 ml y 500 µl de TRIzol (Invitrogen™) respectivamente, después fueron homogenizadas mecánicamente. En TRIzol a cada muestra se le

agregó cloroformo (200 µl por ml de TRIzol) y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación, fueron centrifugadas a 12,000G por 15 minutos a 4°C. Cuando la mezcla quedó separada en fases se extrajo la fase acuosa y se colocó en un nuevo tubo. La precipitación del ARN se realizó con isopropanol (500µl por ml de TRIzol), se mezcló por inmersión durante 15 segundos y centrifugó a 12,000G durante 10 minutos a 4°C, el botón obtenido fue lavado con etanol al 75% diluido con agua DEPC (Pirocarbonato de dietilo) 500 µl por ml de TRIzol, posteriormente se centrifugó a 7500G por cinco minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón fue re suspendido en 50µl de agua DEPC. Para evaluar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en 100 ml de TBE al 0.5X (Trisbase 0.045M, ácido bórico 0.044M, EDTA 0.5M pH8 con NaOH 2%) adicionado con bromuro de etidio. Se consideró ARN de buena calidad cuando las bandas correspondientes al ARN 28s y 18s ribosomal eran visibles. El ARN fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop™. El ARN fue almacenado a -70 °C.

4.8 RT-PCR semicuantitativa

4.8.1 Transcripción reversa (RT).

La RT es una técnica que permite la síntesis de una cadena simple de ADN complementario (ADNc) a partir de un ARN. La transcripción en reversa es llevada a cabo por una ADN polimerasa retroviral conocida como retrotranscriptasa que realiza la extensión de la cadena de ARN unida a hexonucleótidos aleatorios (random primers) en condiciones de pH y sales determinados. Esta técnica es utilizada como el primer paso del ensayo de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (King y Connell, 2010).

Se realizó la RT con el ARN obtenido de DRG y cultivos primarios de neuronas de DRG. Los reactivos para llevar a cabo la técnica se dividieron en dos tubos. El primero contenía ARN, random primers, dNTPs (desoxirribonucleótidos

trifosfatados) y H₂O (Tabla 8); el segundo contenía la enzima retrotranscriptasa (M-MLV Reverse Transcriptase), buffer 10x (M-MLV Reverse Transcriptase buffer y H₂O, (Tabla 8). La mezcla del tubo 1 se incubó a 70 °C x 10 min (fase de desnaturalización), posteriormente se incubó en hielo durante 5 minutos (alineamiento), una vez que el termociclador bajo su temperatura a 37 °C se agregó la mezcla del tubo 2 para continuar con un ciclo a 37 °C x 60 min (fase de retrotranscripción), finalmente la mezcla se incubó a 80 °C x 10 min y después a 94 °C x 10 min (fase de inactivación). El ADN complementario obtenido se almacenó a -70° C.

Tabla 8. Mezcla de reactivos para RT.

Tubo 1 Reactivo	Concentración	Tubo 2 Reactivo	Concentración
dNTPs	0.5 mM	Reverse Transcriptase	200 u
Random primers	100 ng	Reverse Transcriptase buffer 10x	1x
ARN	350 ng	H₂O	Cbp 10 µl
H₂O	Cbp 10 µl		

*Cbp: cantidad bastante para.

4.8.2 PCR-semicuantitativa

La reacción en cadena de Polimerasa (PCR) es un ensayo de alta sensibilidad que permite la amplificación de segmentos específicos de ADN. Mediante el uso de una ADN polimerasa se generan copias de manera exponencial de un segmento blanco con ayuda de oligonucleótidos que flanquean dicha región, esta doble cadena es reconocida por la enzima y a partir de ella se sintetiza la hebra complementaria. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se realiza en ciclos repetidos de tres pasos:

desnaturalización, hibridación y elongación. El producto de la amplificación es observado por electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio, una molécula que se intercala en el ADN de doble cadena que permite visualizarlo. Durante la fase exponencial de una PCR-semicuantitativa podemos establecer una relación directamente proporcional entre el número de amplicones y el número de secuencias blanco que se encontraban inicialmente, esto permite determinar las diferencias entre dos condiciones con respecto a la secuencia objetivo (Smith y Osborn, 2009; Ghannam y Varacallo, 2018)

Se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de TRPV1 y actina (control de carga) entre exones con ayuda del programa Vector NTI® (Tabla 9). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía los reactivos y concentraciones indicadas en la Tabla 10, la amplificación de los blancos se llevó a cabo en tubos separados. Una vez preparadas las mezclas se sometieron a desnaturalización inicial de 95°C x 5 min, posteriormente, se amplificaron durante 45 ciclos de desnaturalización de 95 °C x 30 s, alineamiento de 56.7 °C x 30 s y polimerización a 72 °C x 45 s, con una extensión final a 72 °C x 10 min. Se tomaron muestras de 10 µl cada 5 ciclos a partir del ciclo 25 y se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. Las muestras fueron visualizadas con ayuda de un transiluminador. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas con ayuda del programa ImagenJ.

Tabla 9. Oligonucleótidos de amplificación de TRPV1 y Actina para PCR-semicuantitativa.

Blanco	Secuencia Sentido (R) Anti sentido (F)	Temperatura de hibridación	Tamaño de amplicon Pares de base
TRPV1	R 5'-CCACATCTTCACTACCAGGA-3' F 5'-CACCAAGAGGGTCACCAGCGTCAT-3'	56.7 °C	550 pb
Actina	R 5'-AAGATGACCCAGATCATGTT-3' F 5'-GAGTACTTGCGCTCAGGAGG-3'	56.7 °C	662 pb

Tabla 10. Mezcla de reactivos para PCR-semicuantitativa.

Reactivo	TRPV1	Actina
Buffer 10x	1x	1x
DNTP`s	0.2 mM	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM
Oligonucleótido R	30 pM	3.75 pM
Oligonucleótido F	30 pM	3.75 pM
Taq Polimerasa	1 unidad por reacción	1 unidad por reacción
ADNc	5 µl	5 µl
H ₂ O	Cbp 50 µl	Cbp 50 µl

*Cbp: cantidad bastante para.

4.9 Análisis *In silico*.

Los factores de transcripción (FT) y el ADN interactúan en secuencias específicas, mediante la comparación de estas y secuencias consenso, es decir regiones del genoma con alto número de coincidencias, los análisis *in silico* permiten determinar la probabilidad para la unión de un FT y regiones particulares del ADN (Stormo, 2010). JASPAR es una base de datos de acceso libre que con el uso de matrices de frecuencia de posición proporciona perfiles de preferencia de unión de FT y secuencias de ADN analizadas (Khan et al. 2017).

La determinación de los sitios probables de interacción o elementos de respuesta a Andrógenos (ERA) en el gen de TRPV1 se llevó a cabo con el uso de bases de datos. Se identificó la secuencia donde se encontraba el gen de TRPV1 en la base de datos de NCBI GenBank, a partir de esa información se tomaron 1500 pares de bases río arriba del primer exón encontrado para este gen. Esta secuencia se

analizó en la base de datos de JASPAR seleccionando el AR de ratón con un umbral de puntaje de perfil relativo del 70 %.

4.10 Análisis estadístico

Las imágenes obtenidas por ensayos de Western Blot y PCR semicuantitativo fueron analizadas con ayuda del programa ImagenJ, los datos fueron normalizados con sus respectivos controles de carga (Actina). El análisis estadístico y gráficas de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism, mediante prueba T-student no pareada.

De igual manera los datos obtenidos en las pruebas conductuales fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism y mediante prueba de Anova de comparación múltiple.

5. Resultados.

5.1 Efectos de la testosterona en la respuesta de dolor agudo

Inicialmente las pruebas conductuales se enfocaron en determinar si había respuesta de dolor agudo por inyección de testosterona en la extremidad delantera de ratones WT macho. Los resultados muestran que los ratones WT inyectados con 3 μg (10.4 nM) de la hormona tienen una clara respuesta de dolor (WT-TEST= 22.2 \pm 0.8 s) mayor que los ratones inyectados con solución control (WT-CTR 8.8 \pm 0.5 s), Figura 5 a.

Debido a que la testosterona puede actuar sobre múltiples blancos, con el objetivo de comprobar si la respuesta corresponde a una acción de la hormona sobre TRPV1 se procedió a inyectar a ratones KO-V1 para responder esta pregunta. Se observó que los animales KO-V1 presentan poca respuesta de dolor a testosterona (KO-V1 TEST= 11.6 \pm 1.2 s), similar al grupo WT control (8.8 \pm 0.5 s); esto indica que parte de esta respuesta de dolor agudo está involucrado el canal TRPV1. Sin embargo, al comparar los datos obtenidos de los ratones KO-V1 a la inyección con vehículo esta es significativamente menor (KO-V1 CTR 4.6 \pm 0.8 s) que aquellos inyectados con el esteroide, lo que indica que esta respuesta residual este mediada por un nociceptor distinto a TRPV1.

Después de 24 horas de la primera prueba de dolor agudo los cuatro grupos anteriores fueron inyectados en la extremidad contraria con solución salina + 1.5 % de metanol. De manera interesante, los ratones WT-TES (19 \pm 0.8 s) tuvieron una respuesta de dolor significativamente mayor que los ratones KO-V1 TES y WT-CTR 7 \pm 1.4 s y 11.3 \pm 1.2 s respectivamente, lo que sugiere un estado de sensibilización al presentar dolor ante un estímulo no dañino. Figura 5b. El dato anterior presenta una evidencia de que la administración de testosterona no solo causa una respuesta de tipo agudo, sino que también tiene un efecto de sensibilización a nivel sistémico al provocar un mayor tiempo de lamido en un sitio distinto en donde inicialmente fue

administrada y que es dependiente de la presencia del canal TRPV1, ya este efecto no se presenta en el ratón KO-V1.

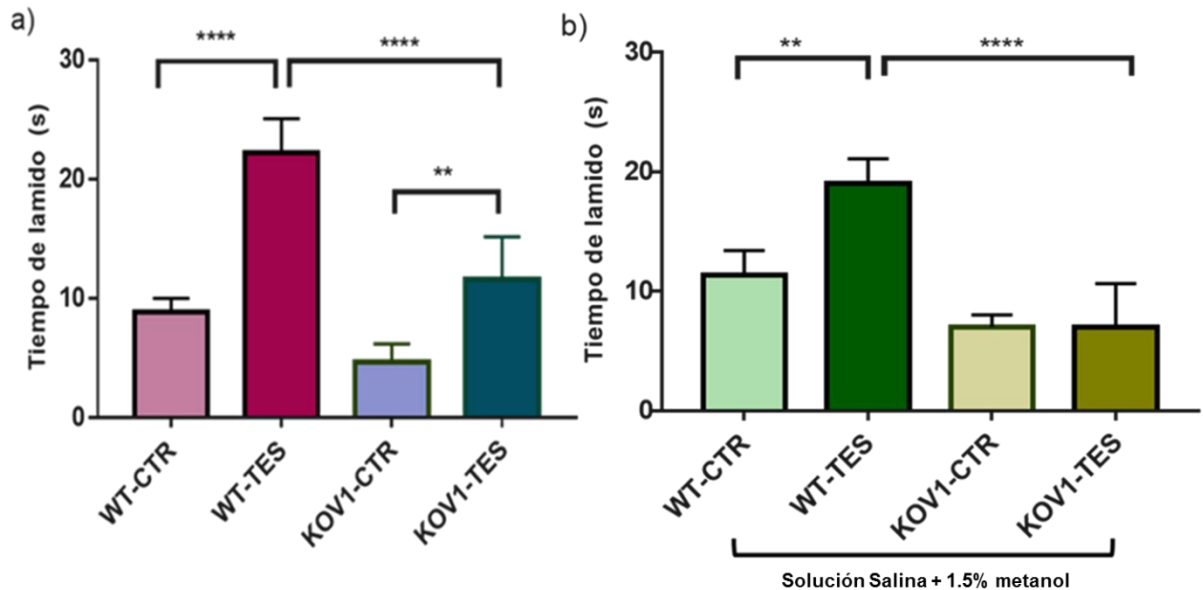


Figura 5. Evaluación del efecto de la inyección testosterona en la conducta asociada al dolor. a) Se aplicaron inyecciones de testosterona en la extremidad delantera en ratones silvestres (WT) y Knockout para TRPV1 (KO-V1). El primer grupo WT-CTR fue inyectado con vehículo metanol 8.8 ± 0.5 segundos ($n=6$). El grupo dos, ratones silvestres con $3 \mu\text{g}$ (10.4 nM) de testosterona (WT-TEST), el cual mostró una respuesta de lamido de 22.2 ± 0.8 segundos ($n=11$). Para el grupo de ratones KO-V1 -TEST se administró testosterona en la misma cantidad ($3 \mu\text{g}$) presentando un tiempo de lamido de 11.6 ± 1.2 segundos ($n=8$) y respectivo control KO-V1 CTR 4.6 ± 0.8 segundos ($n=3$). b) 24 horas después de la primera inyección con testosterona, los cuatro grupos fueron inyectados contralateralmente con solución salina/1.5 % de metanol. Los ratones silvestres mostraron una respuesta de dolor de 19 ± 0.8 segundos ($n=6$) (WT-TES), mientras que los KO-V1-TES presentaron una respuesta de lamido de 7 ± 1.4 segundos ($n=6$). Los tiempos de lamido de sus respectivos controles WT-CTR ($n=3$) y KO-V1 CTR ($n=3$) fueron de 11.3 ± 1.2 y 7 ± 0.5 segundos respectivamente. Los datos fueron analizados mediante prueba de Anova de comparación múltiple.

5.2 Respuesta de dolor a capsaicina en ratones pretratados con testosterona

El anterior resultado sugiere que la testosterona es un compuesto que puede producir en efecto sensibilizador para la respuesta de dolor ante un estímulo no dañino (solución salina). Por esta razón, decidimos evaluar si esta sensibilización se observa también para un estímulo nocivo que activa específicamente al canal TRPV1, como lo es la aplicación de capsaicina (agonista selectivo para este canal). Para ello, los ratones WT fueron inyectados subcutáneamente en la zona interescapular con testosterona (dosis 110 µg/Kg de peso del animal), 24 h después se procedió a inyectar intradérmicamente capsaicina en la extremidad del animal. Los resultados muestran que el pretratamiento con testosterona produce una sensibilización de los ratones a este compuesto (Figura 6), ya que el tiempo de lamido es significativamente mayor (49.3 ± 1.2 segundos) que el grupo de ratones control (37.3 ± 1.4 segundos). Esto demuestra que el tratamiento con testosterona puede causar cambios perceptibles a nivel fisiológico en respuesta a estímulos específicos para TRPV1. Además, estos efectos ocurren después del periodo de tiempo generalmente aceptado para las acciones genómicas mediadas por factores de transcripción, como el receptor de andrógenos que es activado por medio de la testosterona.

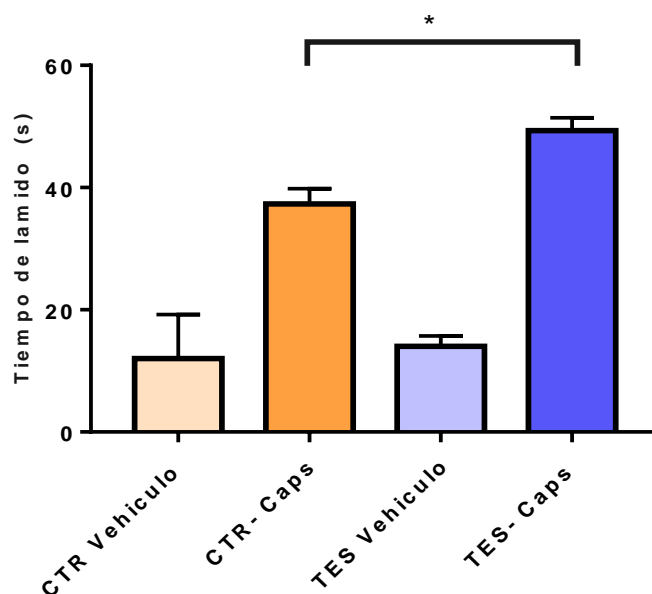


Figura 5. Evaluación de la respuesta a capsaicina en ratones pretratados con testosterona. La gráfica muestra un aumento en el tiempo de la conducta asociada a dolor producido por capsaicina en ratones pretratados con testosterona (TES). Estos ratones presentaron un tiempo de lamido en promedio de 49.3 ± 1.2 segundos, significativamente mayor que el grupo control pretratado con solución control 37.3 ± 1.4 segundos. Para los controles con el vehículo de capsaicina no presentan diferencias significativas CTR Vehículo (12 ± 4.1 segundos) y TES Vehículo (14 ± 1.0 segundos).

5.3 Detección de la expresión del receptor de andrógenos en cultivos primarios de neuronas DRG.

Nuestros resultados muestran que la testosterona produce sensibilización en los nociceptores de manera dependiente del canal TRPV1. A nivel molecular este efecto, podría producirse a través de los efectos clásicos (genómicos) de la testosterona ejercidos a través del receptor a andrógenos, el cual regula la expresión de genes blanco.

A partir de esta idea, fue necesario determinar si el receptor de andrógenos se expresa en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal de ratón, células donde se expresa abundantemente el canal TRPV1. A partir de extracto de proteínas totales

de cultivos primarios de neuronas DRG y mediante ensayo de Western Blot se procedió a determinar la presencia del este factor de transcripción, cuya expresión resulto positiva en estas células, observándose una señal a la altura del peso molecular esperado (alrededor de 110 kDa), a la misma altura que la señal observada en la muestra de testículo la cual corresponde al control positivo de expresión del receptor a andrógeno (Figura 6).

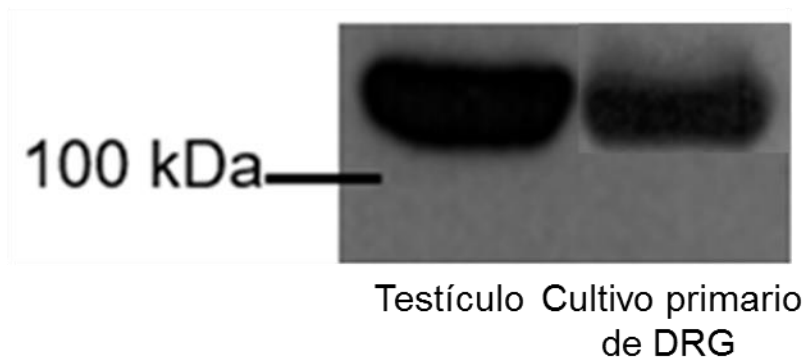


Figura 6. Inmunodetección del Receptor Andrógeno (AR). La identificación del AR se realizó en proteína total obtenida de cultivos primarios de neuronas de ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratón (derecha), como control positivo de la expresión del AR se usó extracto de proteína total de testículo de ratón (izquierda).

5.4 Determinación de los niveles de ARNm de TRPV1 en neuronas DRG tratadas con testosterona.

Una vez identificada la expresión del receptor de andrógenos en los cultivos primarios de neuronas DRG, se evaluó si la testosterona modificaba la expresión del gen TRPV1. Para ello, se realizaron cultivos primarios de neuronas DRG tratados con 100nM del esteroide por 24 horas y cultivos sin tratamiento. A partir de estos cultivos se realizó la extracción de ARN total para llevar a cabo experimentos de RT-PCR-semicuantitativa y determinar posibles cambios en la cantidad de ARNm de TRPV1 por el tratamiento con testosterona. Para un adecuado análisis de resultados, se buscó obtener las fases exponenciales para los dos blancos de amplificación TRPV1 y actina (control de expresión endógeno), una vez que estos

puntos fueron identificados se procedió a una evaluación por densitometría de las bandas obtenidas en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 7a). Los resultados muestran una tendencia al aumento a nivel de ARN mensajero en un 13.5% por efecto de esta hormona (Figura 7b), aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas, se puede concluir que existe una tendencia al aumento en la transcripción del gen TRPV1 por acción de la testosterona y el AR.

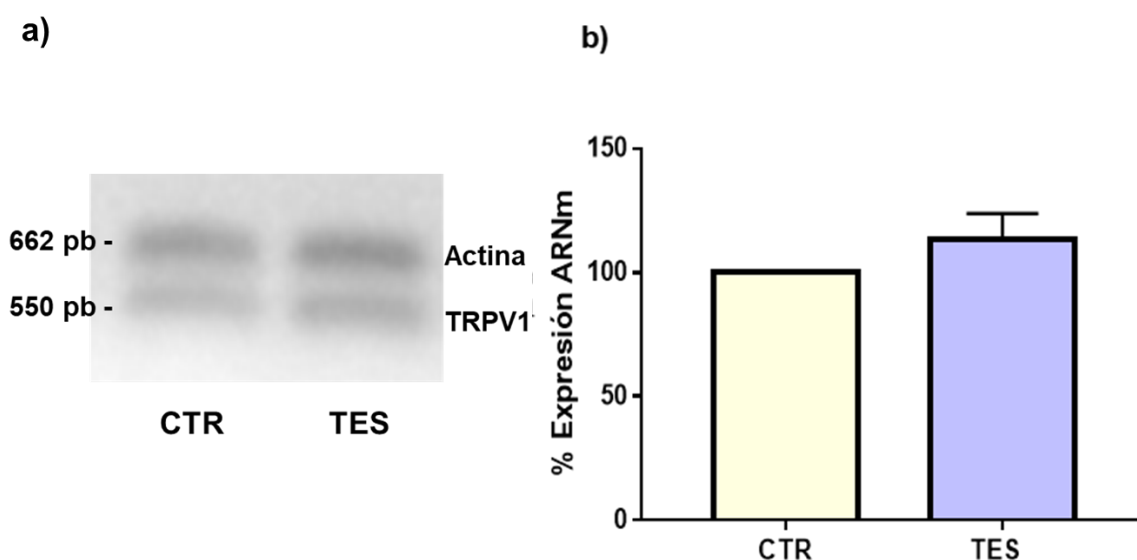


Figura 7. Efecto de la testosterona a nivel de ARNm del canal TRPV1. a) Gel de agarosa al 1.5% para ARNm de TRPV1 y actina como control de carga en ensayo de PCR-semicuantitativa. b) La gráfica muestra los datos normalizados de la densitometría del canal TRPV1 con respecto al control de carga (actina). La barra azul (TES) muestra un aumento del 13.5% en la cantidad de ARNm de TRPV1 por efecto del tratamiento de 100nM de testosterona con respecto a la condición control. Los datos fueron analizados por prueba T-student no pareada.

5.5 Determinación de los niveles de proteína TRPV1 en neuronas DRG tratadas con testosterona.

Como siguiente paso se determinó si la modificación en la transcripción de TRPV1 generaba cambios importantes a nivel de proteína. Para ello, se trabajó también con cultivos primarios de neuronas DRG tratados con 100 nM de testosterona y cultivos

control, a partir de ellos cuales se realizó la extracción de las proteínas totales. Con anticuerpos específicos para la detección de TRPV1 se observó que la cantidad de proteína con el tratamiento de testosterona aumenta. La diferencia que se obtuvo fue de aproximadamente del 63.31% más de la proteína de TRPV1 con respecto al cultivo control (Figura 8). A diferencia del ARNm el aumento de la proteína fue significativamente diferente y alrededor de 6 veces más que este.

Retomando los primeros datos obtenidos por ensayos de conducta que mostraron cambios en la sensibilidad de los ratones después de 24 horas de la aplicación de testosterona y sumado a los resultados obtenidos en cultivos primarios de estos experimentos sobre la tendencia al aumento en la cantidad de ARNm, podemos observar que en ese periodo de tiempo de igual manera existen cambios que son perceptibles a nivel de proteína.

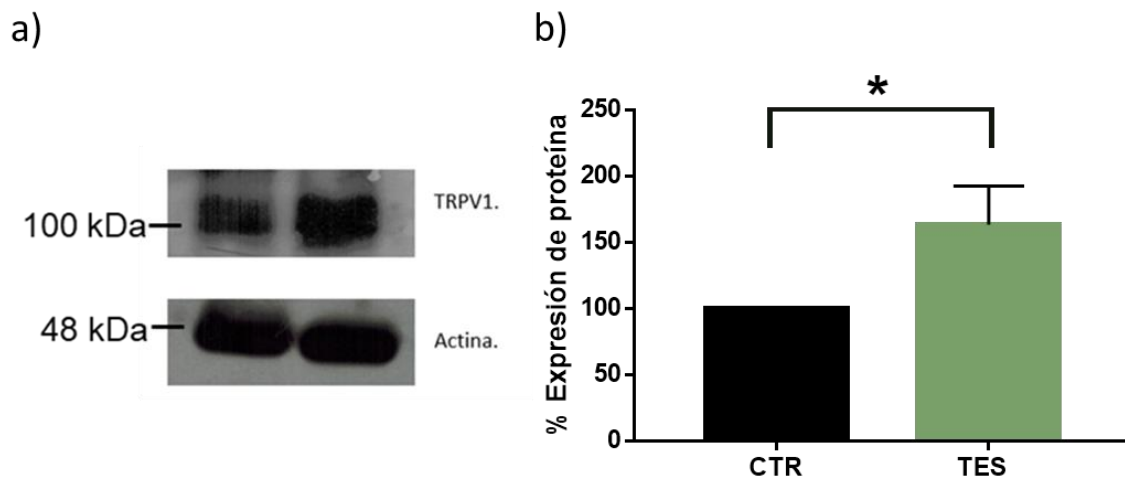


Figura 8. Efecto de la testosterona sobre los niveles proteínicos de TRPV1.

a) Western Blot para el canal TRPV1 y proteína actina b) La gráfica muestra los datos normalizados de la densitometría del canal TRPV1 con respecto al control de carga (actina). La barra más oscura muestra un aumento del 63.31% en la cantidad del canal TRPV1 por efecto de la testosterona con respecto a la condición control.

5.6 Determinación de posibles sitios de interacción para el Receptor de Andrógenos en la región 5' del gen TRPV1.

Otra aproximación para establecer una relación entre el factor de transcripción, TRPV1 y los cambios observados por el tratamiento con testosterona fue a través del uso de bases de datos que permiten predecir una interacción directa entre el AR y el gen de TRPV1.

Utilizando la base de datos JASPAR se analizó si el AR específico de ratón puede interactuar con sitios putativos en una región analizada de 1500 pares de bases río arriba del exón 1 del gen TRPV1, sitio que podría contener al promotor de dicho gen. Con parámetros de umbral de puntaje de perfil relativo del 70 % los datos arrojados por JASPAR muestran diez sitios probables de interacción, de los cuales tres de ellos tienen una buena probabilidad (Figura 9); esto refuerza la hipótesis de la modulación del canal TRPV1 por un mecanismo de acción clásico de testosterona.

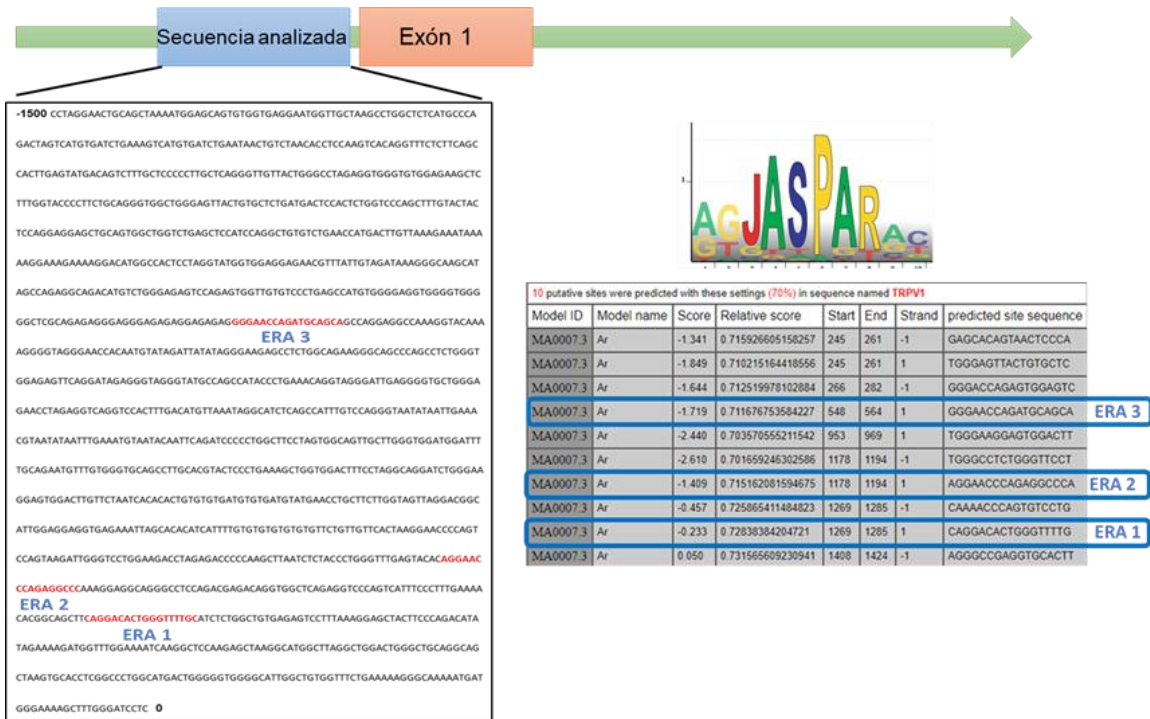


Figura 9. Posibles sitios de unión para el Receptor de Andr6genos en la secuencia analizada de TRPV1. Esquema representativo de la ubicaci6n de los sitios con mayor probabilidad de interacci6n con el Receptor de Andr6genos que seala los tres posibles elementos de respuesta a andr6genos (ERA) en la secuencia analizada (1500 pares de bases rio arriba del ex6n 1 de TRPV1).

6. Discusión.

En el presente estudio se determinaron los efectos de la testosterona en el dolor producido mediante el canal TRPV1 y en la regulación de la expresión de este canal.

Los datos obtenidos a través de ensayos conductuales muestran que este esteroide produce dolor cuando es inyectado en la extremidad delantera de ratones macho y que este efecto depende de la presencia del canal TRPV1, ya que en ratones que carecen de la expresión de este canal (V1-KO) la respuesta es nula.

En este sentido, se sabe que los andrógenos pueden actuar sobre blancos específicos en la membrana plasmática de muchos tipos de células incluyendo neuronas, entre ellos canales iónicos (Michels y Hoppe, 2008). Asuthkar y colaboradores en 2015 determinaron que TRPM8, otro canal de la familia TRP involucrado en la nocicepción, funciona como receptor específico de testosterona. Este esteroide es capaz de producir corrientes de calcio en neuronas de ganglio de la raíz dorsal de manera dependiente del canal TRPM8 (Asuthkar et al. 2015). Además, mediante ensayos de inmunoprecipitación, ELISA y Dot Blot se demostró que la testosterona interacciona directamente con el canal TRPM8 y no con el canal TRPV1. A diferencia de lo reportado para testosterona en los estudios antes mencionados, la dehidroepiandrosterona (DHEA, precursor de la testosterona) puede actuar como inhibidor de TRPV1. En registros de célula completa de neuronas DRG de rata la aplicación de DHEA reduce las corrientes generadas por capsaicina, efecto no observado con la aplicación de testosterona. Demostrando que moléculas con estructura similar a este esteroide pueden interactuar con el canal (Cheng et al. 2004).

Aunque hasta el momento, experimentalmente sólo se ha demostrado que la testosterona puede activar a un solo miembro de la familia de canales iónicos TRP (TRPM8), es claro que este esteroide posee la capacidad de interactuar directamente con blancos ubicados en la membrana plasmática y no tan solo con su receptor clásico, el receptor de andrógenos.

Además de una interacción directa con canales iónicos, hay evidencia de efectos rápidos de la testosterona que ocurren en periodos de tiempo de segundos a minutos (Foradori et al. 2008). Estos son mediados por receptores de andrógenos que se encuentran unidos en la membrana plasmática, posiblemente asociados a proteínas G, que son capaces de desencadenar cascadas de señalización. (Shihan et al. 2014). En particular, células de neuroblastoma tratadas con testosterona presentan cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular que depende de la producción de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y la consecuente liberación de Ca^{2+} de las reservas celulares (Estrada et al. 2006). La producción de IP_3 es resultado de la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC). PLC hidroliza al fosfolípido de membrana fosfoatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e IP_3 (Lounsbury 2009). Se ha reportado que la administración de andrógenos es capaz de inducir la activación de esta vía (Foradori et al. 2008). La hidrólisis de PIP_2 puede producir dos efectos sobre TRPV1. El primero se relaciona con el DAG, esta molécula participa como un agonista parcial de TRPV1 promoviendo su activación (Woo et al. 2008). El segundo es una regulación por PIP_2 que hasta el momento se han presentado evidencias experimentales de un efecto dual, es decir, existen estudios que describen a PIP_2 como factor que modula positivamente la actividad del canal, por otro lado, se ha reportado que esto puede tener efectos contrarios (Morales et al. 2013; Rohacs et al. 2008).

Ya sea por interacción directa o a través de productos de cascadas de señalización la testosterona podría estar promoviendo la activación de TRPV1 y una posterior respuesta de dolor (Figura 10). Aunque la información anteriormente mencionada sugiere que el mecanismo de acción es de manera indirecta sobre dicho canal.

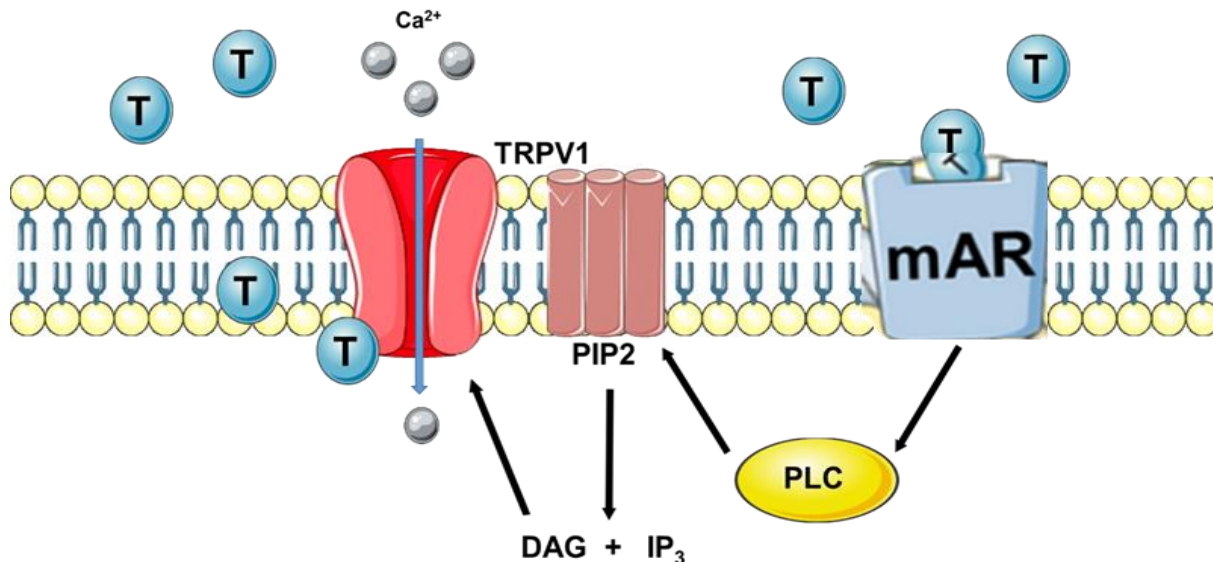


Figura 10. Posible mecanismo de acción para el efecto agudo de la testosterona sobre el canal TRPV1. Activación de TRPV1 por unión directa de testosterona o a través de la activación de receptores ubicados en membrana que promueven la producción de moléculas activadoras del canal (DAG).

De manera interesante los datos de ensayos conductuales también dieron indicios de efectos de sensibilización a nivel sistémico después de 24 horas de la inyección de 3 µg de testosterona. La aplicación de un estímulo no nocivo (inyección con solución salina y vehículo) presentó una respuesta dolorosa significativamente mayor en ratones WT en comparación con ratones V1-KO y control. Adicionalmente, los experimentos en los que 24 horas postratamiento con testosterona, los ratones se inyectaron en la extremidad delantera con el agonista del canal TRPV1 también mostraron una disminución en el umbral de dolor a capsaicina, en comparación de los animales control. Nuestros resultados prueban que efectivamente los ratones con un pretratamiento de testosterona presentan una respuesta exacerbada al agonista específico de TRPV1, capsaicina. Esto demuestra que este andrógeno puede producir sensibilización en ratones después de 24 horas de su administración y que esta sensibilización de los nociceptores es altamente dependiente del canal TRPV1; efecto que puede ocurrir por un aumento en la expresión del canal TRPV1

y/o por una reducción en el umbral de activación del mismo (por ejemplo, fosforilación del canal) (Morales et al. 2013).

La inmunodetección del AR en cultivos primarios de neuronas DRG nos proporcionó una posibilidad de que los efectos de la testosterona promovieran la regulación positiva a nivel transcripcional del gen TRPV1. Previamente Lee y colaboradores en 2013, reportaron la presencia del AR a nivel de proteína y ARNm en ganglios del trigémino (TG), pero no en DRG. Posteriormente este mismo grupo de investigación demostró por ensayos de inmunohistoquímica la co-expresión de AR y TRPV1 en un subconjunto de neuronas de pequeño y mediano diámetro del TG. Con base en lo anterior sugirieron una posible modulación de TRPV1 por este factor de transcripción, aunque no fue demostrado (Lee et al. 2016). Interesantemente, también se ha detectado la expresión de receptores a estrógeno α y β en células de pequeño diámetro en DRG (Chaban y Micevych. 2005), lo que resalta la importancia de los esteroides y sus receptores en regular la fisiología de las neuronas nociceptivas.

Los datos obtenidos, además, muestran que la testosterona produce un aumento en la expresión del gen TRPV1 a nivel de ARNm y proteína en cultivos primarios de neuronas de DRG. La evaluación por PCR-semicuantitativa después de 24 horas del tratamiento de 100 nM del esteroide indica una tendencia a la regulación positiva de la transcripción del gen TRPV1 con respecto al control. La PCR-semicuantitativa es una técnica útil para estimar las cantidades relativas de ARNm en una determinada muestra, pero presenta ciertas limitaciones en la sensibilidad y precisión de sus resultados (Chen et al. 1999). A pesar de esto, los resultados señalan una clara tendencia al aumento de ARNm. Sin embargo, es necesario hacer uso de técnicas más precisas como la PCR cuantitativa en tiempo real (Marone et al. 2001), esto nos permitirá en estudios posteriores determinar de manera exacta el efecto de la testosterona sobre la transcripción del gen TRPV1.

Sumado a esto, el análisis bioinformático, refuerza la idea de una regulación transcripcional de TRPV1 por parte del AR y testosterona, ya que los tres probables sitios de interacción del AR (elementos de respuesta a andrógenos) encontrados río

arriba del Exón 1 del gen de TRPV1 representan una prueba más de ello. Estos elementos de respuesta a hormonas han sido también reportados para otros miembros de la familia TRP tanto para andrógenos como otras hormonas esteroideas (Kummar et al. 2015). Específicamente el gen de TRPM8 posee un elemento de respuesta a andrógenos que se ha determinado es clave en la regulación positiva de este canal en cáncer de próstata (Asuthkar et al. 2015).

Para el caso de la proteína de TRPV1 se determinó que el tratamiento de testosterona conduce a un aumento en la cantidad total de esta. En conjunto con una regulación positiva de la transcripción del gen, existen otras formas que pueden producir aumento en los niveles de una proteína. Para el caso del canal TRPV1, se ha demostrado que la enzima PKA fosforila a TRPV1 promoviendo la inserción del canal en la membrana plasmática y destacablemente inhibe la internalización y degradación de TRPV1, aumentando los niveles proteicos del canal y en consecuencia favorece la sensibilización del mismo (Sanz et al. 2012). Se ha propuesto que parte de los efectos rápidos de los andrógenos es la activación de PKA por vías de señalización que son activadas después de la aplicación de testosterona (Michels y Hoppe, 2008). De ser así en neuronas nociceptoras este efecto puede contribuir al aumento de proteína de TRPV1 al reducir la internalización y degradación del canal. Experimentos específicos que inhiban a PKA permitirán determinar si esta enzima participa como parte de los efectos de testosterona.

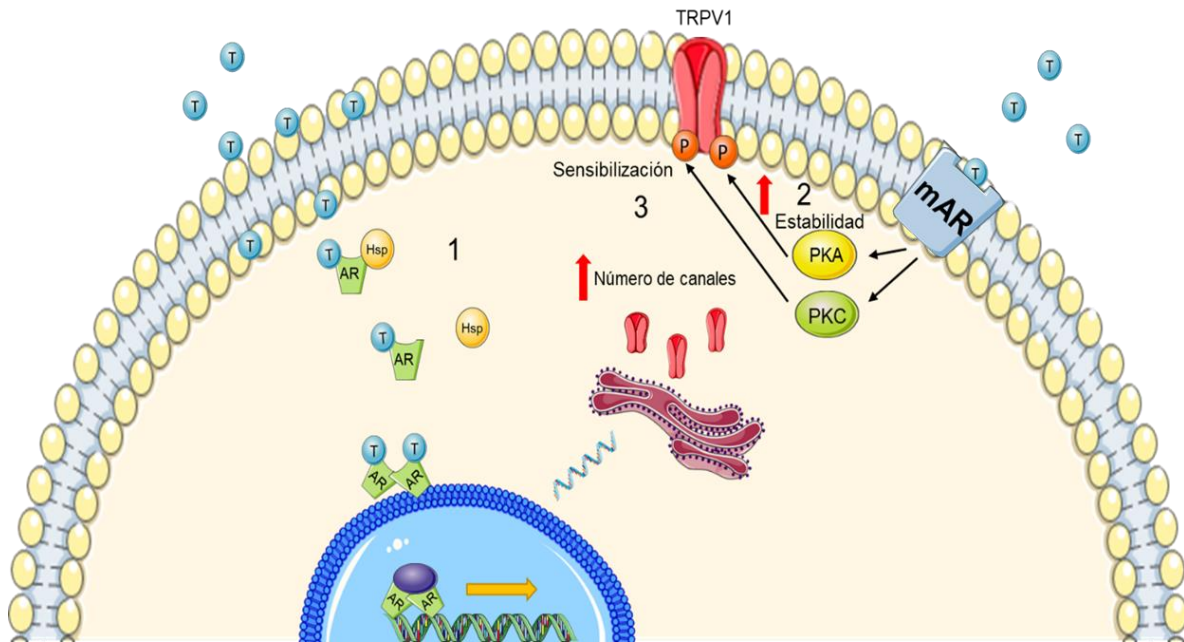


Figura 11. Posible mecanismo molecular para la regulación de TRPV1 por efecto de testosterona. 1) Modulación positiva de la transcripción del canal TRPV1 a través del mecanismo de acción clásico de los andrógenos que produce el aumento de número de canales. 2) Activación de PKA por vías de señalización por un AR de membrana (mAR) que produce la fosforilación de TRPV1 aumentando su estabilidad y disminuye su degradación. 3) Activación de PKC por vías de señalización por un mAR que produce la fosforilación de TRPV1, esta acción sensibiliza al canal y disminuye su umbral de activación.

Como se mencionó al inicio de este trabajo de investigación, existe únicamente un estudio que relaciona directamente a TRPV1 y su regulación por testosterona. En contraste con los datos aquí presentados, Bai y colaboradores en 2018 reportan que la testosterona actúa como un regulador negativo de la expresión de TRPV1. En este sentido cabe mencionar que existen diferencias entre las condiciones de ambos estudios. Bai y colaboradores utilizan un modelo de inflamación inducido por CFA a partir del cual determinan los efectos de este esteroide. Existe evidencia acerca de la acción de testosterona como agente antiinflamatorio por inhibición de producción de citosinas (Bianchi 2018), lo que podrían alterar los resultados de la acción de la testosterona sobre TRPV1, lo cual es nuestro objetivo. Es por ello, que resulta importante determinar si el AR se une directamente a regiones del gen TRPV1 importantes para su regulación transcripcional y los efectos que pudiera

tener esta interacción, es decir, promover o reprimir la transcripción de este gen. Esto se plantea como una perspectiva de este trabajo.

7. Conclusiones

Los ensayos de conducta de dolor mostraron que la aplicación de testosterona produce dolor agudo en ratones silvestres y que esta respuesta depende de la presencia del canal TRPV1.

La respuesta de dolor generada por capsaicina es mayor en ratones pretratados con testosterona, lo que indica efectos a largo plazo del esteroide sobre TRPV1.

El Receptor de Andrógenos es expresado en neuronas del ganglio de la raíz dorsal.

La testosterona aumenta la expresión de ARNm y la cantidad de proteína de TRPV1 en cultivos primarios de neuronas del ganglio de la raíz dorsal después de 24 horas de tratamiento a una concentración de 100 nM.

Mediante análisis *in silico* se determinó que hay tres sitios putativos de unión para el Receptor de Andrógenos de ratón en la región analizada de 1500 pares de bases río arriba del exón 1 de TRPV1.

8. Perspectivas

Evaluar las hipótesis propuestas como mecanismo para la respuesta de dolor agudo generada por la aplicación de testosterona.

En ratones pretratados con testosterona medir la modificación de expresión de TRPV1 a nivel de ARNm y Proteína, para determinar si los efectos ocurren de la misma forma en un modelo *in vivo*.

Realizar ensayos de Inmunocitoquímica para colocalizar el AR y el canal de TRPV1 para reforzar la hipótesis de interacción.

Mediante ensayos de PCR cuantitativa determinar con mayor precisión la modificación en la transcripción de TRPV1.

En ratones gonadectomizados determinar el efecto de la falta de testosterona sobre la expresión de TRPV1 (proteína y ARNm) y la respuesta al dolor por capsaicina.

Utilizar inhibidores específicos del AR para determinar si existe alguna vía no clásica que puedan regular al canal TRPV1.

9. Referencias

Artero, M., Gonzalez Rodriguez, S., & Ferrer-Montiel, A. (2018). TRP channels as potential targets for sex-related differences in migraine pain. *Frontiers in molecular biosciences*, 5, 73.

Asuthkar, S. Elustondo, P.A. Demirkhanyan, L. Sun, X. Baskaran, P. Velpula, K.K. Thyagarajan, B. Pavlov, E.V. Zakharian, E. (2015). The TRPM8 protein is a testosterone receptor: I. Biochemical evidence for direct TRPM8-testosterone interactions. *J. Biol. Chem.*290, 2659–2669.

Asuthkar, S. Demirkhanyan, L. Sun, X. Elustondo, P.A. Krishnan, V. Baskaran, P. Velpula, K.K. Thyagarajan, B. Pavlov, E.V. Zakharian, E. (2015). The TRPM8 protein is a testosterone receptor: II. Functional evidence for an ionotropic effect of testosterone on TRPM8. *J. Biol. Chem.*

Bai, X., Zhang, X., & Zhou, Q. (2018). Effect of testosterone on TRPV1 expression in a model of orofacial myositis pain in the rat. *Journal of Molecular Neuroscience*, 64(1), 93-101.

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267-284.

Bevan, S., Quallo, T., & Andersson, D. A. (2014). Trpv1. In *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels* (pp. 207-245). Springer, Berlin, Heidelberg.

Bianchi, V. E. (2018). The anti-inflammatory effects of testosterone. *Journal of the Endocrine Society*, 3(1), 91-107.

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(6653), 816.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., & Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *science*, 288(5464), 306-313.

Chaban, V. V., & Micevych, P. E. (2005). Estrogen receptor- α mediates estradiol attenuation of ATP-induced Ca^{2+} signaling in mouse dorsal root ganglion neurons. *Journal of neuroscience research*, 81(1), 31-37.

Chen, S. C., Chang, T. J., & Wu, F. S. (2004). Competitive inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by dehydroepiandrosterone in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2), 529-536.

Chen, L., Segal, D. M., & Mash, D. C. (1999). Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction: an approach for the measurement of target gene expression in human brain. *Brain Research Protocols*, 4(2), 132-139.

Cho, T., & Chaban, V. V. (2012). Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors- α and estrogen receptor- β knock-out mice. *Neuroreport*, 23(9), 530.

Contreras, J., Duong, P., Snyder, B. D., Schreihofner, D. A., & Cunningham, R. L. (2017). Presence of androgen receptor variant in neuronal lipid rafts. *eNeuro*, 4(4).

Cutress, M. L., Whitaker, H. C., Mills, I. G., Stewart, M., & Neal, D. E. (2008). Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *Journal of cell science*, 121(7), 957-968.

Dubin, A. E., Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3760-3772.

Edelsztein, N. Y., & Rey, R. A. (2019). Importance of the androgen receptor signaling in gene transactivation and transrepression for pubertal maturation of the testis. *Cells*, 8(8), 861.

Estrada, M., Uhlen, P., & Ehrlich, B. E. (2006). Ca^{2+} oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth. *Journal of cell science*, 119(4), 733-743.

Foradori, C. D., Weiser, M. J., & Handa, R. J. (2008). Non-genomic actions of androgens. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 169-181.

Foulkes, T., & Wood, J. N. (2008). Pain genes. *PLoS genetics*, 4(7), e1000086.

- Gao, T., & McPhaul, M. J. (1998). Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Molecular Endocrinology*, 12(5), 654-663.
- Gavini, K., & Parameshwaran, K. (2019). Western Blot (Protein Immunoblot). In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Ghannam, M. G., & Varacallo, M. (2018). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR). In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing
- Juárez-Contreras, R., Rosenbaum, T. L. R., & Morales-Lázaro, S. L. (2018). Lysophosphatidic acid and ion channels as molecular mediators of pain. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 462.
- Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J. A., van der Lee, R., & Baranasic, D. (2017). JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic acids research*, 46(D1).
- Kaneko, Y., & Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *British journal of pharmacology*, 171(10), 2474-2507.
- Katz, B., Payne, R., & Minke, B. (2017). TRP channels in vision. In *Neurobiology of TRP Channels*. 2nd edition. CRC Press/Taylor & Francis.
- King, N., & O'Connell, D. J. (Eds.). (2010). *RT-PCR Protocols*. New York: Humana Press.
- Kumar, A., Kumari, S., Majhi, R. K., Swain, N., Yadav, M., & Goswami, C. (2015). Regulation of TRP channels by steroids: implications in physiology and diseases. *General and comparative endocrinology*, 220, 23-32.
- Kuner, R. (2010). Central mechanisms of pathological pain. *Nature medicine*, 16(11), 1258.

Lee, K. S., Zhang, Y., Asgar, J., Auh, Q. S., Chung, M. K., & Ro, J. Y. (2016). Androgen receptor transcriptionally regulates μ -opioid receptor expression in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience*, 331, 52-61.

Lee, K. S., Asgar, J., Zhang, Y., Chung, M. K., & Ro, J. Y. (2013). The role of androgen receptor in transcriptional modulation of cannabinoid receptor type 1 gene in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience*, 254, 395-403.

Lee, D. K., & Chang, C. (2003). Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(9), 4043-4054.

Li, H. (2017). TRP channel classification. In *Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases* (pp. 1-8). Springer, Dordrecht.

Lounsbury, K. (2009). Signal Transduction and Second Messengers. In *Pharmacology* (pp. 103-112). Academic Press.

Marone, M., Mozzetti, S., De Ritis, D., Pierelli, L., & Scambia, G. (2001). Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological procedures online*, 3(1), 19.

Michels, G., & Hoppe, U. C. (2008). Rapid actions of androgens. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 182-198.

Morales, S. L., Simon, S. A., & Rosenbaum, T. (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *The Journal of physiology*, 591(13), 3109-3121.

Morales, S.L, Rosenbaum, T., & Simon, S. (2014). A portal to pain: the transient receptor potential (TRP) vanilloid 1 channel. *Physiology*, (94)..

Mukaddam, M., & Snyder, P. J. (2013). Androgens. In *Osteoporosis* (pp. 1827-1837). Academic Press.

Naziroğlu, M., & Braidly, N. (2017). Thermo-sensitive TRP channels: novel targets for treating chemotherapy-induced peripheral pain. *Frontiers in physiology*, 8, 1040.

Ortíz, M., Juárez-Contreras, R., González-Ramírez, R., Islas, L. D., Sierra-Ramírez, F., Llorente, I. & Morales-Lázaro, S. L. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7), E1657-E1666.

Payrits, M., Ságghy, É., Csekő, K., Pohóczky, K., Bölcskei, K., Ernszt, D., ... & Szőke, É. (2017). Estradiol sensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in pain responses. *Endocrinology*, 158(10), 3249-3258.

Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell calcium*, 38(3-4), 233-252.

Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 619-647.

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb-prot5439.

Rohacs, T., Thyagarajan, B., & Lukacs, V. (2008). Phospholipase C mediated modulation of TRPV1 channels. *Molecular neurobiology*, 37(2-3), 153.

Rosasco, M. G., & Gordon, S. E. (2017). TRP Channels: What Do They Look Like?. *Neurobiology of TRP Channels*. 2nd edition.

Rosenbaum, T., & Simon, S. A. (2006). TRPV1 receptors and signal transduction. In *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades* (pp. 83-98). CRC Press.

Sanz, L., Andrés-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., & Planells-Cases, R. (2012). Agonist-and Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19462-19471.

Shihan, M., Buldan, A., & Scheiner-Bobis, G. (2014). Non-classical testosterone signaling is mediated by a G-protein-coupled receptor interacting with Gnα11. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(6), 1172-1181.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.

Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 67(1), 6-20.

Stormo, G. D. (2013). Modeling the specificity of protein-DNA interactions. *Quant. Biol.*, 1, 115–130.

Szallasi, A., & Blumberg, P. M. (2006). Complex regulation of TRPV1 by vanilloids. In *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades* (pp. 99-118). CRC Press.

Sneddon, L. U. (2017). Comparative physiology of nociception and pain. *Physiology*, 33(1), 63-73.

Woo, D. H., Jung, S. J., Zhu, M. H., Park, C. K., Kim, Y. H., Oh, S. B., & Lee, C. J. (2008). Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Molecular pain*, 4(1), 42.

Zheng, J. (2013). Molecular mechanism of TRP channels. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 221-242.

Zumbo, P. (2014). Phenol-chloroform extraction. Weill Cornell Medical College. Available online at <http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENOL-CHLOROFORM.pdf>.