



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TRPV1 POR ACCIÓN DEL RECEPTOR
DE ANDRÓGENOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Óscar Enciso Pablo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Sara Luz Morales Lázaro (Instituto de Fisiología celular, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Myrian Velasco Torres (Instituto de Fisiología celular, UNAM)
Dr. José de la Luz Díaz Chávez (Instituto Nacional de Cancerología)

Ciudad de México, Julio, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos institucionales.

- Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.
- Este trabajo fue apoyado por el FORDECYT-PRONACES (FORDECYT-PRONACES/64392/2020) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- También recibió apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN206819.
- Al CONACyT por el apoyo económico brindado con la beca para alumnos nacionales con número 1047792
- A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro del Instituto de Fisiología Celular, UNAM quien participó como tutor principal de este proyecto
- Al comité tutor integrado por la Dra. Myrian Velasco Torres y el Dr. José de la Luz Díaz Chávez

Agradecimientos Formales.

- A los revisores de tesis la Dra. Stephanie Colette Thebault, Dr. Gómora Martínez Juan Carlos, Dr. Luis Baltazar Enoch, Dr. Camacho Arroyo Ignacio y Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez 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 y hermanas. Gracias por todo el apoyo y su cariño. Gracias a ustedes he podido llegar hasta aquí.

A Blanca. Gracias por todo lo que me sigues enseñando, sin importar nada me haces querer ser mejor.

A mis amigos Elizabeth, Esteban y Ary. Les agradezco por su apoyo y los buenos momentos.

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 compañeros de laboratorio, Angelica, Rebeca y Miguel por su apoyo, consejos y ayuda para seguir mejorando mi formación.

Índice

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | 1 |
| Resumen | 2 |
| Introducción | 4 |
| Nocicepción | 4 |
| Receptores de Potencial Transitorio (TRP) en la nocicepción | 6 |
| Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide tipo 1 (TRPV1) | 8 |
| Modulación de TRPV1 por hormonas sexuales | 11 |
| Receptor de Andrógenos | 13 |
| Antecedentes directos | 17 |
| Hipótesis | 21 |
| Objetivo | 21 |
| Objetivos particulares | 21 |
| Metodología | 22 |
| Animales | 22 |
| Cultivos primarios de neuronas de DRG | 22 |
| Tratamientos de Testosterona | 23 |
| Extracción de ARN | 23 |
| Ensayos de qRT-PCR | 24 |
| Cultivo celular | 26 |
| Transfección | 26 |
| Obtención de proteína y cuantificación | 27 |
| Ensayos de Western Blot | 28 |

| | |
|---|----|
| Caracterización de la expresión del Receptor de andrógenos por PCR punto final | 30 |
| Clonación del Receptor de Andrógenos | 32 |
| Análisis in sillico | 33 |
| Análisis estadístico | |
| Resultados | 34 |
| Efecto de Testosterona sobre los niveles de ARNm de TRPV1 y el Receptor de Andrógenos | 34 |
| Efecto de Testosterona sobre los niveles proteicos de TRPV1 y el Receptor de Andrógenos | 37 |
| Caracterización de la expresión del Receptor de Andrógenos en la línea celular HEK 293 | 42 |
| Efecto de la Testosterona sobre los niveles proteicos de TRPV1 independiente del Receptor de Andrógenos (acciones no genómicas) | 44 |
| Acciones no clásicas del Receptor de Andrógenos sobre TRPV1 | 45 |
| Análisis bioinformático de posibles sitios de unión para el Receptor de Andrógenos en la región promotora de TRPV1 | 49 |
| Discusión | 54 |
| Conclusiones | 63 |
| Referencias | 64 |

Abreviaturas

| | |
|--|--|
| ADN: Ácido Desoxirribonucleico | kDa: Kilo Dáltones |
| ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario | NFG: Factor de crecimiento nervioso |
| AR: Receptor de Andrógenos | nM: Nano molar |
| ARN: Ácido Ribonucleico | PBST: Buffer de fosfatos con tween 20 al 0.1% |
| ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero | PVDF: Polivinilideno fluorido |
| ATP: Adenosín trifosfato | PKA: Proteína cinasa A |
| BSA: Albumina de suero bovino | PKC: Proteína cinasa C |
| CaMKII: Calcio calmodulina cinasa II | RT: Transcripción inversa |
| CFA: Adyuvante Completo de Freud | PCR: Reacción en cadena de la polimerasa |
| ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina | Sig-1R: Receptor Sigma 1 |
| Ct: Ciclo umbral | Sp1: proteína de especificidad 1 |
| D10: Medio DMEM complementado | Sp4: proteína de especificidad 4 |
| DMEM: Dulbecco's Modified EagleMedium | TG: Ganglios del Trigémino |
| DRG: Ganglios de la raíz dorsal | TRP: Receptor del Potencial Transitorio |
| ER: Receptor de Estrógenos | TRPM8: Receptor de Potencial Transitorio Melastatina tipo 8 |
| ERA: Elemento de Respuesta a Andrógenos | TRPV1: Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide tipo 1 |
| GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. | V.V.: Vector vacío |
| HEK-293: Línea celular de riñón de embrión humano (Human Embryonic Kidney). | |

Resumen

El Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide tipo 1 (TRPV1) es una proteína que se expresa principalmente en neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y ganglios del trigémino (TG) y que funciona como un canal catiónico no selectivo. Este receptor actúa como un sensor de estímulos térmicos y químicos que se encuentran dentro del rango nocivo, siendo fundamental para el proceso de la nocicepción. Además, TRPV1 participa en el desarrollo de dolor de tipo crónico, por lo que se le considera un blanco molecular importante en la búsqueda de alternativas terapéuticas que disminuyan el dolor asociado a su activación. Durante los últimos años, el estudio de la influencia del sexo en el procesamiento de estímulos dañinos ha comenzado a tener una relevancia significativa en los campos de la nocicepción y el dolor. Para el caso de TRPV1, muy pocos estudios se han enfocado en evaluar los efectos de los andrógenos en la regulación de este receptor.

En este trabajo, investigamos si la expresión del gen TRPV1 es regulada por la testosterona y por el principal receptor de esta hormona: el receptor de andrógenos (AR). Observamos que, el tratamiento con testosterona en cultivos primarios de DRG en dosis dentro del rango fisiológico (1 y 10 nM) durante 24 h, induce una disminución de los niveles del ARNm de TRPV1, mientras que dosis altas de testosterona (100 nM), que superan el rango fisiológico, no producen cambios significativos. También se evaluaron los niveles de ARNm para el AR, se observó que los cultivos primarios tratados con 1 nM de testosterona producen un aumento en los niveles del AR, mientras que el tratamiento con 10 nM produjo el efecto contrario.

Asimismo, evaluamos si la testosterona modifica los niveles proteicos de TRPV1 y se observó que después de 24 horas de tratamiento con 1 nM, no se observan cambios, a diferencia de los tratamientos con 10 y 100 nM que reducen los niveles proteicos totales de TRPV1. Estos efectos, también fueron evaluados en cultivos primarios tratados con el esteroide durante 48 h, observándose que los tratamientos con 10 y 100 nM mantienen regulando a la baja los niveles proteicos de TRPV1, y sorpresivamente se encontró que el tratamiento con 1 nM de testosterona induce un aumento significativo en los niveles proteicos de TRPV1.

Finalmente, para evaluar efectos no clásicos de la testosterona y su receptor, se realizaron experimentos en la línea celular HEK-293, en las que encontramos que no se expresa el AR. La expresión heteróloga y transitoria de TRPV1 en estas células, nos permitió evaluar si la testosterona afecta los niveles proteínicos de TRPV1, observando que los tratamientos a concentraciones dentro del rango fisiológico (1 y 10 nM) no producen cambios. Además, realizamos ensayos de co-transfección de TRPV1 y el AR en estas células. Bajo estas condiciones se demostró que la presencia del AR aumenta significativamente los niveles proteicos de TRPV1 en ausencia de su ligando. Finalmente, observamos que la regulación positiva del AR sobre TRPV1 es antagonizada por el tratamiento con testosterona. Por lo que proponemos que TRPV1 es regulado negativamente por testosterona a través de un complejo mecanismo asociado a su concentración y una acción dual de su receptor.

Introducción

Nocicepción.

La nocicepción es un proceso fisiológico por el cual estímulos dañinos o potencialmente dañinos de naturaleza mecánica, química o térmica son detectados y convertidos en impulsos eléctricos por neuronas especializadas conocidas como nociceptores (Basbaum et al., 2009). Posteriormente, estas señales se transmiten hasta ciertas regiones del sistema nervioso central donde son interpretadas como dolor agudo o primario y, en consecuencia, se generan conductas apropiadas que contribuyen al bienestar y la supervivencia del organismo (Foulkes y Wood, 2008).

Los nociceptores se componen por una subpoblación de neuronas periféricas de morfología pseudounipolar. Su 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 se bifurca en un extremo que dirige sus terminales para inervación de zonas cutáneas, viscerales o articulaciones, mientras que el otro forma una sinapsis con neuronas de segundo orden para la transmisión de la señal electroquímica hacia el sistema nervioso central (Dubin y Patapoutian, 2010). Las fibras de conducción que se proyectan de los nociceptores se clasifican por la presencia o ausencia de mielina, diámetro y velocidad de conducción (Sneddon, 2017), siendo las fibras A δ y C de tipo polimodal las que destacan por su importancia para el proceso nociceptivo. Las fibras A δ poseen un diámetro medio (2 a 6 μm), están mielinizadas y presentan una velocidad de conducción relativamente rápida (5 - 30 m/s), mientras que las fibras C son de diámetro pequeño (0.4 a 1.2 μm), amielínicas y con una velocidad de conducción lenta (0.5 - 2 m/s) (Basbaum et al., 2009), **Figura 1**.

Además, los nociceptores se caracterizan por expresar en las membranas de sus terminales complejos de proteínas que funcionan como canales iónicos con propiedades biofísicas y moleculares muy particulares. Estos receptores al ser activados por estímulos ambientales dentro del rango nocivo, es decir aquellos que representan un daño real o potencial para el organismo, permiten el paso de cationes al interior de la neurona y en conjunto con canales iónicos dependientes de voltaje, generan un potencial de acción. Son de gran importancia ya que actúan como sensores y transductores de la información ambiental a impulsos eléctricos,

que pueden ser interpretados por el sistema nervioso (Basbaum et al., 2009; Dubin y Patapoutian, 2010).

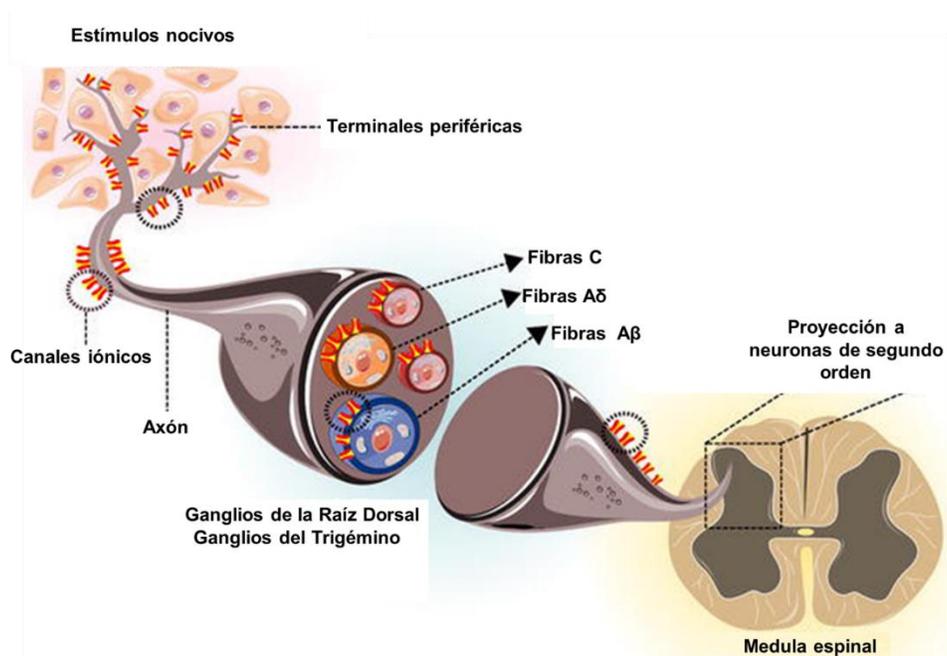


Figura 1. Nocicepción. Los estímulos nocivos se transducen a lo largo de la terminal de neuronas pseudounipolares especializadas (nociceptores), que se clasifican como fibras C no mielinizadas (rojo) y fibras A δ mielinizadas delgadas (naranja); Las fibras A β mielinizadas (azul) transducen estímulos inocuos. Los cuerpos celulares de estas neuronas sensoriales periféricas se localizan en los ganglios de la raíz dorsal y los ganglios del trigémino. Los nociceptores inervan la epidermis y las vísceras, transduciendo estímulos nocivos a través de la activación de varios canales iónicos, como los miembros de la familia TRP. Finalmente, la información se transmite a las neuronas de segundo orden ubicadas en la asta dorsal de la medula espinal. Modificado de Enciso et al., 2021.

Aunque la nocicepción tiene un papel central para la supervivencia, existen condiciones como algunas neuropatologías, donde el proceso nociceptivo se ve alterado y se desarrolla dolor crónico. Esta condición se caracteriza por presentar dolor persistente que reduce la calidad de vida y la utilidad de dicho sistema (Baliki y Apkarian, 2015). A nivel periférico ocurre una reorganización en neuronas aferentes que modifica su sensibilidad por acción de moléculas liberadas durante la inflamación que reduce el umbral de activación y exacerbaban la respuesta a estímulos dolorosos (Basbaum et al., 2009).

Como consecuencia de esto, los tratamientos dirigidos contra el dolor crónico se centran en reducir la producción de moléculas que favorecen el proceso inflamatorio. Adicionalmente, otros enfoques buscan terapias que tienen como objetivo disminuir la actividad de los receptores que participan en la generación de los impulsos eléctricos. En este sentido, un adecuado entendimiento de los receptores involucrados en la nocicepción y los mecanismos que regulan su expresión y activación en contextos fisiológicos normales y patológicos permite establecer estrategias adecuadas para contrarrestar los efectos generados por el dolor crónico (Basbaum et al., 2009).

Receptores de Potencial Transitorio (TRP) en la nocicepción.

Algunos de los receptores que participan en la percepción de estímulos dañinos pertenecen a la familia de Receptores de Potencial Transitorio (TRP, por sus siglas en inglés: Transient Receptor Potential). La familia de canales TRP se clasifica con base a la homología de su secuencia, en total se reconocen 28 canales agrupados en 7 subfamilias: TRPV (Vaniloide), TRPC (Canónica), TRPA (Anquirina), TRPM (Melastatina), TRPP (Policistina), TRPML (Mucolipina) y TRPN (potencial no mecanorreceptor), (Ramsey et al., 2007) (**Figura 2**). En mamíferos se han identificado 27 miembros 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).

Los canales TRP expresados en neuronas nociceptivas son TRPA1, TRPC5, TRPV1-4, TRPM2-3 y TRPM8. Estos receptores se consideran importantes en la producción de la respuesta dolorosa, ya que se activan en respuesta a la exposición de estímulos de tipo mecánico, químico y térmico en el rango nocivo (Mickle et al., 2015). Aunque cada uno de estos canales exhibe características particulares en su estructura y función, en general poseen una arquitectura básica compuesta por homotetrámeros o heterotetrámeros, siendo la primera la más común (Rosasco y Sharona, 2017), y son permeables a cationes, principalmente a Ca^{2+} (Kaneko et al., 2014).

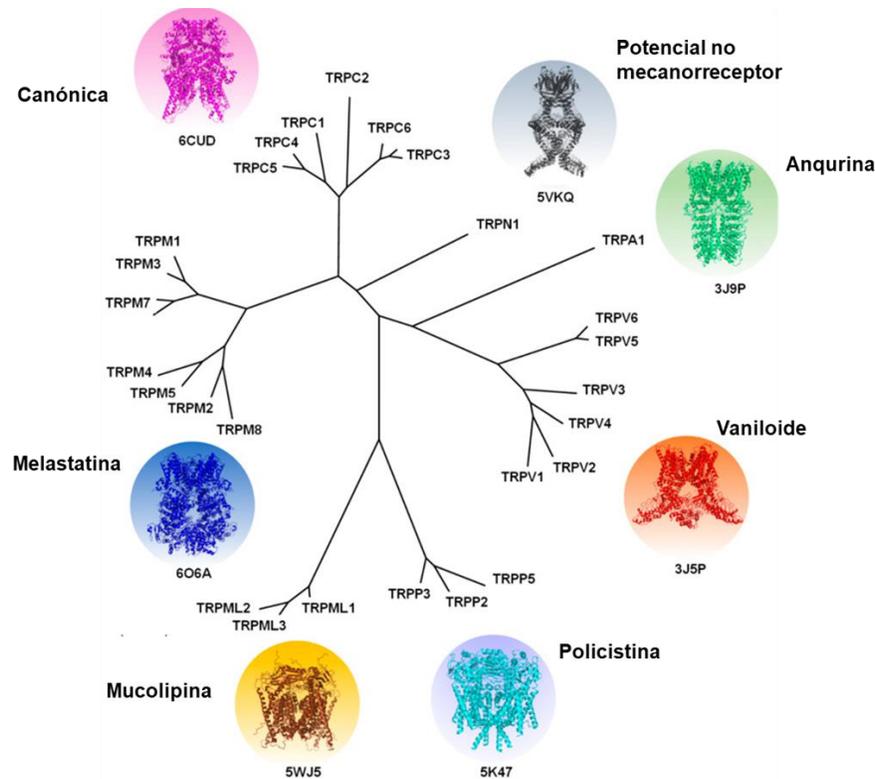


Figura 2 **Árbol filogenético de los Receptores de Potencial Transitorio (TRP).** El análisis de homología de secuencias de proteínas muestra las seis subfamilias TRP presentes en los mamíferos y la subfamilia TRPN (presentada en los vertebrados inferiores). El análisis filogenético muestra las relaciones entre las subfamilias. Los círculos muestran la representación de la estructura 3D para algunos canales TRP: TRPV1 (3J5P), TRPA1 (3J9P), TRPM8 (6O6A), TRPC3 (6CUD), TRPML1 (5WJ5), TRPN1 (5VKQ) y TRPP2 (5K47). Modificado de Méndez et al., 2020.

Otra característica de estos canales es su respuesta de tipo polimodal, es decir que se activan por varios estímulos de distinta naturaleza (Kaneko et al., 2014). Además de su participación en la nocicepción donde su activación produce cambios en el potencial de membrana, estos canales se expresan en otros tejidos, en los que median cambios en el metabolismo celular, inducen endocitosis y exocitosis, por mencionar algunas de sus acciones. De manera, interesante su actividad es modulada por varias moléculas en el interior y exterior de la célula, es por ello que son de gran importancia para múltiples procesos fisiológicos (Zheng, 2013).

Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide tipo 1 (TRPV1).

De manera específica la subfamilia de receptores Vaniloide (TRPV) se compone por seis miembros (V1-V6) (Ramsey et al., 2006). Su nombre deriva del compuesto del tipo vaniloide, la capsaicina, compuesto responsable de la sensación de ardor o picor que producen los chiles y que es un agonista específico del primer miembro caracterizado, el canal TRPV1 (Caterina et al., 1997).

Actualmente TRPV1 es el miembro de la familia de los TRP más estudiado en mamíferos. Además de la capsaicina, TRPV1 también es directamente activado por compuestos como la alicina, la resiniferatoxina y por algunas toxinas de araña (revisado en Enciso et al., 2021). Asimismo, se ha demostrado que se activa por pH ácido extracelular y el pH básico intracelular, y de manera muy interesante, también funciona como un sensor térmico al activarse por calor (≥ 43 °C) (revisado en Enciso et al., 2021).

En humanos el gen de TRPV1 se localiza en el cromosoma 17, a partir de este se transcribe un ARN mensajero (ARNm) que consta de 17 exones los cuales codifican para una proteína de 839 aminoácidos (Beavan et al., 2014). Para el caso de rata y ratón, el gen se localiza en el cromosoma 10 y 11, respectivamente, con un total de 16 exones (Xue et al., 2001). Inicialmente se consideró una proteína exclusiva de neuronas de ganglios sensoriales, principalmente en neuronas sensitivas primarias de pequeño diámetro. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que también se encuentra en distintas áreas del sistema nervioso central (revisado en Morales et al., 2013). Hasta la fecha, se ha identificado su expresión en tejidos no neurales como vejiga, piel, capilares, microvasculatura cerebral, corazón, hígado, vasos y pulmones (Szallasi y Blumberg, 2006).

Estructuralmente, el canal TRPV1 presenta la topología clásica de los TRP (Beavan et al., 2014). Cada una de sus cuatro subunidades se compone de tres dominios: un dominio amino terminal con 6 motivos de repetidos tipo anquirina; el dominio de carboxilo terminal que contiene una secuencia de aminoácidos altamente conservada entre la familia TRP (la caja TRP), la cual es de gran importancia para la interacción de la proteína con lípidos de membrana. Finalmente, posee un

dominio transmembrana compuesto por seis segmentos (S1-S6) de los cuales S5 y S6 forman el poro. Estas subunidades se asocian en forma de homotetrámeros que integran la estructura funcional del canal (revisado en Morales et al., 2013), **Figura 3.**

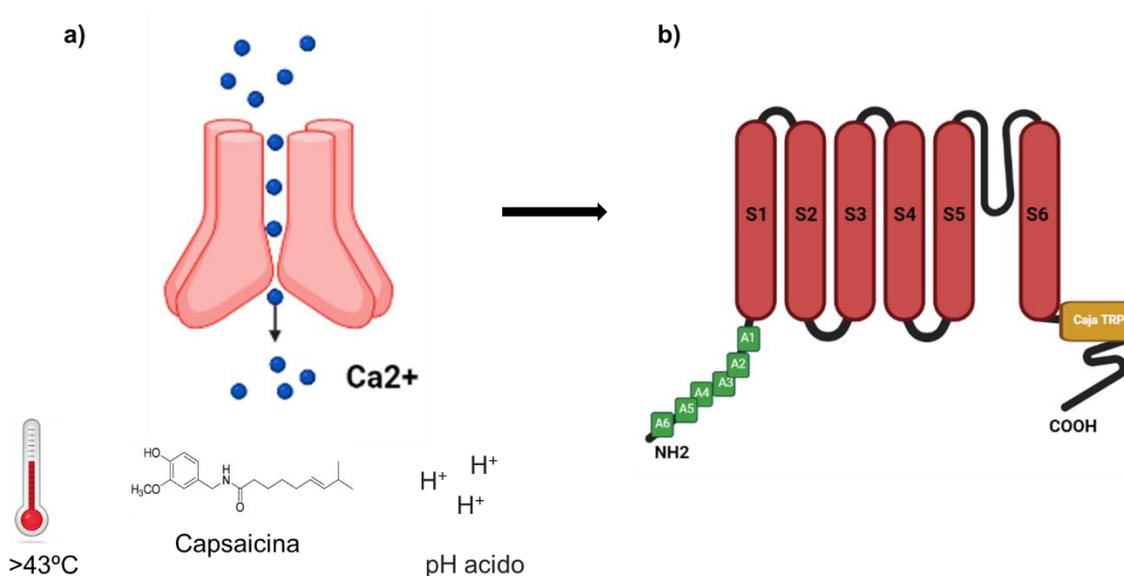


Figura 3. Estructura del canal TRPV1. a) Esquema representativo del tetrámero que conforma al canal funcional de TRPV1, unión de cuatro subunidades que forman el poro que permite el paso de cationes principalmente Ca^{2+} y algunos de sus estímulos activadores como temperaturas $\geq 43^\circ\text{C}$, el compuesto vaniloide capsaicina y pH ácido extracelular. b) Topología de una subunidad de canal TRPV1 la figura muestra los seis segmentos transmembranales (S1-S6), los extremos amino (NH_2) y carboxilo (COOH) que se encuentran intracelularmente, los 6 repetidos de anquirina (A1-A6), además de la caja TRP.

A nivel transcripcional la regulación del gen de TRPV1 ha sido poco estudiada. De manera experimental únicamente ha sido caracterizada la región regulatoria río arriba del gen (región promotora) en la especie de rata (**Figura 4**). Las evidencias experimentales muestran que la expresión de este gen está dirigida a partir de un promotor dual dividido en una región promotora distal y una proximal, ambas con elementos necesarios para regular su expresión y sitios de inicio de transcripción independientes (Xue et al., 2007). Respecto a los factores de transcripción que modulan la expresión genética de TRPV1 se conocen a dos miembros de la familia

Sp (Sp1 y Sp4). Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se encontró que estos factores se unen a la región promotora proximal y generan un aumento en la actividad transcripcional. Además, la transfección de ARN de interferencia dirigidos contra Sp1 o Sp4 disminuye la actividad del promotor del gen de TRPV1 en neuronas DRG, lo que resalta la importancia de estos factores de transcripción para la activación de la transcripción del gen TRPV1 (Chu et al., 2011). De igual manera, se conoce que los factores Runx1 y C/EBP β se unen al promotor proximal para estimular la transcripción del gen de TRPV1 (Ugarte et al., 2013). Adicionalmente, se ha observado en un modelo de ratón donde se elimina a Runx1 de las neuronas sensoriales, que se reduce la expresión de algunos canales iónicos, incluido TRPV1 (Chen et al., 2006). Sin embargo, es necesario un estudio más amplio de los factores de transcripción que modulan la expresión de genes involucrados en la nocicepción, como TRPV1, debido al impacto de la función de estas proteínas.

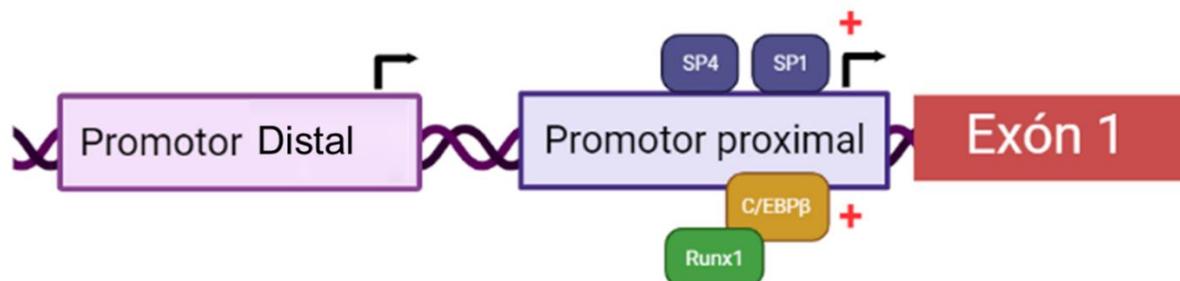


Figura 4. Esquema de la Región promotora del gen de TRPV1 de rata. Promotor dual de TRPV1 de especie de rata compuesto por dos regiones una distal y una proximal con sitios independientes de inicio de transcripción. Factores de transcripción Sp1, Sp4 Runx1 y C/EBP β caracterizados de manera experimental se conoce su unión al promotor proximal que al interactuar con dicha región regulan de manera positiva la expresión del gen de TRPV1.

Otro mecanismo importante para la regulación de TRPV1, es por medio de modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación, que ejercen una regulación positiva en especial durante procesos inflamatorios. Bajo estas

condiciones, el canal TRPV1 puede ser activado por estímulos inocuos (por ejemplo, temperaturas menores de 43°C), en un evento denominado “sensibilización” del canal (revisado en Morales et al., 2013). Esto se debe a que TRPV1 es blanco de la acción de algunas proteínas cinasas (PKA, PKC y CaMKII), que son capaces de fosforilar aminoácidos específicos, lo que conduce a un estado donde su activación ocurre con mayor facilidad. Además, moléculas como el factor de crecimiento nervioso (NGF) favorece el tráfico de canales hacia la membrana plasmática y también es un regulador positivo de la transcripción del gen TRPV1 (Szallasi y Blumberg, 2007). Todos estos reguladores de la expresión y fosforilación de TRPV1 se suman a los efectos de compuestos liberados en situaciones de inflamación y de daño tisular que son reguladores directos de la función del canal TRPV1 como el ATP, el ácido lisofosfatídico y la anandamida, que al interaccionar directamente con el canal promueven su apertura (revisado en Morales et al., 2013) y exacerban la respuesta dolorosa. Es por esta razón que TRPV1 se ha convertido en un importante blanco en la búsqueda de terapias para contrarrestar el dolor agudo y crónico incluyendo a todas las moléculas y factores involucrados en su actividad (Szallasi y Blumberg, 2007).

Modulación de TRPV1 por hormonas sexuales.

De manera interesante, en los últimos años ha cobrado gran relevancia el papel de las hormonas sexuales sobre la nocicepción. Estas moléculas parecen tener una función clave para la regulación de la actividad y expresión de receptores de la familia TRP que participan en dicho proceso, incluyendo al canal TRPV1 (Artero et al., 2018; Méndez et al., 2020). Análisis bioinformáticos en los genomas de rata, ratón y humano de secuencias promotoras de canales TRP, han identificado varias regiones que contienen elementos que indican regulación transcripcional de algunos genes codificantes para TRP por efecto de moléculas del tipo esteroideo (Kumar et al., 2015). Sumado a esto, la co-localización de TRPV1 con receptores a estrógenos (ER) α , β y GPR30 y el receptor a andrógenos (Lee et al., 2016) en neuronas sensoriales ha reforzado esta hipótesis

La regulación de TRPV1 por acción de estrógenos ha sido la más estudiada. El estradiol parece regular de manera positiva la expresión del gen TRPV1 a través de

un mecanismo que involucra a sus receptores clásicos (revisado en Méndez et al., 2020). Cultivos primarios de células de DRG y TG de rata tratados con estradiol presentan un aumento en los niveles de ARN mensajero de TRPV1 (Payrits et al., 2017; Yamagata et al., 2016). Adicionalmente, se reportó una disminución de los niveles proteicos 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 (Cho et al., 2012).

Por otro lado, la progesterona tiene efectos sobre TRPV1 a través del receptor Sigma 1 (Sig-1R). Sig-1R es una proteína chaperona residente de retículo endoplasmático que facilita el correcto plegamiento de la proteína TRPV1. 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).

Finalmente, los andrógenos también han demostrado regular la actividad de TRPV1. Se ha sugerido que la dehidroepiandrosterona (DHEA) interactúa directamente con el canal inhibiendo su activación en respuesta al agonista capsaicina, aunque se desconoce si esto se debe a la competencia por unión al sitio vaniloide o por modificación alostérica (Cheng et al., 2004). Por el contrario, la androstenediona induce corrientes en neuronas de DRG que son parcialmente eliminadas con el antagonista de TRPV1, capsazepina. Esto sugiere que la androstenediona puede actuar como un activador del canal (De Logu et al., 2016).

Para este trabajo, resulta de gran importancia la testosterona y su efecto sobre TRPV1. A la fecha existen muy pocos de estudios realizados al respecto. Entre ellos, destaca la investigación de Bai y colaboradores en 2018, en la que utilizaron un modelo de inflamación inducido por el adyuvante completo de Freund (CFA) y 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 ocurra este efecto y tampoco se describió si el efecto de la testosterona es mediado por su receptor (AR).

Receptor de Andr6genos.

El Receptor de Andr6genos (AR) es un factor de transcripci3n que actúa como el principal efector de las acciones desencadenadas por el grupo de hormonas esteroideas que en conjunto se conocen como Andr6genos. Sus agonistas producidos end6genamente son la testosterona (T), la androstenediona (ASD), la dehidroepiandrosterona (DHEA) y la dihidrotestosterona (DHT). Tanto la T y la DHT actúan como ligandos con alta afinidad por el AR, siendo la ultima el activador más potente, mientras que ASD y DHEA son ligandos débiles (revisado en Méndez et al., 2020). De los andr6genos, la testosterona es considerada como la hormona más importante, ya se encuentra en mayor concentraci3n en circulaci3n y es responsable de entre el 90-95% de la acci3n total de este tipo de hormonas. (Michels y Hoppe, 2008; Lee y Chang, 2003).

El AR pertenece a la superfamilia de receptores a esteroides que incluye a los receptores a estr6genos, progesterona, mineralocorticoides y glucocorticoides (revisado en Méndez et al., 2020). El gen del AR se ubica en el cromosoma X, su ARNm está compuesto por 8 exones que codifican para una prote3na de aproximadamente 110 kDa (revisado en Contreras et al., 2017). Se expresa principalmente en test3culos y en algunos tejidos periféricos. Adicionalmente se ha identificado la expresi3n de este receptor en algunas regiones del sistema nervioso, incluyendo cerebro (Contreras et al., 2017).

Se caracteriza por una estructura similar a la encontrada en los factores de transcripci3n compuesta por cuatro dominios funcionales (Cutrees et al., 2008). El dominio del N-terminal o dominio de transactivaci3n (TAD), un dominio central de uni3n al ADN (DBD), un tercer dominio de uni3n a ligando (LBD) en el C-terminal y un dominio que enlaza a DBD y LBD conocido como dominio de bisagra (Cutrees et al., 2008).

El mecanismo de acci3n clásico del AR inicia partir de la uni3n de la testosterona al receptor que se encuentra generalmente en el citoplasma unido a prote3nas de choque térmico. Como consecuencia, ocurren cambios conformacionales que permiten la separaci3n del AR de las prote3nas de choque térmico y su posterior

homodimerización (Foradori et al., 2007). Esta modificación también expone una secuencia de localización nuclear (NLS) reconocida por las importinas, proteínas encargadas de su transporte al interior del núcleo (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 (ERA). En este punto el AR puede modificar la expresión genética, ya sea promoviendo o reprimiendo la transcripción de genes blanco, a través del reclutamiento de correguladores (Michels y Hoppe, 2008; Foradori et al., 2008) (**Figura 5**). De manera interesante, el AR puede modular la expresión de algunos genes sin unirse directamente a los elementos de respuesta a andrógenos. Esto es gracias a la interacción con otros factores o correguladores que se encuentran previamente unidos al ADN lo que aumenta su rango de acción (Levin y Hammes, 2016).

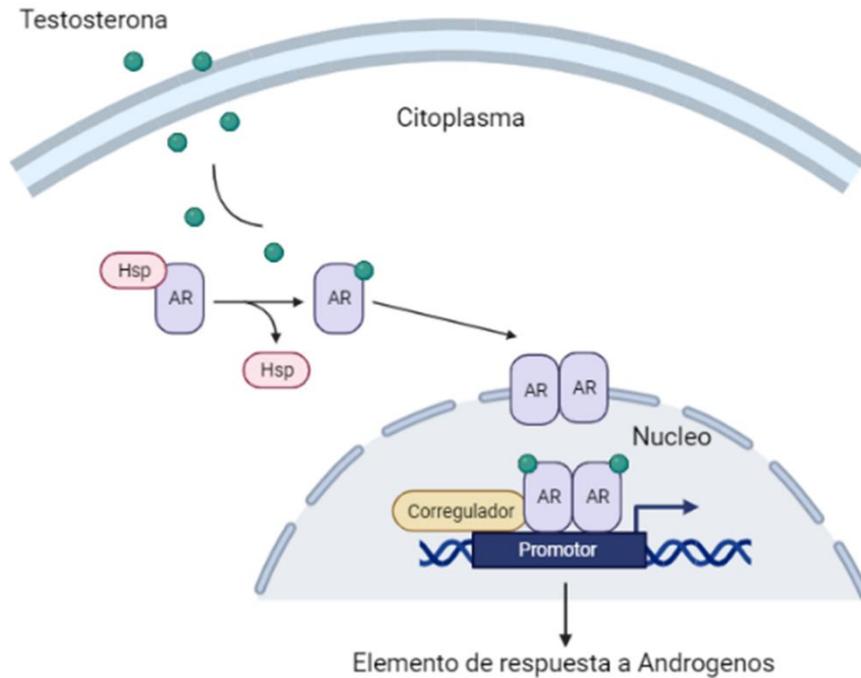


Figura 5. Mecanismo de acción clásico de la testosterona mediado por el Receptor de Andrógenos (AR). La testosterona se difunde a través de la membrana plasmática y se une al AR, una vez que esto sucede se separa de proteínas de choque térmico (HSP) y es transportado al núcleo. Finalmente se une a regiones específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta a Andrógenos (ERA) principalmente ubicados en regiones promotoras, para modular la transcripción de los genes.

Además de la regulación genética anteriormente descrita, se ha reportado en un número considerable de estudios los efectos celulares producidos por la testosterona que ocurren en intervalos de tiempo de segundos a minutos y que son independientes de la vía genómica (clásica) (Foradori et al., 2008). En relación con esto, se plantean dos posibles alternativas para explicar las acciones rápidas o no clásicas del esteroide. En primer lugar, se ha propuesto la existencia de receptores a andrógenos distintos al AR clásico en la membrana plasmática que pueden desencadenar vías de señalización. Esta idea ha sido apoyada por estudios donde se observa la activación de proteínas cinasas y la producción de segundos mensajeros en líneas celulares que carecen de la expresión del AR (Michels y Hoppe, 2008; Foradori et al., 2008). Sin embargo, la identidad de estos receptores no es del todo clara y es necesario una investigación más profunda respecto al tema (Thomas, 2019). Por otro lado, se ha informado la presencia del AR clásico en la

membrana plasmática (Levin y Hammes, 2016). Su ubicación en este sitio depende de un mecanismo conservado entre los receptores a esteroides que involucra la adición de un ácido palmítico en un motivo de nueve aminoácidos en el dominio de unión a ligando. Dicha modificación aumenta la hidrofobicidad del AR y su asociación a la membrana plasmática, específicamente en dominios como las balsas lipídicas o regiones ricas en caveolina. Como resultado se facilita la interacción del AR con otras proteínas de la membrana que pueden desencadenar vías de señalización o modificar su actividad en respuesta a testosterona (Pedram et al., 2007).

En los últimos años, el conocimiento acerca de la modulación de los canales TRP por el AR ha aumentado, aunque la investigación se ha centrado principalmente en el canal TRPM8, un importante biomarcador en el cáncer de próstata. Este receptor activado por compuestos naturales como el mentol y temperaturas frías (10–28°C), es blanco de las acciones clásicas y no clásicas del AR (revisado en Enciso et al., 2021). Se conoce que la expresión genética de TRPM8 es regulada positivamente por el AR a través de su unión a la región promotora en un ERA ubicado cerca del inicio de la transcripción del gen de TRPM8, lo que convierte a este gen en sensible a los andrógenos (Zhang y Barrit, 2004; Bidaux et al., 2006; Asuthkar et al., 2015). Sorpresivamente en un estudio realizado por Grolez y colaboradores en 2019 en una línea celular de cáncer de próstata (PC3), se identificó un mecanismo novedoso que modula la activación de TRPM8 por AR. Al parecer estas dos proteínas forman un complejo en dominios de balsas lipídicas en la membrana plasmática lo que altera la activación del canal a sus agonistas. La formación de este complejo es afectada por la exposición a testosterona, donde altas concentraciones (100 nM) reducen su interacción por la translocación del AR al núcleo. Este tipo de modulación no clásica ha recibido gran interés por su implicación en procesos fisiológicos como la migración celular en células de cáncer de próstata (Grolez et al., 2019), y por la reciente identificación de este complejo en neuronas de DRG donde modifica la percepción al frío (**Figura 6**) (Gkika et al., 2020).

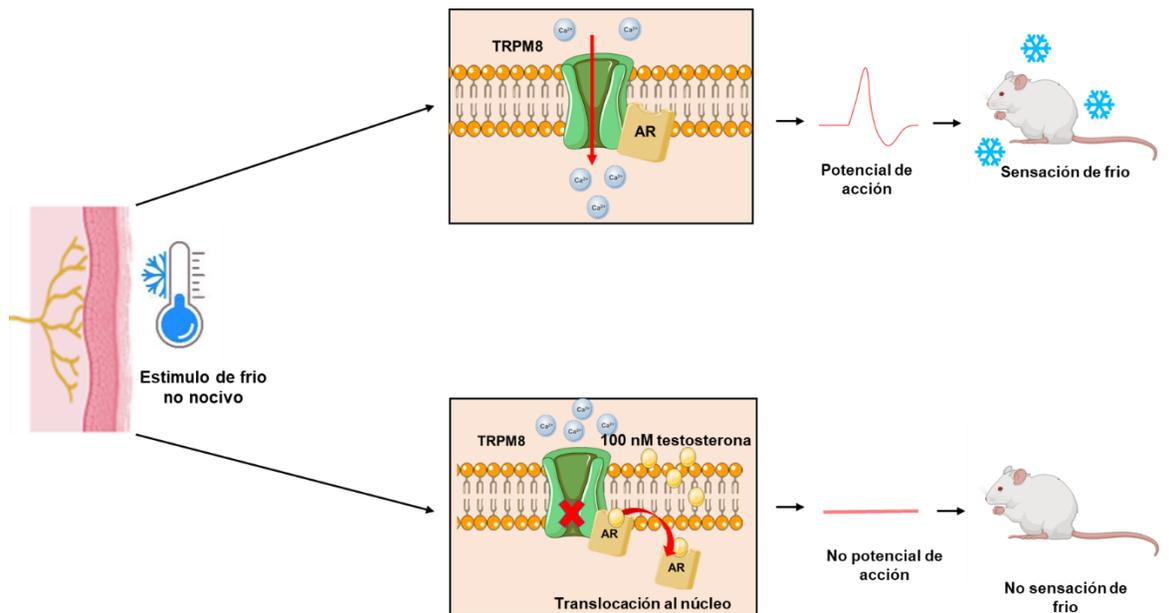


Figura 6 La testosterona regula la sensibilidad al frío mediada por TRPM8 vía el Receptor de Andrógenos. El estímulo de frío leve se transduce a través del canal TRPM8 ubicado en la superficie celular de las neuronas DRG donde forma un complejo proteico con el receptor de andrógenos (AR) (panel superior). Una alta concentración de testosterona (100 nM) disminuye la activación del canal TRPM8 y produce translocación del AR al núcleo. La consecuencia fisiológica de esto es la pérdida de la sensación de frío (panel inferior) Modificado de Enciso et al., 2021.

El descubrimiento de la diversidad de acciones del AR sobre el canal TRPM8 y las consecuencias fisiológicas de esta modulación, indican la necesidad de una investigación profunda acerca de la participación de este receptor en la regulación de otros miembros de la familia TRP. Como se mencionó, la testosterona regula la expresión de TRPV1 en un modelo de inflamación, aunque, no queda claro si esto es resultado de la acción clásica descrita para el AR o se debe a alguna acción de tipo no clásica del mismo. TRPV1 es un canal iónico fundamental para el proceso nociceptivo y el desarrollo de condiciones de dolor crónico, por lo que es de suma importancia determinar el mecanismo por el cual la testosterona y el AR ejercen sus efectos para regularlo.

Antecedentes directos.

En experimentos previos realizados en nuestro grupo de investigación, se observó que existe una diferencia en el umbral del dolor producido por capsaicina entre ratones de diferentes sexos (revisado en Huezca, 2020), siendo los machos los que presentaron una respuesta de dolor mayor en comparación con las hembras (**Figura 7a**). Además, mediante ensayos de Western Blot, se determinó que en los DRG derivados de ratones macho existen mayores niveles de la proteína TRPV1 en comparación de los niveles proteicos presentes en los DRG de las hembras (**Figura 7b**). Aunque los resultados tienen la limitante de no considerar las distintas etapas del ciclo estral en las hembras, parece razonable suponer que las hormonas sexuales pueden tener un papel clave en el dimorfismo sexual de la respuesta de dolor mediada por TRPV1.

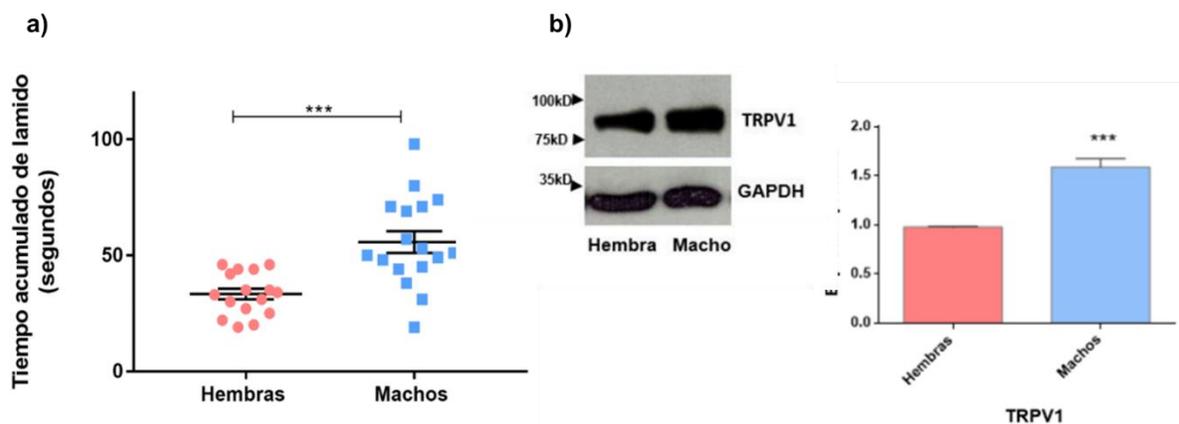


Figura 7. Dimorfismo sexual en la respuesta de dolor a capsaicina y expresión de la proteína TRPV1. a) Gráfica correspondiente a ensayos conductuales de lamido de pata en ratones macho y hembra inyectados con 2.8 μ g de capsaicina, agonista específico del canal TRPV1, en la extremidad delantera, el tiempo de respuesta se reporta como el tiempo acumulado durante 10 minutos. Los machos presentan un mayor tiempo de lamido (55 ± 5 s $n=17$) en comparación con las hembras (33 ± 2 s $n=16$). b) Western Blot representativo de la inmunodetección de la proteína TRPV1 en los DRG obtenidos de ratones hembra y macho, así como la detección del control de expresión endógena, GAPDH. La gráfica muestra que los machos expresan alrededor de un 50% más proteína TRPV1 en comparación con las hembras ($n=5$). (Modificado de Huezca, 2020).

Aunado a esto, nosotros previamente identificamos la expresión del AR en extractos proteicos obtenidos de cultivos primarios de neuronas DRG (**Figura 8a**), aunque por medio de ensayos de RT-PCR semicuantitativa, no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles ARNm de TRPV1 en cultivos de neuronas DRG tratadas durante 24 h con 100 nM de testosterona (**Figura 8b**).

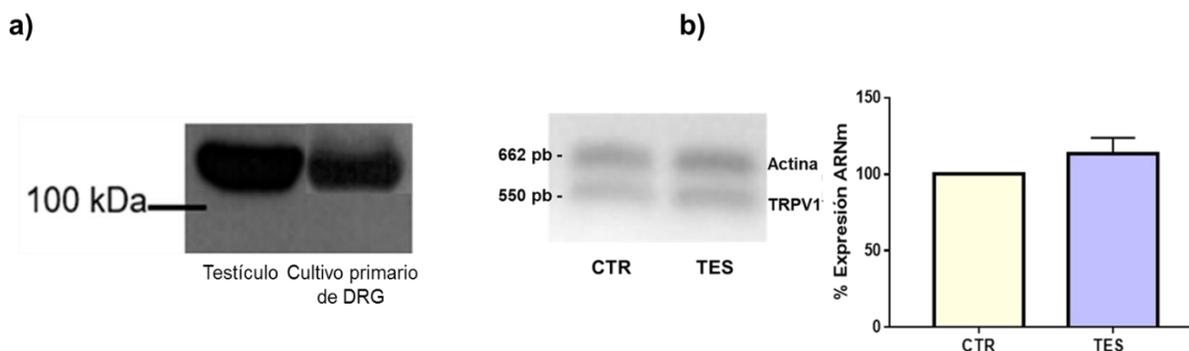


Figura 8. Identificación del AR en cultivos primarios de neuronas DRG y efecto del tratamiento de testosterona sobre la expresión de TRPV1. a) La identificación del AR se realizó en extractos de proteína total obtenida de cultivos primarios de neuronas de DRG de ratón, la proteína total obtenida de testículo de ratón se usó como control positivo de expresión del AR. b) Gel de agarosa al 1.5% para la visualización del producto de RT-PCR de TRPV1 y actina (ensayo semi-cuantitativo); la gráfica muestra los datos normalizados de la densitometría. La barra azul (TES) muestra una tendencia al aumento en la cantidad de ARNm de TRPV1 por efecto del tratamiento de 100nM de testosterona, con respecto al grupo control (CTR), dicha diferencia no fue estadísticamente significativa.

Finalmente, por medio de un análisis bioinformático de la región promotora del gen de TRPV1, realizado en la base de datos de JASPAR, nosotros identificamos sitios putativos de unión del AR en una región río arriba del primer exón del gen de TRPV1 de ratón, tres de ellos con altas probabilidades para que el AR pueda unirse y regular la transcripción del gen TRPV1, **Figura 9**.

Hipótesis

La testosterona regula de manera negativa la expresión del gen TRPV1 por medio de las acciones del Receptor de Andrógenos.

Objetivo

Determinar el mecanismo molecular de la regulación de la expresión de TRPV1 por acción del Receptor de Andrógenos.

Objetivos particulares

1. Evaluar los niveles del ARNm de TRPV1 en cultivos primarios de neuronas DRG de ratón, tratados con testosterona mediante ensayos de RT-PCR cuantitativa.
2. Evaluar los cambios a nivel proteico de TRPV1 en cultivos primarios de neuronas DRG de ratón, tratados con testosterona mediante ensayos de Western Blot.
3. Caracterizar la expresión del Receptor de Andrógenos en la línea celular HEK-293.
4. Determinar los efectos de la testosterona independientes del AR sobre los niveles proteicos de TRPV1 en células HEK-293.
5. Evaluar los posibles efectos no clásicos del AR en los niveles de expresión proteínica de TRPV1 en células HEK-293.
6. Realizar análisis bioinformático de la región promotora del gen TRPV1 de ratón, rata y humano para identificar posibles elementos de respuesta a Andrógenos conservados entre especies.

Metodología

Animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando ratones macho de la cepa C57BL/6J 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.

Cultivos primarios de DRG.

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, y a continuación, esta fue cortada para permitir el acceso a los ganglios. Una vez que estos fueron extraídos, se colocaron en 2 ml de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle). Los ganglios fueron recuperados en un tubo falcón de 15 ml para realizar lavados. Primero, fueron centrifugados a 1300 rpm por 5 min y posteriormente fue eliminando el sobrenadante para luego resuspender en 2 ml de medio DMEM, esto se repitió dos veces. Después se adicionaron 2 ml de medio DMEM con 2.5 mg de tripsina y 8 mg de colagenasa, se incubaron durante 40 min a 37°C. Nuevamente se realizaron dos lavados con medio D10 (medio DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico). Después del segundo, lavado se agregaron 800 µl de medio D10 y las células se homogenizaron con una micropipeta de 100-1000 µl, 800 µl fueron divididos en dos cultivos, por lo que dos volúmenes iguales (400 µl) fueron colocados separadamente en dos cajas petri de 35 mm de diámetro. Finalmente, se agregó medio D10 (medio DMEM Dulbecco's Modified Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10%) y el

respectivo tratamiento en un volumen final de 2 ml. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C y 5% de CO₂.

Tratamiento de Testosterona

La testosterona (Sigma-Aldrich, ≥98%) fue diluida en metanol. Para el tratamiento de los cultivos primarios de neuronas de DRG se preparó inicialmente un stock a 10 mM. A partir de este, se realizaron diluciones en medio de cultivo D10 hasta una concentración de 1, 10 y 100 nM en 2 ml de medio, que posteriormente fue agregado a las células. El cultivo de células control, consistió en agregar 2 ml de medio D10 más el volumen correspondiente de vehículo de testosterona (metanol). El tratamiento con el esteroide se realizó por un periodo de 24 horas. Para evitar una reducción en la efectividad de los tratamientos de 48 horas el medio de cultivo se cambió después de las primeras 24 horas del tratamiento por medio nuevo con su respectiva concentración de testosterona y/o vehículo.

Extracción de ARN

El ARN total de cultivos primarios de neuronas de DRG se obtuvo con el uso de TRIzol (Invitrogen™). Cumplido el tiempo de tratamiento se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con 200 µl de PBS 1x. Posteriormente se agregaron 500 µl de TRIzol y se recuperó en un tubo eppendorf de 2 ml. Para iniciar la extracción se adiciono 100 µl cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 12,000 G 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 500 µl isopropanol, se mezcló por inmersión durante 15 segundos y centrifugó a 12,000 G durante 10 minutos a 4 °C, el botón obtenido fue lavado con 500 µl etanol al 75% diluido con agua DEPC (Pirocarbonato de dietilo). Posteriormente se centrifugó a 7500 G por cinco minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 30 µl 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 (Tris base 40 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 500 mM

pH8 con NaOH 2%) adicionado con 3 µl 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.

Ensayos de RT-PCR cuantitativa

Del ARN total obtenido se cargaron 500 ng para realizar la transcripción inversa. Los reactivos utilizados se dividieron en dos tubos como señala la **Tabla 1**. La mezcla del tubo 1 se incubó a 65 °C por 5 min y luego, se incubó en hielo durante 5 minutos para después agregar la mezcla del tubo 2 para un volumen final de 20 µl. Posteriormente, se procedió a un ciclo de 22 °C por 10 min, seguido de un segundo ciclo a 55°C por 10 min. Finalmente se incubó a 80 °C por 10 min. El ADN complementario (ADNc) obtenido se almacenó a -70 °C.

Tabla 1. Mezcla de reactivos para RT.

| Tubo 1 Reactivo | Concentración | Tubo 2 Reactivo | Concentración |
|----------------------------|----------------------|---|----------------------|
| dNTPs | 0.2 mM | SuperScript IV Reverse Transcriptase | 10 u/ µl |
| Random primers | 50 ng | SuperScript IV Reverse Transcriptase buffer 5x | 1x |
| ARN | 500 ng | DDT | 5 mM |
| | | RNAse OUT | 2 u/ µl |
| H₂O DEPC | Cbp 13 µl | | |

*Cbp: cantidad bastante para.

El ensayo de PCR cuantitativo se realizó con el uso del Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Las mezclas de reacción se prepararon con las cantidades señaladas en la **Tabla 2**. El proceso de amplificación se llevó a cabo mediante el sistema StepOne™ Real-Time PCR System. Los oligonucleótidos utilizados (**Tabla 3**) fueron diseñados entre exones para los ARN mensajeros de TRPV1, AR y GAPDH (control de carga endógeno). Previamente se realizó una curva de estandarización a distintas diluciones (de 1:2 – 1:1024, GAPDH; 1:10 – 1:3200, TRPV1; 1:5- 1:3125, AR) del cDNA para determinar un rango de amplificación eficiente en las muestras para todos blancos. La dilución seleccionada (1:200 para los tres genes) del ADNc se preparó con agua libre de nucleasas (1 µl ADNc + 199 µl H₂O agua). Cada muestra fue cargada por triplicado. El proceso de amplificación se realizó de la siguiente manera: incubación inicial a 95°C por 10 min seguido de 60 ciclos de amplificación (95°C por 15 s, 55°C por 30 s y 72° C por 30 s). El análisis de los productos se determinó por una curva de disociación. La comparación en la expresión del gen de TRPV1 y AR en cultivos controles contra tratados se calculó por el método comparativo de Ct utilizando la fórmula $2^{-(\Delta C_t)}$, el promedio de los valores de los experimentos de cada condición (n=3) fue graficado con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 2. Mezclas de reacción PCR cuantitativo

| Reactivo | TRPV1 | GAPDH | AR |
|---------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| Master Mix (2X) SYBR Green | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| Primer sentido | 0.16 µl (25 µM) | 0.2 µl (10 µM) | 0.2 µl (10 µM) |
| Primer anti sentido | 0.16 µl (25 µM) | 0.2 µl (10 µM) | 0.2 µl (10 µM) |
| ADNc | 4 µl | 4 µl | 4 µl |
| Agua libre de nucleasas | 0.84 µl | 0.6 µl | 0.6 µl |
| Volumen final | 10 µl | 10 µl | 10 µl |

Tabla 3. Oligonucleótidos para experimentos de PCR cuantitativo

| Blanco | Secuencia Sentido (F) Anti-sentido (R) | Temperatura de hibridación | Tamaño de amplicon Pares de base |
|---------------|---|---|---|
| TRPV1 | R 5'-CAAACCTCCACCCCACACTGA-3' F 5'-AGGCCAAGACCCCAATCTTC-3' | 56.7 °C | 76 pb |
| GAPDH | R 5'-CTTGGGCTACTGAGGACC-3' F 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3' | 54.4 °C | 101 pb |
| AR | R 5'-CTACCTCGTGTTCTTGTT-3' F 5'-AGGCAGTGAGTTATTCTTC-3' | 55.4 °C | 101 pb |

Cultivo celular.

Se utilizaron células HEK-293 (Human Embryonic Kidney, ATCC) que fueron mantenidas en medio de cultivo celular D10 (medio DMEM Dulbecco's Modified Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10%) adicionado con estreptomicina 10,000 µg/ml y penicilina 10,000 u/ml. Todos los cultivos fueron sembrados en cajas Petri de 35 mm e incubados a 37°C de temperatura y 5% de CO₂. El tratamiento de las células se administró como se describió anteriormente para los cultivos primarios de DRG diluido en 2 ml de medio correspondiente.

Transfección.

La expresión heteróloga del canal TRPV1 y el AR en las líneas HEK-293 se realizó mediante una transfección de tipo transitoria. Se utilizaron 100 ng del vector de TRPV1 y 500 ng AR o su vector vacío (V.V). La construcción del plásmido pcDNA3.1+rTRPV1 que contiene la secuencia codificante para la proteína de TRPV1 de origen de rata regulado por el promotor de citomegalovirus (CMV). La construcción del plásmido pCMV-Tag2b +AR que contiene la secuencia codificante

para la proteína AR de origen de ratón regula su expresión por el promotor de citomegalovirus (CMV). La transfección se llevó a cabo con el uso del agente polietilenimina derivado (Jet-Pei®) que permite la internalización del plásmido a la célula. El plásmido y el Jet-Pei (3 µl) se diluyeron por separado en 100 µl de NaCl 150 mM. Cada mezcla se agito vigorosamente por 15 segundos. Posteriormente se agregó la mezcla que contenía el Jet-Pei a la mezcla del plásmido. Para favorecer la formación del complejo Jet-Pei - plásmido se incubo a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, se agregaron los 200 µl de la mezcla a las células cultivadas en cajas de 35 mm con 2 ml de medio. Después de 24 horas el medio fue retirado y se agregó nuevo medio que contenía el tratamiento respectivo de testosterona.

Obtención de proteína y cuantificación.

Finalizado el tiempo de tratamiento se retiró el medio de cultivo de las líneas celulares y cultivos primarios de DRG. Las células fueron lavadas con 300 µl de PBS dos veces, posteriormente se agregó 120 µl de buffer de lisis (Tris Cl pH 8 50 mM, NaCl 150 mM, tritón 1%, Complete 25x, inhibidor de proteasas complete, Roche 1x, NaF 25 mM), este fue recuperado en un tubo eppendorf y agitado en vórtex por 120 segundos. Finalmente, la muestra se centrifugó a 13500 rpm x 5 minutos y el sobrenadante que contenía a las proteínas fue recuperado y se almaceno a -70 °C. Para el caso de la proteína total de testículo de ratón después de ser extraídos los testículos se colocaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) frio, posteriormente se retiró el PBS y se agregó 1 ml de buffer de lisis y se homogenizo la muestra con ayuda de un pistilo. Por último, la muestra se centrifugo y se recuperó el sobrenadante como se mencionó anteriormente.

La cuantificación de proteína total se llevó a cabo por el método del ácido bicinconínico (BCA). La curva estándar se realizó con distintas concentraciones conocidas de BSA. Las muestras de la curva, así como las muestras problema, se cargaron por duplicado en una placa de 96 pozos, cada pozo contenía 160 µl de solución de trabajo (50 partes de ácido bicinconínico y 1 parte CuSO₄), 10 µl de agua y 10 µl de proteína. Se incubaron por 30 minutos a 37° C y se midió la absorbancia 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.

Ensayos de Western Blot

La caracterización y cambios en la expresión de las proteínas de interés se realizó mediante ensayos de Western Blot. Una vez realizada la cuantificación de la proteína total se ajustó el volumen añadido de muestra para cargar la misma cantidad de proteína en cada pozo (25-30 μg), para la caracterización de la expresión se cargó la mayor cantidad de proteína posible. La mezcla cargada contenía 8 μL de buffer de carga 6x (4x Tris Cl/SDS pH 6.8 0.35 M, DDT 0.6 M, Glicerol 30%, SDS 10%, Azul de Bromo fenol 0.012%) en una concentración final al 1x más H_2O y proteína en un volumen final de 48 μL . Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 8%. La electroforesis se realizó en una cámara vertical con buffer de electroforesis (Tris base 0.125 M, Glicina 0.96 M, SDS 0.5%) a un amperaje constante de 20 mA por dos horas. La transferencia se realizó en una membrana PVDF en un sistema semi seco en una cámara TE70XP (Hoefer) con buffer de transferencia (Tris base 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.037%, metanol 20%) a un amperaje constante de 250 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.

Para la detección de las proteínas de interés las membranas de PVDF se incubaron con anticuerpos primarios específicos de cada proteína en las diluciones señaladas en la **Tabla 4**, a una temperatura de 4 °C con agitación constante. El periodo de incubación varió dependiendo de la proteína y procedencia del extracto. Para el caso de TRPV1 y GAPDH en extractos de líneas celulares y cultivos primarios de DRG la incubación fue durante toda la noche. Para el AR, en todos los extractos se realizó una incubación por 48 horas. Después de este proceso, se retiraron los anticuerpos primarios y las membranas fueron lavadas en tres ocasiones con PBS-T. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario acoplado a la enzima

peroxidasa de rábano (anti-conejo 1:7500 leche al 3%, GE Healthcare Life Sciences; anti-cabra 1:7500 leche al 3%) y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas fueron nuevamente lavadas tres veces 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 4. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot.

| Proteína | Anticuerpo Especie | Peso (KDa) | Dilución | Marca |
|---|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| TRPV1 (Cultivos primarios DRG) | Cabra | 95 | 1:1000 Leche 3% | Santa Cruz |
| TRPV1 (células HEK- 293 transfectadas) | Conejo | 95 | 1:1000 Leche 3% | Santa Cruz |
| AR | Conejo | 110 | 1:1000 Leche 3% | Abcam ab133273 |
| GAPDH | Conejo | 36 | 1:10000 PBS-T | Cell Signaling |

Caracterización de expresión del Receptor de Andrógenos por PCR punto final.

Para determinar la expresión de los ARN mensajeros de las proteínas de interés en las distintas muestras de interés, se realizó una PCR punto final. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el transcrito del AR entre los exones 1 y 2 con ayuda del programa Vector NTI® (**Tabla 5**). Para la amplificación de Hprt los oligonucleótidos utilizados fueron tomados de Kumar et al., 2018. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía los reactivos y concentraciones indicadas en la **Tabla 6**. Como controles positivos de la expresión del AR, se utilizó ADN complementario obtenido de ARN total de testículo (Ruizeveld et al., 1991). La extracción de ARN y transcripción inversa tanto de las líneas celulares como de los controles positivos se realizaron como se describió anteriormente. Una vez preparadas las mezclas (**Tabla 6**), se sometieron a desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, posteriormente, se amplificaron durante 35 ciclos conformados por una fase de desnaturalización de 95 °C por 30 s, alineamiento a la temperatura correspondiente para el par de cebadores por 30 s y polimerización a 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%. con ayuda de un transiluminador.

Tabla 5. Oligonucleótidos para experimentos PCR punto final.

| Blanco | Secuencia Sentido (F) Anti-sentido (R) | Temperatura de hibridación | Tamaño de amplicon |
|--------|--|----------------------------------|-----------------------|
| AR | F 5'-TCCTTCTCCTGATTTGGAAT -3' R 5'-TTGCTGATAATGAGTGTCTC-3' | 54.4 °C | 265 pb |
| Hprt | F 5'- TTATCAGACTGAAGAGCTACTGTAA-3' R 5'- TTACCAGTGTCAATTATATCTTCAA-3' | 55.4 °C | 127 pb |

Tabla 6. Mezcla de reactivos para ensayos de PCR punto final.

| Reactivo | Mezcla de amplificación |
|-------------------|-------------------------|
| Buffer 10x | 1x |
| DNTP` s | 0.2 mM |
| MgCl ₂ | 1.5 mM |
| Oligonucleótido R | 30 pM |
| Oligonucleótido F | 30 pM |
| Taq Polymerase | 1 unidad por reacción |
| ADNc | 5 µl |
| H ₂ O | Cbp 50 µl |

*Cbp: cantidad bastante para

Clonación del Receptor de Andrógenos

A partir de ARN total extraído de glándulas suprarrenales de ratón (cepa C57BL6), se realizó una transcripción inversa como se describió anteriormente. Los oligonucleótidos fueron diseñados con ayuda del programa Vector NTI® (**Tabla 7**) para la amplificación de la secuencia codificante (CDS) del AR, el diseño se realizó de tal manera que el oligonucleótido F contiene un sitio de restricción BamH y el R el sitio de restricción HindIII. Posteriormente, se realizó la amplificación con los reactivos indicados en la tabla 8. La mezcla se sometió a desnaturalización inicial de 98 °C por 2 min, posteriormente, se amplificaron durante 40 ciclos de desnaturalización de 98 °C por 10 s, alineamiento a la temperatura correspondiente al par de cebadores por 30 s y polimerización a 72 °C por 90 s, con una extensión final a 72 °C por 10 min. El resultado se verificó en un gel de agarosa donde se observó una banda del tamaño al esperado de 2700 pares de bases. Con ayuda de sitios de restricción en los oligonucleótidos usados para la amplificación la secuencia fue insertada en el vector pCMV-Tag2b. Para comprobar que la ligación

del inserto fuera correcta, se continuó con la digestión del producto por las enzimas BamHI y HindIII. Las secuencias generadas por el corte de las enzimas se observaron en un gel de agarosa al 1.5%. Como control adicional la proteína generada mediante la transfección del vector en células HEK-293 se realizó su detección mediante un ensayo de Western Blot.

Tabla 7. Oligonucleótidos para amplificación del CDS del Receptor de Andrógenos.

| Blanco | Secuencia Sentido (F) Anti-sentido (R) | Temperatura de hibridación | Tamaño de amplicon Pares de base |
|--------|--|-------------------------------|---|
| AR | F 5'-CTCTTCGGATCCATGGAGGTGC AGTTAGGGCT -3' R 5'-CTCTTCCTCGAGTCACTGTGTG TGGAAATAGA -3' | 59.7 | 2700 pb |

Tabla 8. Mezcla de reactivos para amplificación del ARNm de longitud completa del Receptor de Andrógenos.

| Reactivo | Mezcla de amplificación |
|---------------------|----------------------------|
| Buffer 5x | 1x |
| DNTP's | 0.2 mM |
| Oligonucleótido R | 30 pM |
| Oligonucleótido F | 30 pM |
| UltraDNA Polymerase | 0.025 unidad por μ l |
| ADNc | 2.5 μ l |
| H ₂ O | Cbp 50 μ l |

*Cbp: cantidad bastante para

Análisis in silico.

La identificación de posibles elementos de respuesta a Andrógenos (ERA) en el gen de TRPV1 de distintas especies se llevó a cabo con el uso de JASPAR 2020. Las secuencias de la región promotora del gen de TRPV1 para el caso de humano se obtuvieron de la base de datos EPD (Eukaryotic Promoter Database) y para rata del NCBI (National Center for Biotechnology Information, DQ015702.1). Todas las secuencias se analizaron seleccionando el AR correspondiente a cada especie con un umbral de puntaje de perfil relativo del 70 %.

Análisis estadístico.

Las imágenes obtenidas por ensayos de Western Blot fueron analizadas con ayuda del programa ImageJ. Los datos fueron normalizados con sus respectivos controles de carga GAPDH. Para todos los grupos se obtuvo estadística descriptiva (media, desviación y error estándar). El análisis estadístico y las gráficas de los datos fueron realizados con respecto a los niveles proteicos del control con el programa GraphPad Prism, mediante prueba t Student. Las diferencias estadísticas entre tratamientos se determinaron mediante una prueba de ANOVA de comparación múltiple.

Resultados

Efecto de Testosterona sobre los niveles de ARNm de TRPV1 y del Receptor de Andr6genos.

Experimentos de PCR semicuantitativos, previamente realizados en el laboratorio, mostraron que el tratamiento con testosterona en cultivos primarios de neuronas DRG a una concentraci6n de 100 nM durante 24 horas produce una tendencia al aumento de los niveles de ARNm de TRPV1 (**Figura 8b**). Debido a las limitaciones de esta t6cnica (Chen et al., 1999), para conocer con mayor precisi6n los cambios en el mensajero de TRPV1 se realiz6 un ensayo de qPCR teniendo como blanco de amplificaci6n el ADNc de TRPV1 y GAPDH (gen de referencia end6geno). A diferencia de los datos obtenidos previamente, el PCR cuantitativo mostro que el tratamiento con la testosterona no genera cambios significativos en el ARNm de TRPV1 (**Figura 10**). Sin embargo, en los tres experimentos realizados de manera independiente se observa la disminuci6n del ARNm de TRPV1 por efecto del tratamiento, aunque esta diferencia no result6 significativa. Este resultado sugiere una posible regulaci6n de tipo negativa en la transcripci6n del gen de TRPV1, la cual puede estar asociada con las acciones cl6sicas de la testosterona mediadas por el Receptor de Andr6genos (Michels y Hoppe, 2008; Foradori et al. 2008).

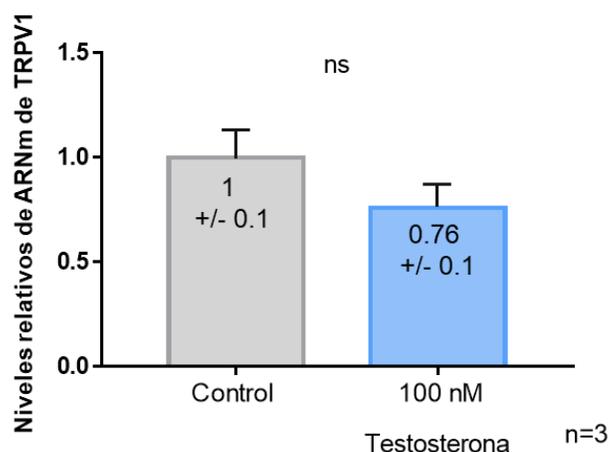


Figura 10. Efecto de testosterona (100 nM) sobre los niveles de ARN mensajero del gen de TRPV1. Determinación de la expresión relativa del ARNm de TRPV1 mediante ensayos de qPCR por efecto del tratamiento con testosterona a 100 nM por 24 horas en cultivos primarios de DRG. La hormona produce una disminución 0.24 veces en la expresión del transcrito de TRPV1, en comparación con el control. Los niveles relativos de ARNm se normalizaron respecto al contenido medio de ARNm de TRPV1 del grupo control (control 1 ± 0.1 vs testosterona 0.76 ± 0.1 , n: número de experimentos independientes = 3); prueba t.Student. ns (no significativo)

De acuerdo con los datos reportados en la literatura, el rango de concentración fisiológica de la testosterona en circulación es de 12.5 – 40 nmol/L (Diver, 2006). Esta concentración es menor si únicamente se considera a la testosterona libre (activa), es decir, aquella que no se encuentra asociada a proteínas como la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) y BSA (inactiva) (Nieschlag et al., 2012). Debido que 100 nM supera el rango fisiológico, decidimos realizar experimentos con tratamientos de 1 nM (concentración baja) y 10 nM (concentración alta) de testosterona bajo las mismas condiciones. Al medir el ARNm de TRPV1 se observó que 1 nM de testosterona produce una disminución significativa del mensajero (**Figura 11a**). De igual manera, 10 nM de testosterona redujo significativamente los niveles de ARNm de TRPV1, aunque esta disminución fue menor a la obtenida con el tratamiento de 1 nM (**Figura 11b**). En conjunto, los datos obtenidos indican que el esteroide actúa como un represor de la transcripción de TRPV1. Además, los experimentos señalan que este efecto es dependiente de la

concentración, de tal manera que la hormona es menos efectiva conforme aumenta la concentración del tratamiento.

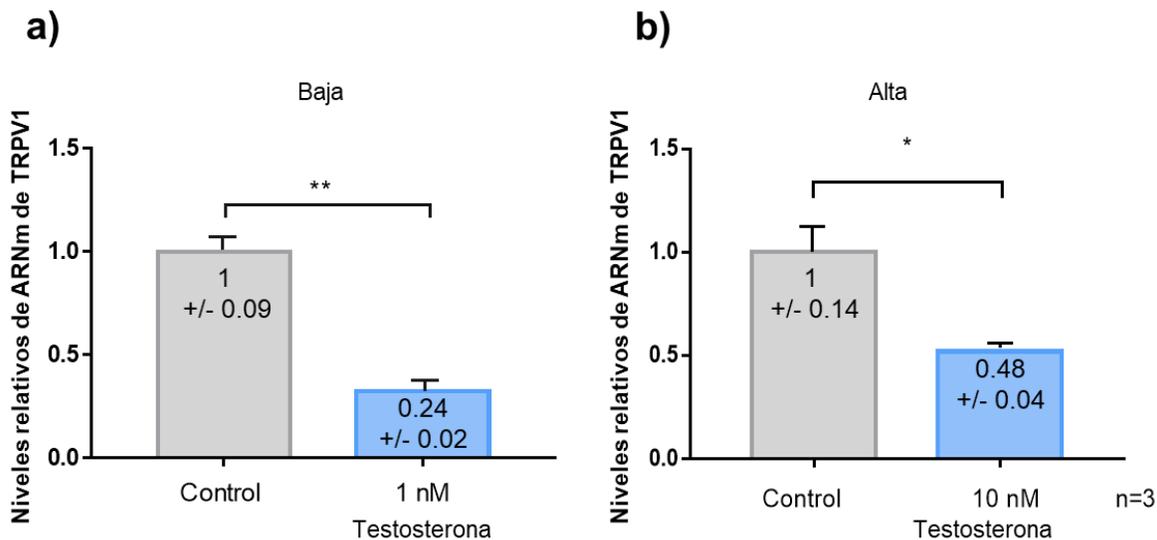


Figura 11. Efecto de testosterona 1 y 10 nM sobre los niveles de ARN mensajero del canal TRPV1. Determinación de la expresión relativa del ARNm de TRPV1 TRPV1 mediante ensayos de qPCR por efecto del tratamiento con testosterona por 24 horas en cultivos primarios de DRG. a) Tratamiento de 1 nM de testosterona (concentración baja) produce una disminución 0.76 veces la expresión del canal en comparación con el control (control 1 ± 0.09 vs testosterona 0.24 ± 0.02). n: número de experimentos independientes = 3. Prueba t $**p < 0.01$. b) Tratamiento de testosterona 10 nM (concentración alta) disminuye 0.52 veces la expresión del canal en comparación con el control (control 1 ± 0.14 vs testosterona 0.48 ± 0.04). Los niveles relativos de ARN se normalizaron respecto al contenido medio de ARNm de TRPV1 del grupo control. n=3 Prueba t Student con $*p < 0.05$

Dado que el receptor a andrógenos (AR) es el principal responsable de las acciones de tipo transcripcional desencadenadas por la testosterona (Michels y Hoppe, 2008; Foradori et al. 2008), nos preguntamos si el tratamiento con el esteroide a 1 y 10 nM produce cambios en sus niveles de ARNm. De manera interesante se observó que 1 nM del esteroide indujo un aumento de la cantidad de ARNm del AR (**Figura 12a**) mientras que, 10 nM produjo una disminución (**Figura 12b**). Este resultado revela que la testosterona ejerce una regulación en la expresión de su receptor y que puede ser positiva o negativa dependiendo de su concentración en cultivos

primarios de DRG. Estos cambios en la expresión del AR pueden tener consecuencias sobre su función como factor de transcripción e influenciar en la modulación de sus genes blanco como el caso de TRPV1.

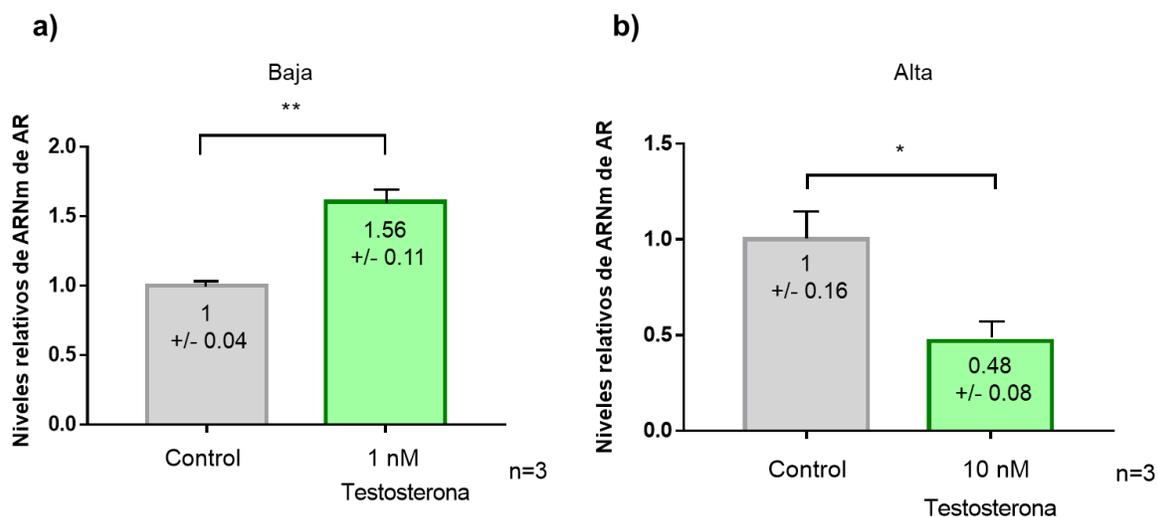


Figura 12. Efecto de testosterona 1 y 10 nM sobre los niveles de ARN mensajero del Receptor de Andr6genos. Determinación de la expresión relativa del ARNm de AR mediante ensayos de qPCR por efecto del tratamiento con testosterona por 24 horas en cultivos primarios de DRG. a) Tratamiento de 1 nM de testosterona (concentración baja) produce un aumento de 1.56 veces la expresión del canal en comparación con el control (control 1 ± 0.04 vs testosterona 1.56 ± 0.11) n: número de experimentos independientes = 3. Prueba t Student con $**p < 0.01$. b) Tratamiento de testosterona 10 nM (concentración alta) disminuye 0.52 veces la expresión del AR en comparación con el control (control 1 ± 0.16 vs testosterona 0.48 ± 0.08). Los niveles relativos de ARN se normalizaron respecto al contenido medio de ARNm de AR del grupo control. n=3 Prueba t Student con $*p < 0.05$.

Efecto de Testosterona sobre los niveles proteicos de TRPV1 y del Receptor de Andr6genos.

Posteriormente, se determinaron los cambios a nivel proteico de TRPV1 en cultivos primarios de neuronas DRG bajo las mismas condiciones que en los experimentos anteriores. La administración del tratamiento de 1 nM del esteroide (concentración baja) no modificó los niveles proteicos de TRPV1 con respecto al control (Control 100% vs testosterona $108.7 \pm 5.1\%$), esto a pesar de su efecto represor sobre el

ARNm de TRPV1 (**Figura 13**). Por otro lado, las concentraciones de 10 y 100 nM de testosterona producen una disminución de la proteína de TRPV1 (Control 100%; $74.6 \pm 10.9 \%$ y $80.47 \pm 5.5\%$, respectivamente). Como se muestra por imágenes representativas de TRPV1, la proteína se observa como una doble banda que representa la forma hiperglicosilada y la no glicosilada de la proteína TRPV1 (Ortiz et al., 2017).

A partir de estos datos se infiere que a baja concentración de testosterona (1 nM) existe un mecanismo independiente de la regulación transcripcional que mantiene sin cambios los niveles proteicos de TRPV1, esto pese a la disminución de la cantidad del ARNm. Dicho mecanismo no ocurre a concentraciones más altas (10 y 100 nM). Asimismo, la disminución de la proteína de TRPV1 es mayor a 10 nM de testosterona, este efecto se conserva, pero en menor medida que 100 nM, algo similar a lo observado en la represión del ARNm de TRPV1 que es menos efectiva a mayor concentración del tratamiento.

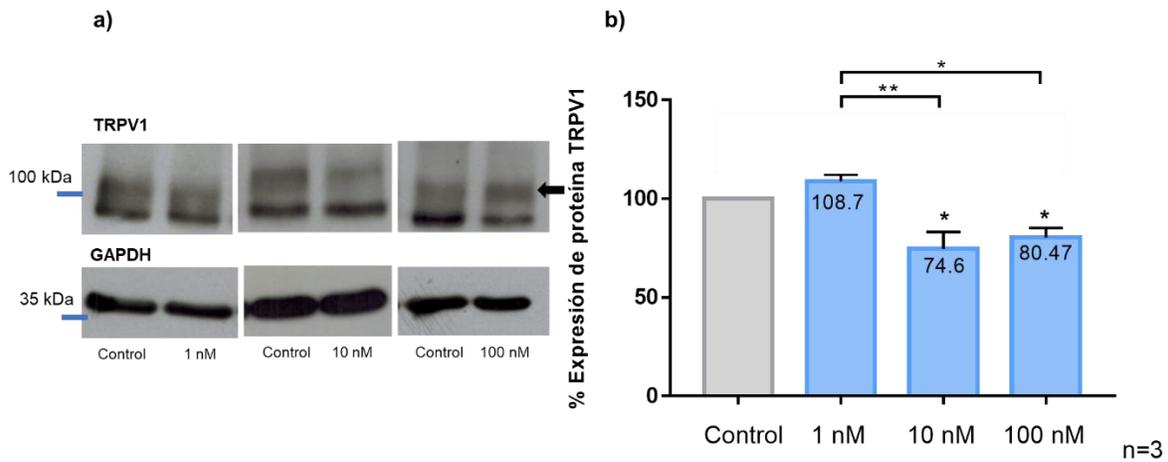


Figura 13. Efecto del tratamiento de testosterona sobre niveles proteicos del canal TRPV1 en cultivos primarios de DRG (24 horas). **a)** Western Blot representativo para inmunodetección de TRPV1 y GAPDH después de tratamiento de testosterona 1, 10 y 100 nM, flecha negra indica forma hiperglicosilada de TRPV1. **b)** Gráfica de datos normalizados por densitometría de TRPV1 en relación con el control de carga (GAPDH). Los datos se analizaron con respecto a los niveles proteicos del cultivo control (100%). El tratamiento de 1 nM (concentración baja), no genero cambios significativos de la proteína total de TRPV1 ($108.7 \pm 5.1\%$), mientras que 10 nM (concentración alta) disminuye la proteína 25.4% ($74.6 \pm 10.9\%$). La concentración más alta, disminuye la proteína de TRPV1 en alrededor de un 19.6% ($80.4 \pm 5.5\%$). n: número de experimentos independientes = 3. Prueba t Student $*p < 0.05$. Análisis estadístico entre tratamientos ANOVA $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$.

De igual manera se midieron los cambios en los niveles proteicos del AR. En el caso de esta proteína se observó un aumento significativo en sus niveles bajo las tres concentraciones de testosterona (**Figura 14**). El tratamiento de 1 y 10 nM de la hormona aumentó poco más del doble la proteína total del AR (control 100%; $206.2\% \pm 6.3$ y $202.1\% \pm 18.8$, respectivamente), en tanto que 100 nM generó un mayor aumento del AR con respecto al control ($264.5\% \pm 20.5$). Por lo tanto, la testosterona regula positivamente los niveles proteicos de su receptor después de 24 horas de exposición al tratamiento en cultivos primarios de DRG.

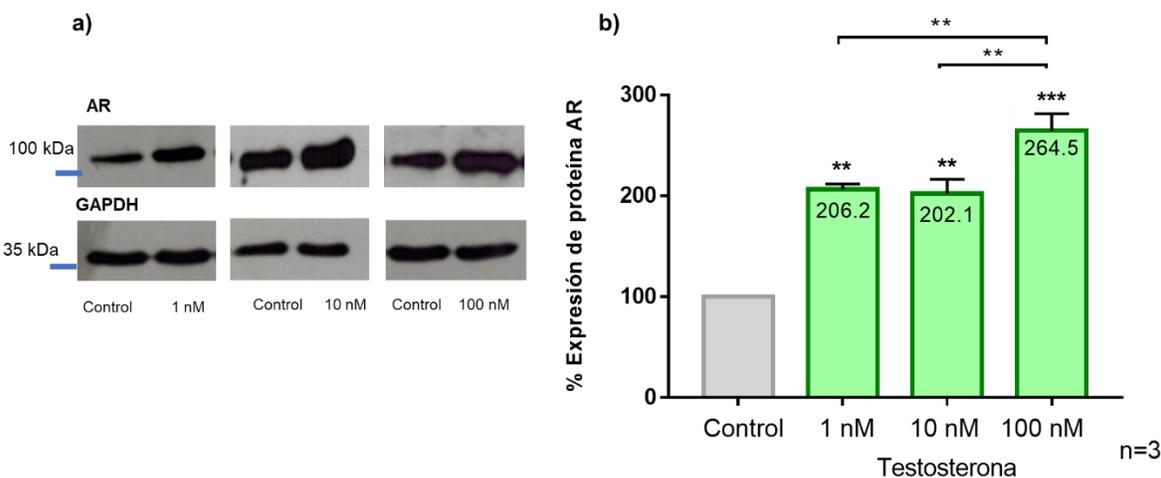


Figura 14. Efecto del tratamiento de testosterona sobre niveles proteicos del Receptor de Andr6genos en cultivos primarios de DRG (24 horas). **a)** Western Blot representativo para inmunodetecci3n de AR y GAPDH despu3s de tratamiento de testosterona 1, 10 y 100 nM. **b)** Gr3fica de datos normalizados por densitometr3a del AR en relaci3n con el control de carga (GAPDH). Los datos se analizaron con respecto a los niveles proteicos del cultivo control. El tratamiento de 1 nM (concentraci3n baja) y 10 nM (concentraci3n alta) regulan de manera positiva la cantidad de prote3na del receptor de andr6genos, el esteroide tuvo un efecto mayor en aumentar los niveles proteicos del AR ($206.2 \pm 6.3\%$, $202.1 \pm 18.8\%$ y $164.5 \pm 20.5\%$, respectivamente) en comparaci3n con el valor establecido para el control (100%). n: n3mero de experimentos independientes = 3. Prueba t Student $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$. An3lisis estad3stico entre tratamientos ANOVA $**p < 0.01$.

Con el objetivo descartar que los cambios a nivel proteico de TRPV1 requirieran m3s tiempo para ser observados de manera clara, se realizaron cultivos primarios de neuronas de DRG tratados con las tres concentraciones de testosterona durante 48 horas (**Figura 15**).

Posterior a este periodo, se determin3 que el tratamiento de 100 nM de la hormona mantuvo la disminuci3n de la prote3na total de TRPV1 muy similar a lo observado despu3s de 24 horas ($84.7 \pm 7.1\%$). Por otro lado, 10 nM fue menos efectivo sobre TRPV1, el tratamiento mostro una tendencia de disminuci3n proteica, sin embargo, estos cambios no fueron estad3sticamente significativos y con niveles proteicos

similares al grupo control ($95.8 \pm 4.6\%$). De manera muy interesante 1 nM de testosterona produjo un aumento significativo de TRPV1 ($138.2 \pm 3.33\%$) a diferencia del tratamiento de 24 horas que no genero ningún cambio, además, este aumento a nivel proteico se observa considerablemente en la forma hiperglicosilada del canal (**Figura 15**). Este último resultado hace evidente el mecanismo independiente de la represión transcripcional que a baja concentración de testosterona (1 nM) regula positivamente los niveles proteicos de TRPV1 principalmente en su forma madura hiperglicosilada.

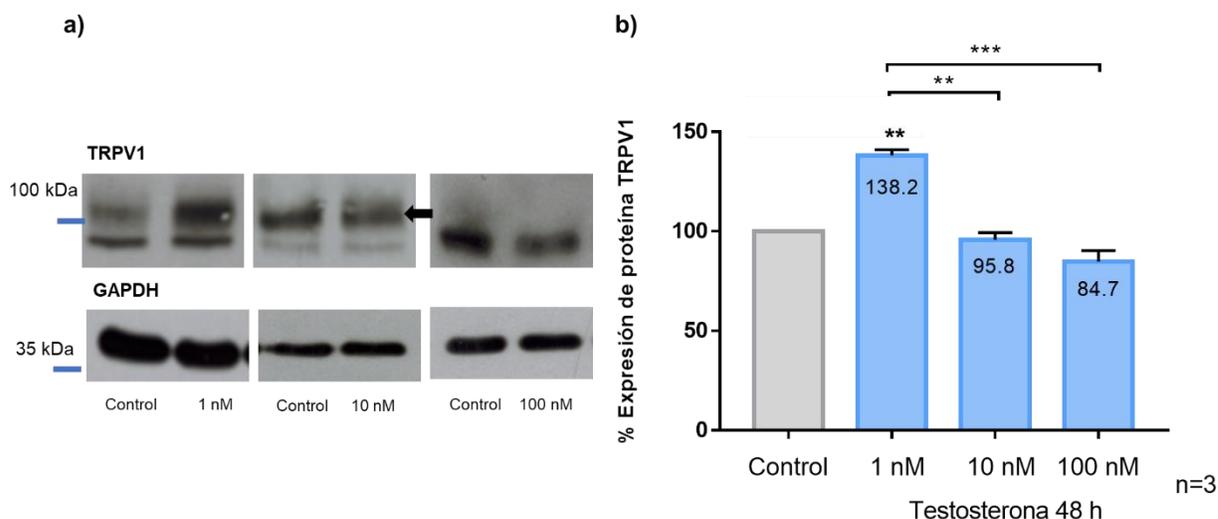


Figura 15. Efecto del tratamiento de testosterona sobre niveles proteicos de la proteína TRPV1 en cultivos primarios neuronas de DRG (48 horas). **a)** Western Blot representativo para inmunodetección de TRPV1 y GAPDH después de tratamiento de testosterona 1, 10 y 100 nM, flecha negra indica forma hiperglicosilada de TRPV1. **b)** Gráfica de datos normalizados por densitometría de la señal detectada para la proteína TRPV1 en relación con el control de carga (GAPDH). Los datos se analizaron con respecto a los niveles proteicos del cultivo control. El tratamiento de 1 nM (concentración baja), aumenta de manera significativa la proteína total de TRPV1 ($138.2 \pm 3.33\%$), especialmente la forma hiperglicosilada de la proteína, mientras que 10 nM (concentración alta) presenta una tendencia a la disminución de TRPV1 del $4.2 \pm 4.6\%$. La concentración mayor del esteroide produce una disminución discreta de los niveles de la proteína de TRPV1 ($15.3 \pm 7.1\%$). n: número de experimentos independientes = 3. Prueba t Student $**p < 0.01$. Análisis estadístico entre tratamientos ANOVA $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$.

Por último, se determinó que la testosterona induce aumento de los niveles proteicos del AR en los tres tratamientos de 48 horas (**Figura 16**). A diferencia de lo obtenido después de 24 horas, 1 nM de la hormona genero un aumento de solo el 26.0% \pm 7.5, mientras que en 10 y 100 nM el aumento fue mayor, 48.3% \pm 17.7 y 56.1% \pm 21.0 respectivamente.

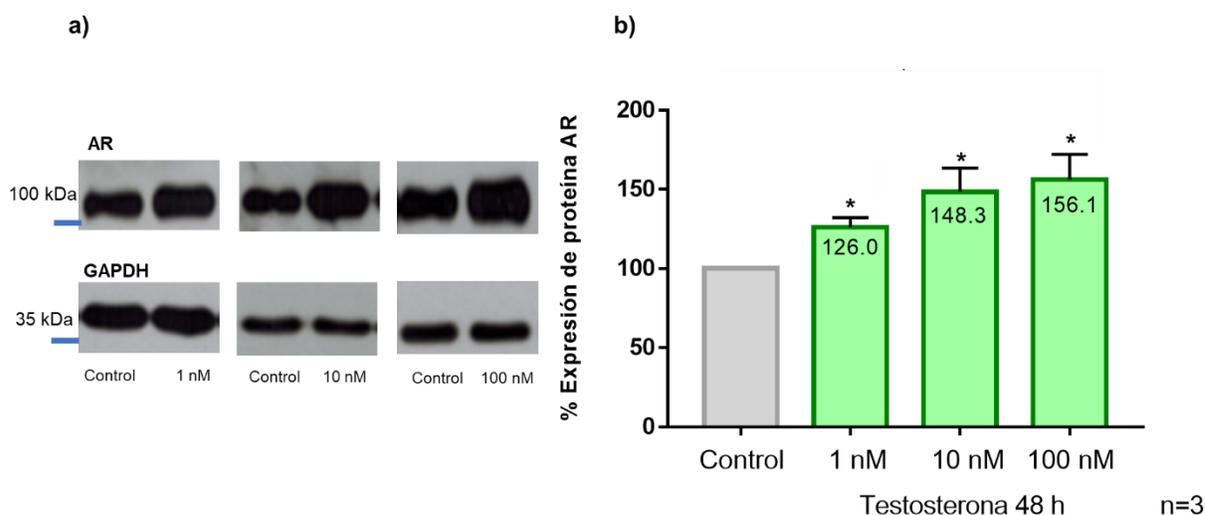


Figura 16. Efecto del tratamiento de testosterona sobre niveles proteicos del Receptor de Andrógenos en cultivos primarios de neuronas DRG (48 horas). Western Blot representativo para la inmunodetección del AR y de GAPDH después del tratamiento de testosterona 1, 10 y 100 nM. **b)** Gráfica de datos normalizados por densitometría del AR en relación con el control de carga (GAPDH). Los datos se analizaron con respecto a los niveles proteicos del cultivo control. El tratamiento de 1 nM (concentración baja), 10 nM (concentración alta) y 100 nM (concentración suprafisiologica) regulan de manera positiva la cantidad de proteína del receptor de andrógenos (126.0 \pm 7.5%, 148.3 \pm 17.7% y 56.1 \pm 21.0%, respectivamente, en comparación del control (100%). n: número de experimentos independientes = 3. Prueba t Student con *p<0.05. Análisis estadístico entre tratamientos ANOVA; no significativo.

Caracterización de la expresión del Receptor de Andrógenos en la línea celular HEK-293.

En resumen, los datos obtenidos en cultivos primarios de neuronas DRG tratados con bajas concentraciones de testosterona muestran que los niveles proteicos de TRPV1 se mantienen después de 24 horas e incluso aumentan significativamente por una exposición prolongada al esteroide (48 horas) en contraste con la disminución de su ARNm. A partir de este resultado decidimos realizar experimentos para determinar si dicho efecto está mediado por la testosterona de manera independiente del AR o se debe a una acción no clásica de este receptor.

Para abordar este objetivo inicialmente se caracterizó la expresión del AR en la línea celular HEK-293. Con un extracto de proteína total de estas células, cultivos primarios de neuronas DRG y testículo (controles de expresión positivo), se realizó un ensayo de Western Blot, como se muestra en el gel representativo para la inmunodetección del AR se observa una banda al peso esperado para el AR en los extractos proteicos de testículo y cultivos de neuronas DRG, como se habíamos observado anteriormente, en cambio no se obtuvo ninguna señal para las células HEK 293 (**Figura 17a**). Con la finalidad de descartar que la falta de señal fuera resultado de una muy baja cantidad de proteína del AR, se realizó una detección a nivel de mensajero para el AR en los tres tipos celulares mediante un ensayo de PCR punto final. Se utilizaron oligonucleótidos que flanquean una región entre el exón 1 y 2 del AR y el producto de amplificación fue observado después de 35 ciclos en un gel de agarosa. Se observó la amplificación positiva en testículo y cultivos de DRG, pero ninguna señal para células HEK-293 (**Figura 17b**).

Por último, considerando el aumento de los niveles proteicos del AR inducidos por el tratamiento de testosterona en cultivos primarios de DRG, decidimos realizar ensayos similares en las células HEK-293 tratadas con distintas concentraciones de la hormona (1, 10 y 100 nM) durante 24 horas. Mediante Western blot se observó que el tratamiento no generó ningún cambio en la detección del AR, ya que no hubo señal positiva para este receptor en ninguno de los tratamientos (**Figura 17c**). En conjunto, estos resultados descartan la expresión del AR en esta línea celular lo que permite el uso de las células HEK-293 como un sistema donde es posible manipular la presencia del AR como una variable experimental.

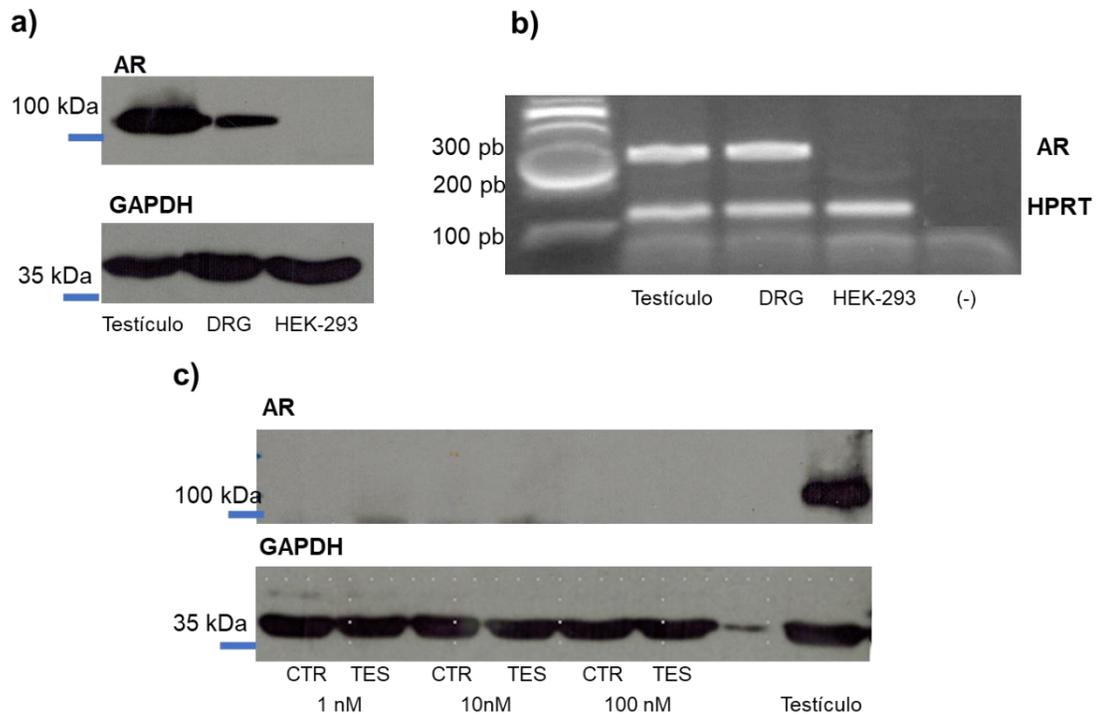


Figura 17. Caracterización de la expresión del receptor de Andrógenos en células HEK-293. a) Gel representativo de Western Blot para la inmunodetección del AR en extractos de proteína total de testículo (control positivo), cultivos primarios de neuronas DRG y células HEK-293 y su correspondiente control de carga GAPDH. b) Gel de agarosa al 1.5% para detectar el producto de amplificación por PCR punto final después de 35 ciclos de ARN total de testículo (control positivo), cultivos primarios de neuronas DRG y células HEK 293 y su control de carga HPRT. c) Gel representativo de Western Blot para la expresión del AR en extractos de proteína de células HEK-293 tratadas con 1, 10 y 100 nM de testosterona por 24 horas, el tratamiento con la hormona no induce la expresión del AR en esta línea celular.

Efecto de la Testosterona sobre los niveles proteicos de TRPV1 independiente del Receptor de Andr6genos

Como se ha reportado, los efectos de la testosterona independientes de su receptor han sido probados en ensayos donde se aplica la hormona junto con un inhibidor especfico del AR o en un sistema donde ha sido suprimida o carece de la expresi3n del receptor (Levin y Hammes, 2016). Con base al resultado obtenido en las c3lulas HEK-293, que no expresan a este receptor de manera end3gena, se evalu3 si la testosterona puede ejercer alg3n efecto en los niveles de la prote3na TRPV1. Estas c3lulas fueron transfectadas con un vector para la expresi3n transitoria de TRPV1 y se trataron durante 24 horas con las concentraciones de testosterona utilizadas en los experimentos previos.

Se observ3 que los tratamientos dentro del rango fisiol3gico de 1 y 10 nM de testosterona no generan ning3n cambio en los niveles proteicos de TRPV1, mientras que la concentraci3n suprafiol3gica de 100 nM induce un aumento del $23.1 \pm 5.6\%$ de la prote3na con respecto al control (**Figura 18**). A diferencia de lo observado en cultivos primarios de DRG el tratamiento de 1 nM no ejerce una regulaci3n positiva de TRPV1. Por lo que es posible que el mecanismo asociado requiera la presencia del AR.

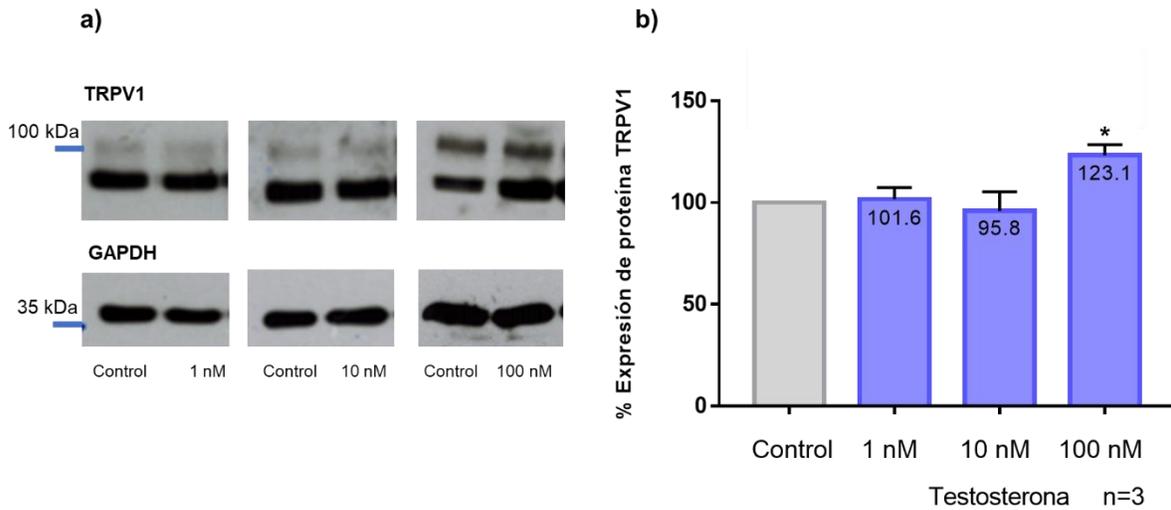


Figura 18. Efecto del tratamiento de testosterona sobre niveles proteicos de TRPV1 independientes del Receptor de Andr6genos a) Western Blot representativo para inmunodetecci3n de TRPV1 y GAPDH en c3lulas HEK-293 transfectadas para la expresi3n transitoria de la prote3na TRPV1 despu3s del tratamiento de testosterona 1, 10 y 100 nM durante 24 horas. b) Gr3fica de datos normalizados por densitometr3a de TRPV1 en relaci3n con el control de carga (GAPDH). Los datos se analizaron con respecto a los niveles proteicos de las c3lulas control (100%). El tratamiento de 1 nM (concentraci3n baja) y 10 nM (concentraci3n alta) del esteroide no genera cambios significativos en la prote3na de TRPV1 ($101.6\% \pm 6.7$ y $95.6\% \pm 8.6$), respectivamente. La concentraci3n de 100 nM produce un aumento de la prote3na de TRPV1 ($123.1\% \pm 5.6$). n: n3mero de experimentos independientes = 3. Prueba t Student con $*p < 0.05$. An3lisis estad3stico entre tratamientos ANOVA; no significativo.

Acciones no cl3sicas del Receptor de Andr6genos sobre TRPV1.

Como se ha descrito recientemente, el AR tiene la capacidad de modular la funci3n de canales i3nicos como TRPM8 a trav3s de una interacci3n directa que no involucra acciones de tipo gen3micas (Grolez et al 2019; Gkika et al 2020). Esta v3a de acci3n alternativa es importante, ya que cabe la posibilidad que el AR ejerza alg3n mecanismo que module los niveles proteicos de TRPV1 de manera positiva en oposici3n a la represi3n transcripcional de su gen ocasionada por la combinaci3n de la testosterona y el AR. Para explorar esta posibilidad, la secuencia codificante del AR fue clonado en un vector para su expresi3n en las c3lulas HEK-293 para

evaluar el efecto de su expresión sobre los niveles proteicos de TRPV1. A partir de ARN total extraído de glándulas suprarrenales de ratón (cepa C57BL6) se realizó la amplificación de la secuencia codificante del AR (Figura 19a). Posteriormente, el producto amplificado se clonó en el vector pCMV-Tag2b. Finalmente, esta construcción fue transfectada en células HEK-293 y se verificó su expresión mediante la detección de la proteína por Western Blot (Figura 19b).

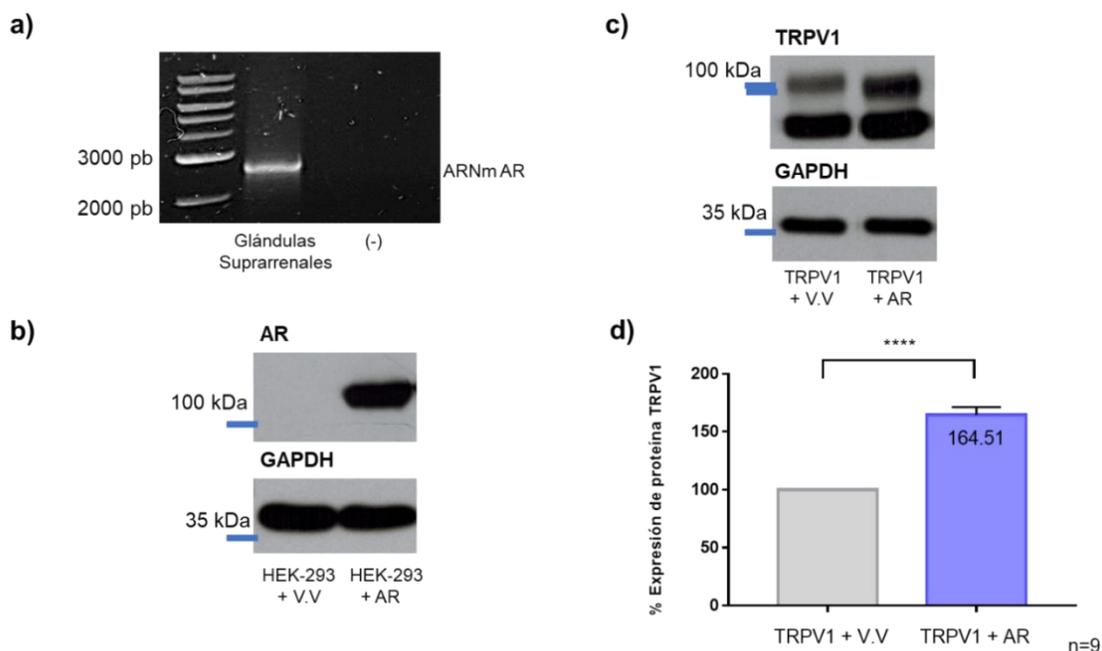


Figura 19. Acciones no clásicas del Receptor de Andr6genos sobre los niveles proteicos de TRPV1. **a)** Gel de agarosa al 1.5% para detección de la amplificación por PCR punto final después de 35 ciclos de la secuencia codificante del AR. Producto de amplificación de 2700 pb. **b)** Western Blot representativo para inmunodetección del AR en células HEK-293 transfectadas con vector para la expresión transitoria de AR y células transfectadas con el vector vacío (V.V), GAPDH como control de carga. **c)** Western Blot representativo para inmunodetección de TRPV1 y GAPDH en células HEK-293 co-transfectadas para la expresión transitoria del canal TRPV1 y el AR. **d)** Gráfica de datos normalizados por densitometría de TRPV1 en relación con el control de carga (GAPDH). Los datos se analizaron con respecto a los niveles proteicos de las células control que se transfectaron con TRPV1 y el vector vacío. La expresión del AR regula de manera positiva los niveles proteicos de TRPV1 ($164.51 \pm 14.9\%$) en comparación con el control (100%). n: número de experimentos independientes = 9. Prueba t Student **** $p < 0.0001$.

Para evaluar las acciones del AR sobre los niveles proteicos de TRPV1 inicialmente se co-transfectaron células HEK-293 con los vectores que expresan a cada una de estas proteínas. Después de 48 horas de la transfección evaluaron los niveles en la proteína de TRPV1. De manera interesante, la presencia del AR (sin testosterona) generó un aumento de manera significativa la cantidad de proteína de TRPV1 ($164.51 \pm 14.9\%$) con respecto a las células donde únicamente fue transfectado TRPV1 y el vector vacío (100%) (**Figura 19c y 19d**). Este resultado descarta cualquier regulación de tipo transcripcional ya que el vector de TRPV1 dirige su expresión por un promotor de CMV, por lo tanto, el aumento de los niveles proteicos del canal es resultado de una acción no clásica del AR e independiente de testosterona, sobre los niveles proteicos de TRPV1.

Por último, se consideró importante evaluar el efecto del AR sobre la proteína de TRPV1 en presencia de testosterona. Después de 24 horas de la co-transfección, las células HEK-293 recibieron tratamiento del esteroide durante 24 horas. Posteriormente se determinaron los niveles proteicos de TRPV1. Los resultados de estos experimentos mostraron que la exposición 1 nM (baja concentración) de la hormona produjo una disminución la cantidad de proteína de TRPV1 al $72.5 \pm 6.8\%$ con respecto a las células que únicamente tuvieron el vehículo de la testosterona (metanol). Este efecto fue mayor cuando se aplicó la dosis alta de la hormona de 10 nM donde hubo una disminución de la proteína al $67.8 \pm 6.4\%$. De igual manera 100 nM redujo los niveles proteicos de TRPV1 ($78.9 \pm 2.1\%$). Sin embargo, este efecto fue menor en comparación con las concentraciones fisiológicas (**Figura 20**). Esto indica que la testosterona actúa como un inhibidor de la regulación positiva que ejerce el AR sobre la proteína de TRPV1 y que este efecto aumenta a concentraciones mayores dentro del rango fisiológico.

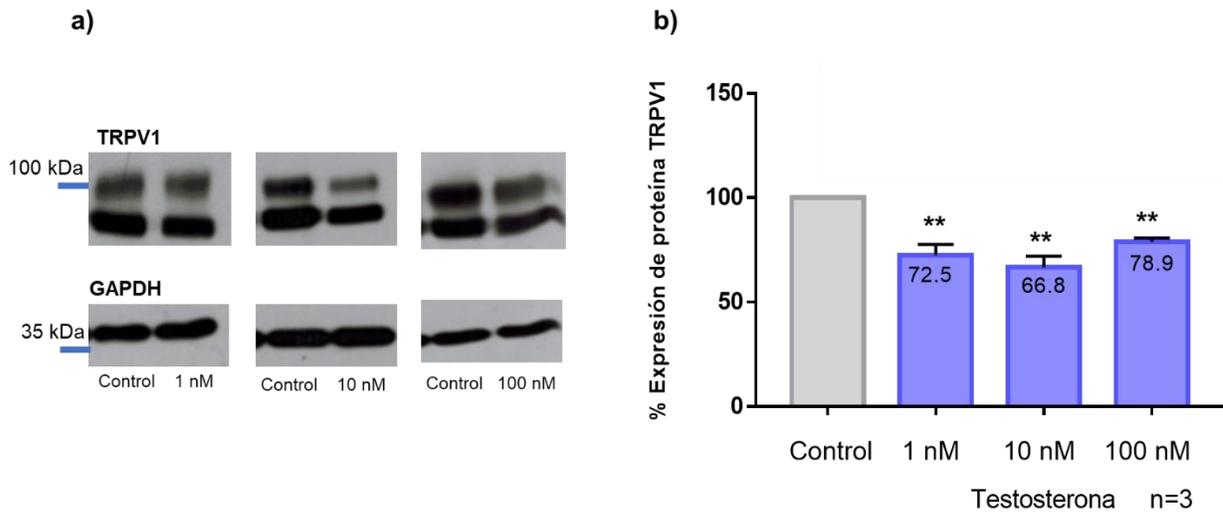


Figura 20. Acciones no clásicas del Receptor de Andr6genos sobre los niveles proteicos de TRPV1 en presencia de testosterona. a) Western Blot representativo para inmunodetecci3n de TRPV1 y GAPDH en c6lulas HEK-293 co-transfectadas para la expresi3n transitoria del canal TRPV1 y el AR despu3s de tratamiento de testosterona 1, 10 y 100 nM durante 24 horas. b) Gr3fica de datos normalizados por densitometr3a de TRPV1 en relaci3n con el control de carga (GAPDH). Los datos se analizaron con respecto a los niveles proteicos de las c6lulas control (100% de expresi3n) que recibieron 6nicamente el veh3culo de testosterona. El tratamiento de 1 nM (concentraci3n baja) y 10 nM (concentraci3n alta) y 100 nM (concentraci3n suprafisiol3gica) del esteroide induce una disminuci3n significativa de los niveles proteicos de TRPV1 $27.5 \pm 6.8\%$, $33.2 \pm 6.4\%$ y $21.1 \pm 2.1\%$, respectivamente. Se observa un efecto dependiente de la concentraci3n en la disminuci3n de TRPV1 dentro del rango fisiol3gico). n: n6mero de experimentos independientes = 3. Prueba t Student con $**p < 0.01$. An3lisis estad3stico entre tratamientos ANOVA; no significativo.

Adicionalmente determinamos si la testosterona produce alg6n cambio sobre los niveles proteicos del AR. Se observ3 que las concentraciones dentro del rango fisiol3gico de 1 y 10 nM no producen ning6n cambio significativo en la prote3na del AR ($94.6 \pm 4.9\%$ y $95.7 \pm 13.8\%$, respectivamente), mientras que la concentraci3n de 100 nM aumento en un $19.5 \pm 2.5\%$ los niveles prote3nicos del AR (**Figura 21**). Es decir, la testosterona modifica los niveles prote3nicos del AR s3lo a la concentraci3n de 100 nM. De igual manera, este resultado indica un efecto independiente de cualquier regulaci3n de tipo transcripcional, ya que el vector de AR dirige su expresi3n por un promotor de CMV, por lo tanto, el aumento de los niveles proteicos del receptor es resultado de una acci3n de testosterona sobre la prote3na del AR.

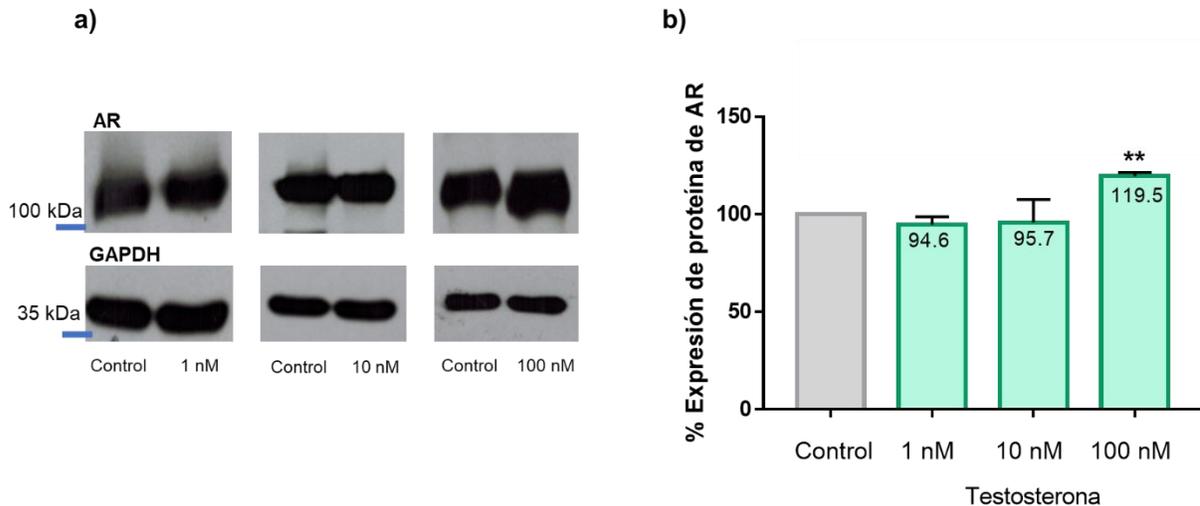


Figura 21. Efecto de testosterona sobre los niveles proteicos de AR independientes de la regulación transcripcional. **a)** Western Blot representativo para inmunodetección de AR y GAPDH en células HEK-293 co-transfectadas para la expresión transitoria del canal y el AR después de tratamiento de testosterona 1, 10 y 100 nM durante 24 horas. **b)** Gráfica de datos normalizados por densitometría del AR en relación con el control de carga (GAPDH). Los datos se analizaron con respecto a los niveles proteicos de las células control que recibieron únicamente el vehículo de testosterona. El tratamiento de 1 nM (concentración baja) y 10 nM (concentración alta) del esteroide induce una ligera disminución no significativa de la proteína del AR ($94.6 \pm 4.9\%$ y $95.7 \pm 13.8\%$, respectivamente) con respecto al control (100%). La concentración de 100nM produce un aumento de la proteína del receptor ($119.5 \pm 2.5\%$). n: número de experimentos independientes = 3. Prueba t Student con $**p < 0.01$. Análisis estadístico entre tratamientos ANOVA; no significativo

Análisis bioinformático de posibles sitios de unión para el Receptor de Andrógenos en la región promotora del gen de TRPV1.

Por último, una vez que se observó que el tratamiento con testosterona reduce los niveles de ARNm de TRPV1, la hipótesis de una modulación de tipo transcripcional del gen por acciones clásicas del AR se ve fortalecida debido a los datos proporcionados por el análisis bioinformático que muestra tres sitios con alta probabilidad de interacción en la región promotora del gen TRPV1 (**Figura 9**). Este ensayo se realizó nuevamente con la base de datos actualizada (JASPAR 2020)

utilizando la secuencia de 1500 pb rio arriba del exón 1 del gen de TRPV1 de ratón. Dicho análisis confirmó los sitios previamente obtenidos y adicionalmente encontró un sitio nuevo dentro de la secuencia con probabilidad de interacción (**Figura 22**). Por lo tanto, este análisis arrojó 4 posibles elementos de respuesta a andrógenos en el promotor del gen TRPV1 de ratón.

Promotor TRPV1, Ratón

CCAGACTAGTCATGTGATCTGAAAGTCATGTGATCTGAATAACTGTCTAACACCTCCGAGT
CACAGGTTTCTCTTCAAGCCACTTGAGTATGACAGTCTTTGCTCCCCCTTGCTCAGGGTTG
TTACTGGGCTAGAGGTGGGTGGGAGAAAGCTCTTTGGTACCCTTCTGCAGGGGTGGC
TGGGAGTTACTGTGCTCTGATGACTCCAATCTGGTCCCAGCTTTGTACTACTCCAGGAG
GAGCTGCAGTGGCTGGTCTGAGCTCCATCCAGGCTGTGCTGAACCATGACTTGTAAA
GAAATAAAAAGGAAAGAAAAGGACATGGCCACTCCTAGGTATGGTGAGGAGAACGTTT
ATTGTAGATAAAGGGCAAGCATAGCCAGAGGCAGACATGTCTGGGAGAGTCCAGAGTGG
TTGTGTCCTGAGCCATGTGGGGAGGTGGGGTGGGGGCTCGCAGAGAGGGAGGGAGA
GAGGAGAGAGGGGAACCAGATGCAGCAGCCAGGAGGCCAAAGGTACAAAAGGGGTAG

ERA

GGAACCAATGTATAGATTATATAGGGAAGAGCCTCTGGCAGAAGGGCAGCCAGCCCT
CTGGGCTGGAGAGTTCAAGGATAGGGTAGGGTATGCCAGCCATACCCTGAAACAGGTA
GGGATTGAGGGTCTGGGAGAACCTAGAGGTCCAGTCCACTTTGACATGTTAAATAGG
CATCTCAGCCATTTGCCAGGGTAATATAATTGAAACGTAATATAATTTGAAATGTAATACAA
TTCAGATCCCCCTGGCTTCCCTAGTGGCAGTTGCTTGGGTGGATGGATTTTGCAGAAATGTT
TGTGGGTGCAGCCTTGCACGTAAGTCCCTGAAAGCTGGTGGACTTTCCTAGGCAGGATCT

GGGAAGGAGTGGACTTGTTCATACACACTGTGTGTGATGTGTGATGATGAACCTGC

ERA

TTCTTGAGTGTAGGACGGCATTGGAGGAGGTGAGAAATTAGCACACATCATTGTTGTG
TGTGTGTTCTGTGTTCACTAAGGAACCCAGTCCAGTAAGATTGGGCTCTGGAAGA
CCTAGAGACCCCCAAGCTTAATCTCTACCCTGGGTTTGGTACACAGGAACCCAGAGGC

ERA

CCAAAGGAGGACGGGCTCCAGACGAGACAGGTGGCTCAGAGGTCCCAGTCATTTCC
TTGAAAACACGGCAGCTTCAGGACACTGGGTTTGCATCTCTGGCTGTGAGAGTCTT

ERA

TAAAGGAGCTACTTCCAGACATATAGAAAAGATGGTTTGGAAAATCAAGGCTCCAAGAG
CTAAGGCTAGGCTTAGGCTGGACTGGGCTGCAGGCAGCTAAGTGCACCTCGGCCCTGG
CATGACTGGGGTGGGCATTGGCTGTGGTTTCTGAAAAAGGGCAAAAATGATGGGAAA
AGCTTTGGGATCCTC

JASPAR 2020



Figura 22. Posibles sitios de unión para el Receptor de Andrógenos en la secuencia analizada de TRPV1 de ratón. Esquema representativo de la ubicación de los sitios con mayor probabilidad de interacción para el Receptor de Andrógenos. Se muestran los cuatro posibles elementos de respuesta a andrógenos (ERA) de los 25 resultados obtenidos en la secuencia analizada en la base de datos JASPAR 2020 con parámetro de umbral del 70%. Letras rojas corresponden a parte de la secuencia del exón 1.

Adicionalmente, se analizaron las secuencias promotoras del gen de TRPV1 de humano (secuencia obtenida de Eukaryotic Promoter Database, EPD) y rata (NCBI: DQ015702.1) bajo los mismos parámetros. La base de datos revela que en ambas secuencias se presentan posibles elementos de respuesta a andrógenos (**Figura 23** y **Figura 24**). Esto es un dato interesante que indica la importancia de este tipo de hormonas para la regulación de genes como TRPV1 por la presencia de

potenciales sitios que permitan la unión del AR para la modular de manera transcripcional su expresión que se encuentra conservado entre especies.

Promotor TRPV1, Humano 1

GAGCAGGGCAGGGATCTGGGGGCTTCATGGAGGAGGCGGCATCAGTCTGGATCCTGAGGGGAA
 GTAGCATCTGAGTGGTGATAGGACTTTGTCAAAGGTTAGCAGAGGAAAGGCCCTTAGGTGGAGAC
ERA
 CCGATGGGAATAGAGGCTATGGGAGGGATGATGGGCCACCCCTGGGTGCCAGGGAGTGGGGATG
 CCCAGCCAGAGGGAGGGGAAGCATGGGGATGGGGCAGGATGGGAGTGGAAAATAGCATCAGCTC
 ATGTGTCCAACCTACACATGCTGCTGCCAGCGGCCAGCTGATCTCTAGGTGTTAGGCCTAGAAGAC
ERA
 CAACCAGCTCCAAATCACTTAAAGCCTAAACGTTCCCTGTCTCTACTAAAAATACAAACATTAGCCACG
 CATGGTGGCGGGCGCCTGTAATCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGGAGGAGAATCGCTTGAACCG
 GGAGTGGAGGTTGCAGTGAGCAGAGATTGCCCATTCACACTAGTCTGGCGACAGAGTGAGA
ERA **ERA**
 CACACAGACGCT
 AAACATTC

Promotor TRPV1, Humano 2

AGCCAACCCCTACTCCAGTTTGGGACCCAGGAACGAGAGGCCCTAAGAGAGTTAGGGACTAGT
ERA **ERA**
 TCAAGGTTGCTCGGACTCTCAAACAAGTCCCTAATGCCAGGCCAGTACTGTGTGGCGGCCAGCAC
ERA
 GACCCCTCCATCCCTCTTTATTTTGA AAAACCGGAACAGTTACAGGACGCTAGTTTGACGTCGCTGGTT
ERA
 GTGAATGTCATTTGTGGAGCCGTTTCCAGACCTCCGGGGCAGGAGCCACAGGTTTGAGAGGCC
 GAGCAGCCCTCCTTTCTGAGAGCTGAGGTTGCAGCTCTGGCTGGCTCTGGTAAGTCTCTGCA
 GCCCTGGCATGGCTGGAGGAGGGGCAGCAGCTAAGTGGTTCTGAAAAAGGGCAAAAATGATGGG
 AAAAGCTTTGGGATCCTCTGGAATCAGAGCCGCAGCAAAGGCAGCTGCTTGATCCTGGAAACGT
ERA
 TTTTTCCTTGAGTGC CGAAGGGCGTCCACAGCGACTCTGCTAGTGCAGGGCAGCTGCTGCCAGG
 GCCGGCCCGGGACCCACGGAGGCGGGGAGACCCTTCTCCACACGAGCCAGCTCTCC
 TTCGAGTAG

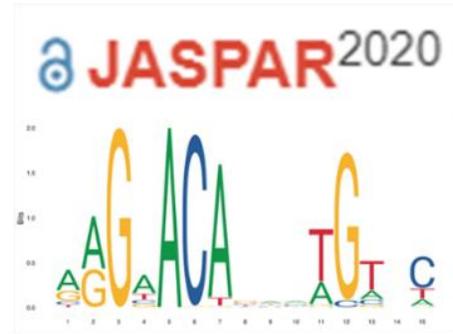


Figura 23. Posibles sitios de unión para el Receptor de Andr6genos la regi3n promotora de TRPV1 de Humano. Esquema representativo de la ubicaci3n de los sitios con mayor probabilidad de interacci3n con el Receptor de Andr6genos como posibles elementos de respuesta a andr6genos (ERA). An3lisis de los dos promotores del canal TRPV1 reportados en la base de datos EPD en JASPAR 2020 con par3metro de umbral del 70 %.

nucleótidos está compuesta por dos hexámeros separados por tres bases 5' AGAACAnnnTGTTCT 3', este sitio parece ser una región de reconocimiento en común para todos los receptores de clase I. Sin embargo, para el AR se ha obtenido evidencia de unión específica a secuencias formadas por dos hexámeros de 5' AGAACA 3' separados por tres nucleótidos en repetición directa (5' AGAACAnnnAGAACA 3') o invertida (5' AGAACAnnnACAAGA 3') conocidos como elementos de respuesta selectivo y clásico, respectivamente (Denayer et al. 2010). El análisis detallado de las secuencias obtenidas en JASPAR tomando en consideración los tres sitios con mayor probabilidad de interacción muestran una alta similitud con los elementos de tipo selectivo. A pesar de no tener una correspondencia total se conservan nucleótidos que de manera experimental se sabe que una mutación en estos sitios reduce o elimina por completo la unión del AR (**Figura 25a**). Por lo tanto, estos posibles elementos de respuesta a andrógenos poseen las características básicas que permiten la unión del AR para regular la transcripción del gen de TRPV1 como se observó en los ensayos de PCR en tiempo real.

Discusión

Durante los últimos años el estudio de la influencia del sexo en el proceso de detección de estímulos dolorosos se ha convertido en tema de relevancia significativa en el campo de la nocicepción. Desde la década de 1990 se ha registrado un aumento considerable de evidencia que argumenta a favor de un dimorfismo sexual en la percepción del dolor y en condiciones de dolor crónico (Fillingim et al., 2009). El mecanismo responsable de estas diferencias aún no está del todo claro, ya que existen una variedad de factores de tipo fisiológico, psicológico y social que pueden influir. Sin embargo, desde el punto de vista fisiológico la explicación más razonable apunta a los esteroides sexuales como las moléculas responsables de estas diferencias debido a las distintas concentraciones presentes entre sexos (Maurer et al., 2016).

Un hecho interesante en humanos es la tendencia en los resultados de numerosas investigaciones donde se mide la respuesta a estímulos dolorosos de tipo térmico, ya sea calor o frío, que muestran una mayor sensibilidad en las mujeres al umbral del dolor y menor tolerancia (Fillingim et al., 2009). Estos estímulos térmicos son detectados por canales iónicos de la familia TRP que incluyen TRPV1, TRPA1 y TRPM8 en las neuronas sensoriales y que están estrechamente relacionados con el dolor agudo o crónico (Julius, 2013).

Para el caso de TRPV1, como ha sido mencionado existen múltiples estudios acerca del papel de los estrógenos, las principales hormonas femeninas, en su expresión. En conjunto los resultados apuntan a una regulación positiva de la expresión de TRPV1 por estas hormonas (revisado en Méndez et al., 2020). Por el contrario, poco se sabe acerca de los efectos de los andrógenos sobre TRPV1, y hasta el momento no ha sido reportado datos referentes a la modulación de su expresión en condiciones fisiológicas normales. Aquí investigamos los efectos de la testosterona sobre TRPV1 mediados a través de su principal receptor, el AR, así como de manera independiente de este. Además, identificamos las acciones que ejerce el AR sobre los niveles proteicos de TRPV1 en presencia y ausencia de su ligando.

Inicialmente, determinamos que el tratamiento con testosterona induce una disminución del ARNm de TRPV1 en cultivos primarios de DRG de ratón después de 24 horas. Observamos que la represión del gen ocurre de manera dependiente de la concentración, siendo más efectivas las concentraciones bajas del esteroide para

ejercer dicho efecto. Mientras que, dosis altas de testosterona que superan el rango fisiológico no producen efectos significativos, pero conservan la tendencia de represión transcripcional.

Como indicamos, el rango de concentración fisiológica de testosterona en circulación reportado es de 12.5 – 40 nmol/L (Diver, 2006). Esta hormona es transportada en plasma unida a proteínas como la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) y/o albumina, por lo que aproximadamente solo el 5% de la hormona en circulación se encuentra libre. Este hecho es de suma importancia debido a que la forma libre del esteroide es biológicamente activa, a diferencia de aquella que está unida a otras proteínas (Nieschlag et al., 2012). Aunque se reconoce que la mayor parte de la testosterona es sintetizada en las gónadas, es necesario además tomar en cuenta la producción local. Se ha determinado que la síntesis de testosterona *in situ* no contribuye de manera relevante a la concentración de testosterona en circulación, pero puede afectar de manera significativa la concentración local en el tejido (Nieschlag et al., 2012). En relación con esto se sabe que el conjunto de células que compone los ganglios de la raíz dorsal (células gliales y somas de neuronas sensoriales primarias) poseen la maquinaria enzimática necesaria para la producción de hormonas incluida la testosterona (Schaeffer et al., 2010). Por lo que considerando estos factores y lo reportado en la literatura, decidimos utilizar 1 y 10 nM de testosterona como concentraciones fisiológicas (baja y alta, respectivamente) para nuestros experimentos y de esta manera determinar los efectos de la hormona sobre TRPV1.

Así, demostramos que la testosterona en concentraciones dentro del rango fisiológico actúa como un regulador negativo de la transcripción de TRPV1. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Bai y colaboradores en 2018, que utilizando un modelo de inflamación inducido por adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas, reportaron una disminución de la cantidad de ARNm de TRPV1 en ganglios del trigémino. Por lo que, la hormona ejerce un efecto transcripcional similar tanto en condiciones normales, así como durante procesos de inflamación.

Con relación al mecanismo involucrado, se sabe que el AR es el principal encargado de ejercer las acciones de tipo transcripcional desencadenadas por la testosterona. Nosotros determinamos que este receptor se expresa en cultivos primarios de neuronas DRG, donde la población de neuronas sensoriales se encuentra enriquecida

(Figura 8). También, se ha observado mediante ensayos de inmunohistoquímica que el AR y TRPV1 co-localizan en neuronas de pequeño y mediano diámetro en ganglios del trigémino de rata (Lee et al., 2016). Por lo que, es factible que la testosterona pueda activar al AR, y de esta manera modular la expresión de genes como TRPV1 en neuronas sensoriales.

Además, mediante análisis bioinformáticos de la región promotora del gen de TRPV1 de ratón, identificamos sitios con potencial para actuar como elementos de respuesta a andrógenos (ERA). Los sitios proporcionados por la base de datos conservan bases esenciales para la unión del receptor de andrógenos, a pesar de no existir una coincidencia total del resto de las bases con la secuencia consenso (Denayer et al., 2010). También, se observa que los ERA propuestos poseen un mayor grado de coincidencia con la secuencia consenso en el primer hexámero, esto se ha reportado que tiene una influencia positiva para la unión del dímero del AR, ya que facilita el reconocimiento del segundo hexámero a pesar de que exista poca afinidad (Wilson et al., 2016). Sumado a esto, dichos elementos de respuesta a andrógenos poseen la estructura de tipo selectiva, es decir, aquellos por los que tiene mayor afinidad el AR y que son reconocidos únicamente por este factor de transcripción, a diferencia de elementos de tipo clásico que pueden ser reconocidos por otros receptores nucleares a esteroides de la Clase I (Denayer et al., 2010).

Al analizar las secuencias promotoras de las especies de rata y humano, también se encontraron posibles elementos de respuesta a andrógenos. Un ejemplo de esto fue reportado por Cai y colaboradores en 2011, que determinaron un sitio de unión para el AR dentro de su propio gen, ubicado en el intrón 2, al cual se une el AR para regularse así mismo. Mediante análisis bioinformáticos, encontraron que dicha secuencia se encuentra conservada en 17 especies de vertebrados, incluyendo rata, ratón y humano. Estos datos son muy interesantes, ya que muestra la importancia de estas moléculas para regular la expresión de genes conservada entre especies. Por lo tanto, proponemos que el AR se une a alguno de los elementos y a partir de esto recluta correpresores que participan en la represión del gen de TRPV1.

Otra alternativa para la regulación del gen de TRPV1 por AR es de manera indirecta a través de la colaboración con otros factores de transcripción previamente unidos al promotor (Levin y Hammes, 2016). En este sentido, se ha reportado que el AR aumenta

la expresión del gen del receptor 3 de la superficie celular del carcinoma hepatocelular productor de eritropoyetina (EPHA3) en respuesta al tratamiento de DHT (Diao et al., 2018). Este efecto se elimina cuando se hacen mutaciones de la región promotora para los sitios de unión del factor de transcripción Sp1. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación de la cromatina, se determinó que el AR forma un complejo con el factor de transcripción Sp1 previamente unido a la región promotora central de EPHA3 para inducir la transcripción del gen por DHT (Diao et al., 2018). Por lo tanto, es posible que el AR pueda modular la expresión de genes como TRPV1 sin la necesidad de elementos de respuesta a andrógenos, ya que existen sitios validados de manera experimental para la unión de Sp1 dentro del promotor del de TRPV1 en la especie de rata (Chu et al., 2011).

Para entender la disminución de la represión transcripcional a mayores concentraciones de testosterona investigamos el efecto de la hormona sobre el AR. Determinamos que la transcripción del AR es regulado por efecto de su ligando. Al medir los niveles de ARNm del AR encontramos que la concentración de testosterona de 1 nM (baja) promueve la transcripción del receptor, mientras que 10 nM (alta) ejerce el efecto contrario al producir una disminución en la cantidad de ARNm. En este sentido, se sabe que el gen de AR presenta una regulación dual por andrógenos. Se ha reportado que dentro de su secuencia existen elementos de respuesta a andrógenos ubicados en el exón 4 y 5 que aumentan su transcripción en respuesta a DHT (Grad et al., 2001). Adicionalmente se ha caracterizado una secuencia compuesta por el promotor y parte la región 5'UTR que contiene un sitio necesario para reprimir la expresión de la proteína mediana por el AR después del tratamiento con testosterona y DHT (Vismara et al., 2009). Este mecanismo de autorregulación representa un sistema que responde a distintas concentraciones de la hormona. Es decir, que se presenta una retroalimentación negativa cuando se estimula con altas concentraciones de su ligando (Cai et al., 2011). Este cambio en la dirección de la expresión del AR puede tener consecuencias sobre su papel como factor de transcripción en sus genes blanco como podría ser el caso de TRPV1.

En este sentido, también se ha determinado que el AR posee en su estructura 23 sitios que son susceptibles a modificaciones postraduccionales como por ejemplo fosforilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones y metilación, esto en respuesta a la

exposición de testosterona o DHT (Gioeli y Paschal 2012). Lo anterior genera cambios en la proteína que alteran la estabilidad del receptor, su interacción con otras proteínas, la localización celular y modifica su estructura, lo que puede afectar la modulación sobre sus genes blanco (Coffey y Robson, 2012). De la variedad de fosforilaciones que presenta el AR, la adición de un grupo fosfato en la serina 81 es de las más comunes y es dependiente de andrógenos (Gioeli et al., 2002). La modificación de este residuo disminuye la capacidad del receptor para regular la expresión de genes blanco, esto se observa en mayor medida a altas concentraciones de DHT (Gordon et al., 2010). Por lo tanto, los andrógenos pueden cambiar la selectividad del AR por determinados promotores a través de este tipo de modificaciones (Gordon et al., 2010). De forma similar, se puede presentar este fenómeno sobre el promotor de TRPV1, donde a altas concentraciones de testosterona la represión transcripcional del gen disminuye.

Continuando con los efectos de la hormona sobre su receptor, observamos que la proteína total del AR aumenta de manera significativa después de 24 horas del tratamiento con testosterona, el efecto se observa en las tres concentraciones del tratamiento, independientemente de la regulación a nivel transcripcional. Se ha reportado un efecto similar en distintas líneas celulares de cáncer de próstata como LNCaP, LAPC4 y CWR22Rv1 que, después de un tratamiento de 24 horas de DHT los niveles proteicos de AR aumentan (Kempainen et al., 1992). Este efecto se ha asociado a un aumento en la estabilidad del AR unido a su ligando lo que modifica el recambio normal de la proteína (Vismara et al., 2009). En contraste en la línea celular VCaP la DHT regula negativamente los niveles proteicos del AR después de 24 horas lo que indica que la regulación del receptor depende del tipo celular (Cai et al., 2011). De manera interesante, luego de 48 horas de tratamiento, el aumento de la proteína no fue tan evidente, posiblemente esto se deba a que, a periodos más largos de tiempo existen otros mecanismos de regulación que modulan a la proteína de AR. Por lo tanto, nuestros resultados proporcionan algunos datos respecto a la modulación del AR en ARNm y proteína por efecto de su ligando testosterona en neuronas de DRG, algo hasta el momento desconocido.

Adicionalmente, investigamos los cambios a nivel proteico de TRPV1 después del tratamiento con testosterona en cultivos primarios de DRG. Observamos que la concentración alta (10 nM) y suprafisiológica (100 nM) del esteroide reducen la proteína

total de TRPV1, mientras que el tratamiento de 1 nM no genera ningún cambio después de 24 horas. También determinamos los cambios de la proteína por el tratamiento de 48 horas. Los resultados muestran que el efecto negativo inducido por 100 nM se conserva, mientras que 10 nM mantiene una tendencia a la disminución de la proteína, pero en menor medida que el tratamiento de 24 horas. Sorpresivamente, 1 nM del esteroide incrementa de manera significativa los niveles proteicos de TRPV1, lo que sugiere la existencia de un mecanismo independiente del proceso transcripcional que regula positivamente la proteína de TRPV1 a bajas concentraciones de la hormona.

En un intento por dilucidar el mecanismo involucrado en la regulación positiva de la proteína de TRPV1 realizamos experimentos en la línea celular HEK-293 que determinamos no expresa el AR. Después de la transfección para la expresión transitoria de la proteína TRPV1, sometimos a las células a un tratamiento de testosterona durante 24 horas para evaluar los efectos de la hormona independientes de su receptor. Observamos que los tratamientos con concentraciones dentro del rango fisiológico (1 y 10 nM) no modifican los niveles proteicos de TRPV1. Por lo que inferimos que este proceso requiere la presencia del AR para llevarse a cabo como ocurre en los cultivos primarios de DRG.

De manera interesante 100 nM de testosterona promueve un aumento significativo de la proteína. Este efecto puede estar asociado a la activación de un receptor distinto al AR clásico. A la fecha se conoce muy poco acerca de la identidad de estos receptores alternativos que responden a andrógenos (Thomas 2019). Sin embargo, es necesario considerar que este efecto ocurre únicamente a altas concentraciones de testosterona que superan las fisiológicas. Se ha reportado que algunas proteínas como el receptor Sigma 1, el cual muestra una afinidad parcial por esta hormona (Su et al., 1988). Esta chaperona favorece el correcto plegamiento de la proteína de TRPV1, por lo que puede contribuir a su aumento (Ortiz et al., 2017). Además, un efecto similar ocurre en los niveles proteicos del AR cuando se expresa en las células HEK-293 y se expone a esta concentración de testosterona. De igual manera se conoce que el receptor Sigma 1 regula positivamente los niveles proteicos del AR al evitar su degradación por vía del proteasoma (Thomas et al., 2017). Sin embargo, es poco probable que esto pueda ocurrir en un contexto fisiológico, ya que se requiere de una concentración muy alta de testosterona.

Con estos resultados, nos preguntamos si efectivamente el AR es el responsable de la regulación positiva de TRPV1. Para responder esto, realizamos experimentos en células HEK-293 co-transfectadas con TRPV1 y AR en ausencia de testosterona. Nuestros resultados demostraron que la presencia del AR aumenta significativamente los niveles proteicos de TRPV1. En este sentido es importante mencionar que en las líneas celulares LNCap y PC3 existen diferencias en la expresión de TRPV1 (Pecze et al., 2016). Se reconoce que las células LNCaP expresan al AR, mientras que las células PC3 carecen del receptor. Similar a nuestros resultados, la presencia del AR en las células LNCaP genera una señal más clara para la detección de la proteína de TRPV1 por ensayos de Western Blot y una entrada mayor de Ca^{2+} por exposición a capsaicina en comparación con las células PC3 (Pecze et al., 2016). Esto señala la relevancia del AR sobre TRPV1 en distintos tipos de células. Lo anterior puede ocurrir como consecuencia de una interacción entre estas proteínas que favorezca la estabilidad de la proteína o disminuya su degradación. Dicha interacción puede ocurrir en la membrana plasmática. Se ha descrito que el AR puede localizarse en este compartimento celular por un mecanismo conservado entre receptores a esteroides que implica la adición de manera covalente de un ácido palmítico que permite su anclaje a la membrana plasmática (Pedram et al., 2007). En apoyo a esta idea, existen reportes de la interacción del AR y el canal TRPM8 en membrana plasmática, específicamente en balsas lipídicas en células de cáncer de próstata, interacción que modifica la activación del canal TRPM8 a sus agonistas (Grolez et al., 2019). Por lo tanto, estas regiones favorecen las interacciones entre el AR y canales iónicos. TRPV1 también se ubica dentro de estos microdominios de la membrana como se ha demostrado en neuronas de DRG de rata (Saha et al., 2017). Esto, gracias a un dominio dentro de la proteína que le permite unirse al colesterol, un lípido abundante en balsas lipídicas (Morales y Rosenbaum, 2019). Lo que aumenta la probabilidad de interacción.

Además, identificamos que este mecanismo favorece un aumento de la forma hiperglicosilada de la proteína TRPV1, algo que se observa de manera más evidente en los cultivos primarios de DRG a baja concentración de testosterona (1 nM). Dicha forma de la proteína se obtiene por la adición covalente de un azúcar de estructura complejas sobre la asparagina 604 (Cohen, 2006). Esta forma madura de la proteína puede interactuar con el AR dentro de las balsas lipídicas para aumentar la vida media de esta proteína. Algo que es más claro en el sistema de expresión nativo debido a la

diferencia en la composición lipídica de las membranas siendo las neuronas de DRG más ricas en lípidos en comparación con la línea celular HEK-293 que son células de tipo epitelial (Revisado en Morales y Rosenbaum, 2019). Por lo que es una posibilidad que deberá ser explorada.

Finalmente, investigamos la regulación positiva del AR sobre TRPV1 en presencia de su ligando. Determinamos que la testosterona disminuye los niveles proteicos de TRPV1 cuando se administra el tratamiento en células HEK-293 que co-expresan a TRPV1 y al AR. Creemos que esto ocurre debido a un cambio en la localización del AR en las células que interrumpe su interacción. La unión al ligando con el AR induce un cambio estructural que expone una región de localización nuclear (NLS) reconocida por importinas encargadas de su transporte al interior del núcleo (Cutrees et al., 2008). Además, se ha determinado esto mediante ensayos de inmunohistoquímica donde el AR, que en ausencia de ligando se mantiene asociado a la membrana plasmática principalmente, y después de la exposición a testosterona este se ubica de manera preferencial en núcleo, especialmente a concentraciones altas de la hormona (Gkika et al., 2020). Nosotros observamos que la reducción de la proteína de TRPV1 es mayor por el tratamiento 10 nM que a 1 nM, posiblemente por el cambio de localización del AR. Sumado a esto se conoce que la palmitoilación del AR, tiene lugar únicamente en monómeros del AR, es decir, que no sucede cuando el AR se encuentra como dímero. Dado que la unión de ligando induce la conformación dimérica del receptor el tratamiento de testosterona puede reducir el AR presente en membrana al disminuir la disponibilidad de monómeros para su palmitoilación (Pedram et al., 2007). En conjunto con la translocación al núcleo, esto puede influir su interacción con las proteínas de membrana, como podría ser el caso de TRPV1.

En resumen, la testosterona regula negativamente la expresión de TRPV1 al reducir los niveles de ARNm por represión de la transcripción y antagonizar el efecto positivo del AR sobre la proteína de TRPV1. Mientras que el AR presenta una acción dual. En ausencia de ligando el receptor, aumentan los niveles proteicos de TRPV1 posiblemente por una acción directa de AR sobre el canal de la membrana, mientras que la unión a testosterona induce su internalización al núcleo donde desempeña su papel como factor de transcripción y participa en la represión del gen de TRPV1.

El papel de las hormonas sexuales en la percepción del dolor no es sorprendente debido al largo alcance de estas moléculas en los diferentes tejidos y especialmente la expresión de sus receptores en áreas del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico asociadas al proceso nociceptivo (Bartley y Fillingim, 2013). Los datos experimentales y epidemiológicos señalan a la testosterona como una molécula de naturaleza antinociceptiva, especialmente por la asociación entre la disminución de su concentración con el aumento de padecimientos de dolor crónico (Bartley y Fillingim, 2013). Aunque los mecanismos moleculares implicados en este fenómeno aún no están del todo claros, el presente estudio muestra que la testosterona actúa como un regulador negativo de TRPV1, un receptor fundamental en la percepción del dolor y padecimientos de dolor crónico a través de un complejo mecanismo asociado a su concentración y una acción dual de su receptor.

Conclusiones

El tratamiento de testosterona reduce los niveles de ARNm de TRPV1 en cultivos primarios de neuronas provenientes DRG después de 24 horas. Este efecto es dependiente de la concentración y su efectividad es mayor a concentración baja (1 nM).

Los tratamientos de testosterona 1 y 10 nM inducen una disminución de los niveles proteicos de TRPV1 en cultivos primarios de neuronas DRG después de 24 y 48 horas.

Bajas concentraciones de testosterona (1 nM) inducen un aumento significativo de los niveles proteicos de TRPV1 después de 48 horas.

La línea celular HEK-293 carece de la expresión del AR de manera endógena.

Concentraciones fisiológicas de 1 y 10 nM de testosterona no modifica los niveles proteicos de TRPV1 de manera independiente del AR en células HEK-293.

La expresión del AR en ausencia de su ligando aumenta la cantidad de proteína de TRPV1 en células HEK-293.

La acción no clásica del AR sobre la proteína de TRPV1 es antagonizada por la testosterona.

Los análisis bioinformáticos de la secuencia promotora del gen de TRPV1 de ratón presentan posibles elementos de respuesta a andrógenos. Estos elementos también se identifican en el promotor de rata y humano.

Referencias

- 1-Artero-Morales, M., González-Rodríguez, S., & Ferrer-Montiel, A. (2018). TRP channels as potential targets for sex-related differences in migraine pain. *Frontiers in molecular biosciences*, 5, 73.
- 2-Asuthkar, S., Velpula, K. K., Elustondo, P. A., Demirkhanyan, L., & Zakharian, E. (2015). TRPM8 channel as a novel molecular target in androgen-regulated prostate cancer cells. *Oncotarget*, 6(19), 17221.
- 3-Bartley, E. J., & Fillingim, R. B. (2013). Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *British journal of anaesthesia*, 111(1), 52-58.
- 4-Bevan, S., Quallo, T., & Andersson, D. A. (2014). Trpv1. In *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels* (pp. 207-245). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 5-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.
- 6-Baliki, M. N., & Apkarian, A. V. (2015). Nociception, pain, negative moods, and behavior selection. *Neuron*, 87(3), 474-491.
- 7-Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267-284.
- 8-Bidaux, G., Roudbaraki, M., Merle, C., Crépin, A., Delcourt, P., Slomianny, C., ... & Prevarskaya, N. (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocrine-related cancer*, 12(2), 367-382.
- 9-Cai, C., He, H. H., Chen, S., Coleman, I., Wang, H., Fang, Z., ... & Balk, S. P. (2011). Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1. *Cancer cell*, 20(4), 457-471.
- 10-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.
- 11-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.

- 12- Chen, . 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
- 13- Chen, C. L., Broom, D. C., Liu, Y., de Nooij, J. C., Li, Z., Cen, C., ... & Ma, Q. (2006). Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron*, 49(3), 365-377.
- 14- 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.
- 15- Chu, C., Zavala, K., Fahimi, A., Lee, J., Xue, Q., Eilers, H., & Schumacher, M. A. (2011). Transcription factors Sp1 and Sp4 regulate TRPV1 gene expression in rat sensory neurons. *Molecular pain*, 7, 1744-8069.
- 16- Cohen, D. M. (2006). Regulation of TRP channels by N-linked glycosylation. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 17, No. 6, pp. 630-637). Academic Press.
- 17- Coffey, K., & Robson, C. N. (2012). Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *The Journal of endocrinology*, 215(2), 221-237.
- 18- 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).
- 19- 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.
- 20- De Logu, F., Tonello, R., Materazzi, S., Nassini, R., Fusi, C., Coppi, E., ... & Susini, T. (2016). TRPA1 mediates aromatase inhibitor-evoked pain by the aromatase substrate Androstenedione. *Cancer research*, 76(23), 7024-7035
- 21- Denayer, S., Helsen, C., Thorrez, L., Haelens, A., & Claessens, F. (2010). The rules of DNA recognition by the androgen receptor. *Molecular endocrinology*, 24(5), 898-913.
- 22- Diao, X., Chen, X., Pi, Y., Zhang, Y., Wang, F., Liu, P., ... & Lu, S. (2018). Androgen receptor induces EPHA3 expression by interacting with transcription factor SP1. *Oncology Reports*, 40(2), 1174-1184.
- 23- Diver, M. J. (2006). Analytical and physiological factors affecting the interpretation of serum testosterone concentration in men. *Annals of clinical biochemistry*, 43(1), 3-12.
- 24- Dubin, A. E., Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3760-3772.

- 25- Enciso-Pablo, Ó., Méndez-Reséndiz, K. A., Rosenbaum, T., & Morales-Lázaro, S. L. (2021). Nociceptive TRP Channels and Sex Steroids. In *Reproductive Hormones*. IntechOpen.
- 26- Foradori, C. D., Weiser, M. J., & Handa, R. J. (2008). Non-genomic actions of androgens. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 169-181.
- 27- Fillingim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B., & Riley III, J. L. (2009). Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *The journal of pain*, 10(5), 447-485.
- 28- Foulkes, T., & Wood, J. N. (2008). Pain genes. *PLoS genetics*, 4(7), e1000086
- 29- Gkika, D., Lolignier, S., Grolez, G. P., Bavencoffe, A., Shapovalov, G., Gordienko, D., ... & Prevarskaya, N. (2020). Testosterone-androgen receptor: The steroid link inhibiting TRPM8-mediated cold sensitivity. *The FASEB Journal*.
- 30- Gioeli, D., Ficarro, S. B., Kwiek, J. J., Aaronson, D., Hancock, M., Catling, A. D., ... & Weber, M. J. (2002). Androgen receptor phosphorylation: regulation and identification of the phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29304-29314.
- 31- Gioeli, D., & Paschal, B. M. (2012). Post-translational modification of the androgen receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 352(1-2), 70-78.
- 32- Gordon, V., Bhadel, S., Wunderlich, W., Zhang, J., Ficarro, S. B., Mollah, S. A., ... & Gioeli, D. (2010). CDK9 regulates AR promoter selectivity and cell growth through serine 81 phosphorylation. *Molecular endocrinology*, 24(12), 2267-2280.
- 33- Grad, J. M., Lyons, L. S., Robins, D. M., & Burnstein, K. L. (2001). The androgen receptor (AR) amino-terminus imposes androgen-specific regulation of AR gene expression via an exonic enhancer. *Endocrinology*, 142(3), 1107-1116.
- 34- Grolez, G. P., Gordienko, D. V., Clarisse, M., Hammadi, M., Desruelles, E., Fromont, G., ... & Gkika, D. (2019). TRPM8-androgen receptor association within lipid rafts promotes prostate cancer cell migration. *Cell death & disease*, 10(9), 1-17.
- 35- Huesca C. (2020). Dimorfismo sexual en la respuesta de dolor asociada al canal TRPV1 por efecto del 17β-estradiol. Tesis que para obtener el título de Licenciada en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2020/enero/0800217/Index.html>
- 36- Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annual review of cell and developmental biology*, 29, 355-384.
- 37- Kaneko, Y., & Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *British journal of pharmacology*, 171(10), 2474-2507.
- 38- Kalyvianaki, K., Panagiotopoulos, A. A., Malamos, P., Moustou, E., Tzardi, M., Stathopoulos, E. N., & Castanas, E. (2019). Membrane androgen receptors (OXER1,

- GPRC6A AND ZIP9) in prostate and breast cancer: A comparative study of their expression. *Steroids*, 142, 100-108.
- 39- Cai, C., He, H. H., Chen, S., Coleman, I., Wang, H., Fang, Z., ... & Balk, S. P. (2011). Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1. *Cancer cell*, 20(4), 457-471.
- 40- 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.
- 41- Kumar, S., Singh, O., Singh, U., Goswami, C., & Singru, P. S. (2018). Transient receptor potential vanilloid 1-6 (Trpv1-6) gene expression in the mouse brain during estrous cycle. *Brain Research*, 1701, 161-170.
- 42- 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.
- 43- 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.
- 44- Levin, E. R., & Hammes, S. R. (2016). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(12), 783.
- 45- Levin, E. R., & Hammes, S. R. (2016). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(12), 783-797.
- 46- Maurer, A. J., Lissounov, A., Knezevic, I., Candido, K. D., & Knezevic, N. N. (2016). Pain and sex hormones: a review of current understanding. *Pain management*, 6(3), 285-296.
- 47- Méndez-Reséndiz, K. A., Enciso-Pablo, Ó., González-Ramírez, R., Juárez-Contreras, R., Rosenbaum, T., & Morales-Lázaro, S. L. (2020). Steroids and TRP Channels: A Close Relationship. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3819.
- 48- Michels, G., & Hoppe, U. C. (2008). Rapid actions of androgens. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 182-198.
- 49- 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.

- 50- Nieschlag, E., Behre, H. M., & Nieschlag, S. (Eds.). (2012). Testosterone: action, deficiency, substitution. Cambridge University Press.
- 51- 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.
- 52- Pedram, A., Razandi, M., Sainson, R. C., Kim, J. K., Hughes, C. C., & Levin, E. R. (2007). A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22278-22288.
- 53- Payrits, M., et al., Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. *Endocrinology*, 2017. 158(10): p.3249-3258.
- 54- Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 619-647.
- 55- Rosasco, M. G., & Gordon, S. E. (2017). TRP Channels: What Do They Look Like?. *Neurobiology of TRP Channels*. 2nd edition.
- 56- Ruizeveld de Winter, J. A., Trapman, J., Vermey, M. A. R. C. E. L., Mulder, E. P. P. O., Zegers, N. D., & van der Kwast, T. H. (1991). Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39(7), 927-936.
- 57- Saha, S., Ghosh, A., Tiwari, N., Kumar, A., Kumar, A., & Goswami, C. (2017). Preferential selection of Arginine at the lipid-water-interface of TRPV1 during vertebrate evolution correlates with its snorkeling behaviour and cholesterol interaction. *Scientific reports*, 7(1), 1-21.
- 58- Schaeffer, V., Meyer, L., Patte-Mensah, C., & Mensah-Nyagan, A. G. (2010). Progress in dorsal root ganglion neurosteroidogenic activity: basic evidence and pathophysiological correlation. *Progress in neurobiology*, 92(1), 33-41.
- 59- Sneddon, L. U. (2017). Comparative physiology of nociception and pain. *Physiology*, 33(1), 63-73
- 60- 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.
- 61- Thomas, P. (2019). Membrane androgen receptors unrelated to nuclear steroid receptors. *Endocrinology*, 160(4), 772-781.

- 62- Thomas, J. D., Longen, C. G., Oyer, H. M., Chen, N., Maher, C. M., Salvino, J. M., ... & Kim, F. J. (2017). Sigma1 targeting to suppress aberrant androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer research*, 77(9), 2439-2452.
- 63- Ugarte, G. D., Diaz, E., Biscaia, M., Stehberg, J., Montecino, M., & van Zundert, B. (2013). Transcription of the pain-related TRPV1 gene requires Runx1 and C/EBP β factors. *Journal of Cellular Physiology*, 228(4), 860-870.
- 64- Vismara, G., Simonini, F., Onesto, E., Bignamini, M., Miceli, V., Martini, L., & Poletti, A. (2009). Androgens inhibit androgen receptor promoter activation in motor neurons. *Neurobiology of disease*, 33(3), 395-404.
- 65- Wilson, S., Qi, J., & Filipp, F. V. (2016). Refinement of the androgen response element based on CHIP-Seq in androgen-insensitive and androgen-responsive prostate cancer cell lines. *Scientific reports*, 6(1), 1-15.
- 66- Xue, Q., Yu, Y., Trilk, S. L., Jong, B. E., & Schumacher, M. A. (2001). The genomic organization of the gene encoding the vanilloid receptor: evidence for multiple splice variants. *Genomics*, 76(1-3), 14-20.
- 67- Xue, Q., Jong, B., Chen, T., & Schumacher, M. A. (2007). Transcription of rat TRPV1 utilizes a dual promoter system that is positively regulated by nerve growth factor. *Journal of neurochemistry*, 101(1), 212-222.
- 68- Yamagata, K., Sugimura, M., Yoshida, M., Sekine, S., Kawano, A., Oyamaguchi, A., ... & Niwa, H. (2016). Estrogens exacerbate nociceptive pain via up-regulation of TRPV1 and ANO1 in trigeminal primary neurons of female rats. *Endocrinology*, 157(11), 4309-4317
- 69- Zhang, L., & Barritt, G. J. (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer research*, 64(22), 8365-8373.
- 70- Zheng, J. (2013). Molecular mechanism of TRP channels. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 221-242.