



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Programa Oficial de Postgrado en Biotecnología



Interacción de TRPV1 y GABARAP y sus efectos en la dinámica del receptor

Tesis presentada por:

Imelda Ontoria Oviedo

Dirigida por:

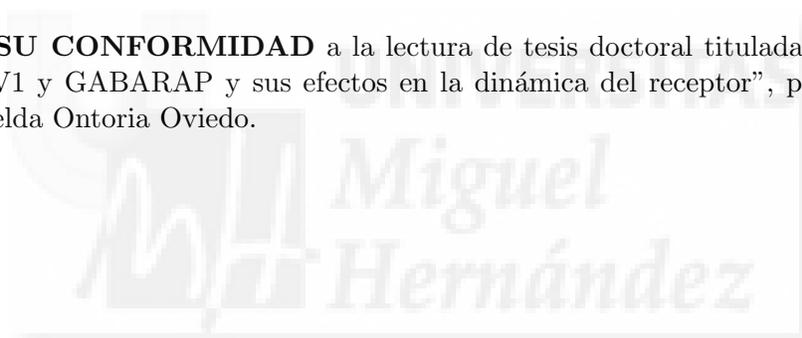
Dr. Antonio Ferrer Montiel

Dr. Rosa Planells Cases

Valencia, 2013

Dr. **Antonio Ferrer Montiel**, Catedrático y Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de tesis doctoral titulada: “Interacción de TRPV1 y GABARAP y sus efectos en la dinámica del receptor”, presentada por Dña. Imelda Ontoria Oviedo.



ANTONIO FERRER MONTIEL y ROSA M^a PLANELLS CASES, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche e investigadora del Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie de Berlin respectivamente

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “Interacción de TRPV1 y GABARAP y sus efectos en la dinámica del receptor”, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Biología Sensorial del Centro de Investigación Príncipe Felipe, por IMELDA ONTORIA OVIEDO, licenciada en Biología por la Universidad de León y en el Programa Oficial de Postgrado de Biología Molecular y Celular; y que habiendo revisado el trabajo, consideran que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente escrito.

Valencia, Noviembre de 2013

Dr. Antonio Ferrer Montiel

Dra. Rosa M^a Planells Cases



El presente trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, España.

Imelda Ontoria Oviedo ha sido beneficiaria de una beca predoctoral FPI del Ministerio de Educación y Ciencia-Programa FPI 2008 (BES-2008-003010) asociada al proyecto de investigación SAF2007-63193.

Este trabajo se ha desarrollado gracias a la financiación procedente del Ministerio de Educación y Ciencia SAF2007-63193 y SAF2010-17045, BFU2009-08346, BFU2012-39092-C02-01, proyecto Consolider-Ingenio 2010 de Ministerio de Ciencia e Innovación CSD2008-00005, La Marató TV3 y PROMETEO/2010/046.



*A mis padres,
a Tere.*

AGRADECIMIENTOS

Sin duda mucha ha sido la gente con la que he compartido muy buenos momentos estos años y que de una manera u otra me han ayudado a realizar este trabajo.

En primer lugar tengo que agradecerérselo a mis directores de tesis, Rosa y Antonio. Gracias Rosa por haberme dado la oportunidad de hacer esta tesis y por toda la confianza que tuviste en mí desde el primer momento, por tus consejos y por haberme enseñado tantas cosas. Este trabajo tampoco se podría haber llevado a cabo sin el respaldo de Antonio, que a pesar de no haber estado en Valencia, siempre has sido un apoyo muy fuerte para nuestro grupo. Sin lugar a dudas, ha sido un placer trabajar con vosotros.

Gracias también al I-17 (todos no), en especial a Lucía y MG por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas y los ratos de locura haciendo mil cosas a la vez, y por supuesto a Judit Estévez por su contribución en este trabajo.

Una de las experiencias más bonitas de estos años fueron, sin lugar a dudas, los cuatro meses que estuve en Fort Collins. Gracias Dani, Chantal y Pat por haberme ayudado tanto cuando llegué allí y sobre todo muchas gracias a Mike Tamkun y Scott Earley por darme la posibilidad de trabajar en vuestros laboratorios. Gracias a Krystle, Albert, Liz, Shelly, Phil,... por haberme acogido de esa manera.

Sin duda tengo que darle también las gracias a Pilar Sepúlveda y a todo mi nuevo grupo por haberme acogido como una más. Gracias Delia, Marina, Nahuel, Rubén y Laura. Gracias por darme esta nueva oportunidad de poder trabajar con vosotros.

Gracias también a Chelo Guerri y a su laboratorio, en especial a Jorge, a Rosa Farrás y a los grupos de Débora Burks y Vicente Felipo, por toda vuestra ayuda después de los duros momentos del CIPF y haberme hecho sentir que no estaba sola, en realidad nunca lo estuve.

Tuve la suerte de estar trabajando algo más de un año en Barcelona, y fueron los jefes de allí los que me introdujeron en investigación. Gracias Pep y Ramón por haberme abierto las puertas de este mundillo de la ciencia y por haberme dado la oportunidad de trabajar en un equipo tan bueno, tanto personal como laboralmente. Gracias Laura e Itzi por todos los momentos tanto nocturnos como diurnos que pasamos juntas, aún tenemos pendiente un viaje a tres bandas. Y como no a Amílcar 133, gracias bolud@s por todos los momentos que compartimos.

A Cañas, Lore, Bea, Merce, Lucho, Laura, May y Nurituri, porque en realidad todo empezó en León, aunque nunca imaginé que iba a acabar así. Gracias por aquellas juergas universitarias que vivimos en La Europa y que nos unieron. A pesar de haber pasado ya tanto años y que cada uno vivamos en un sitio diferente habéis sido siempre un gran apoyo para mí.

Quiero también agradecerérselo a las Electr-o-perras, por intentarme llevar al lado oscuro del deporte. En realidad eso no ha sido más que una excusa que ha hecho que pasásemos tantos buenos momentos. Jajajaja siempre nos quedará Portugal.

Y como no a mis amigos, a los que están más lejos como Pablo, Pilar, Jaime, Pableras, Lore, Juji, Javi, Marian... como a los que estais cerca: Ana, Patri, Rafa, Sandra, Mame, Alex y la family Ziarsolo. Porque tengo la suerte de haber pasado tantísimos momentos con vosotros que han hecho que este camino fuese mucho más

llevadero y en los que, como no, me lo he pasado en grande. La verdad es que han sido muchísimos momentos de diversión, desde viajes, a conciertos, de cervezas... que estoy segura que seguiremos disfrutando. Muchas gracias Patri por tu gran ayuda con el kile.

En la última etapa de tesis he tenido la suerte de conocer a los amigos “brillantes”, gracias a tod@s por todos esos momentos de risas y desconexión. Lo de tomar una y a casa nunca tuvo mucho sentido, pero con vosotros menos.

Gracias a las chicas de la mesa camilla, por aquellas largas tertulias a la hora de comer y todos los momentos que compartimos en el CIPF. Está claro que no habrían sido lo mismo sin vosotras.

A mis amig@s de Lerma, Laura, Patri, Bea, Merce, Jessica, Pilu, Pastrí, Ana, Javi, Sandra, Mario y Almu, por estar siempre ahí y hacer que aunque haya estado siempre tan lejos cada vez que estamos juntos es como que no me hubiese ido.

Gracias a Berta y Paola (<http://www.fluyestudio.com/fluye/>), porque la portada es vuestra y espero que tengáis mucha suerte con vuestro proyecto, estoy segura de ello.

Sin lugar a dudas tengo que agradecerles a mis padres todo el apoyo que me han dado siempre y por toda su entrega. Por haberme apoyado y respetado siempre en las decisiones que he tomado y por haberme permitido cumplir muchos sueños. Gracias a mis hermanos, Mónica y Emilio, por haber estado siempre donde teníais que estar aunque fuese desde lejos. Emi, eres un crack jajajajaja.

Y por supuesto a David, por estar siempre en los momentos que te he necesitado, sobre todo al final de la tesis que ha sido una época bastante estresante, y por ser tan especial para mi. Por todos los buenos ratos que hemos pasado juntos en los que tanto me has hecho reír y por todos los que nos quedan.

Índice general

Índice general	XI
Índice de figuras	XV
Índice de tablas	XVII
Abreviaturas	XIX
Resumen	3
Introduction	3
1 El dolor	3
1.1. Definición	3
1.2. Epidemiología del dolor	3
1.3. Bases fisiopatológicas y anatómicas del dolor	4
1.3.1. Dolor fisiológico	4
1.3.2. Dolor patológico	8
1.3.2.1. Dolor inflamatorio	8
1.3.2.2. Dolor disfuncional	10
1.4. Dolor neuropático asociado al tratamiento con citostáticos	11
2 Papel de los canales iónicos en la transducción del dolor	15
2.1. Canales dependientes de voltaje asociados al dolor	16
2.2. Canales activados por unión de ligando asociados al dolor	17
2.3. Otros canales iónicos asociados al dolor	17
3 Papel de los receptores TRPs en la transducción del dolor	19
3.1. La familia de los TRPs	19
3.2. Termo-TRPs	20
3.2.1. TRPA1	20
3.2.2. TRPM8	22
3.2.3. Termorreceptores de la subfamilia TRPV	22
3.3. TRPV1. Importancia fisiológica, patológica y mecanismos asociados	24
3.3.1. Activación y modulación de la actividad de TRPV1	25

3.3.2.	Características estructura-función de TRPV1	28
3.4.	Signalplex como mecanismo primario de señalización	30
3.4.1.	Signalplex de trp	31
3.4.2.	Signalplex del receptor de NMDA	32
4	Proteínas que interaccionan con TRPV1	35
4.1.	Proteína Asociada al Receptor GABA _A (GABARAP)	36
4.2.	Tubulina	39
	Objetivos	43
	Material y Métodos	47
5	Materiales y Métodos	47
5.1.	Modelos celulares utilizados	47
5.1.1.	Líneas celulares procariontas	47
5.1.1.1.	Cepas bacterianas	47
5.1.1.2.	Medios de cultivo	47
5.1.2.	Modelos celulares eucariotas	48
5.1.2.1.	Líneas celulares	48
5.1.2.2.	Medios de cultivo, procedimiento general	48
5.1.3.	Aislamiento y cultivo primario de los ganglios raquídeos	49
5.2.	Métodos de Biología Molecular	49
5.2.1.	Clonación de TRPV1 en diversos vectores	49
5.2.1.1.	Plásmido de expresión de YFP-TRPV1	49
5.2.1.2.	YFP-TRPV1/pTREHyg y TRPV1/pTREHyg	50
5.2.1.3.	Transformación de pTRE-2hyg en pDEST	51
5.2.1.4.	Plásmidos GST-NtTRPV1 y GST-CtTRPV1	52
5.2.2.	Clonación de GABARAP en diversos vectores	52
5.2.2.1.	GABARAP y sus fragmentos N-term y C-term	52
5.2.2.2.	CFP-GABARAP e YFP-GABARAP	53
5.2.3.	Extracción de ADN genómico y amplificación por PCR	53
5.3.	Transfección e infección de líneas celulares y DRG	53
5.3.1.	Transfección de líneas celulares y DRGs	53
5.3.2.	Pruebas de infección con el virus que expresa YFP-TRPV1	54
5.4.	Líneas doblemente estables e inducibles	54
5.5.	Métodos Bioquímicos	58
5.5.1.	Obtención de extractos totales de proteína	58
5.5.2.	Obtención de extractos de tubulina	58
5.5.3.	Obtención de extractos de cerebro	58
5.5.4.	Geles de SDS-poliacrilamida y transferencia a membrana	58
5.5.5.	Bloqueo e incubación con los anticuerpos y revelado	59
5.5.6.	Anticuerpos	59
5.5.7.	Detección de proteínas de membrana	61

5.5.8. Ensayos de pulso-caza	61
5.5.9. Coinmunoprecipitación de proteínas	61
5.5.10. Ensayos de arrastre de proteínas	62
5.5.10.1. Obtención de las proteínas en procariotas	62
5.5.10.2. Inmovilización de proteínas de fusión y arrastre	62
5.5.11. Microscopía de inmunofluorescencia	62
5.6. Ensayos funcionales	63
5.6.1. Ensayos de calcio intracelular	63
5.6.2. Ensayos de electrofisiología	63
5.7. Ensayos de microscopía <i>in vivo</i>	64
5.7.1. Ensayos de microscopía <i>in vivo</i> FRAP	64
5.7.2. Ensayos de microscopía <i>in vivo</i> FRET	65
5.7.3. Ensayos de microscopía <i>in vivo</i> TIRF	66
Resultados	71
6 Generación de líneas celulares estables	71
6.1. Líneas HEK293 que expresan TRPV1wt o YFP-TRPV1	71
6.2. Líneas F11 que expresan TRPV1wt e YFP-TRPV1	77
7 Interacción de TRPV1 y GABARAP	81
7.1. Interacción <i>in vitro</i> de TRPV1 y GABARAP	81
7.2. Interacción <i>ex vivo</i> de TRPV1 y GABARAP	83
7.3. GABARAP altera la expresión del receptor	86
7.4. Cinética de degradación de TRPV1 con GABARAP	87
7.5. GABARAP modula la activación de TRPV1 por capsaicina	89
7.6. El silenciamiento de GABARAP modula la activación de TRPV1	93
7.7. Mecanismos que modulan la activación de TRPV1 por GABARAP	94
7.8. Taquifilaxia inducida por capsaicina	95
8 Estudio de los acúmulos de TRPV1 en la membrana	99
8.1. Caracterización de los agregados de TRPV1 en membrana	99
8.2. Estudio de la movilidad de TRPV1 en la membrana por FRAP	101
8.3. Naturaleza de los microdominios donde está TRPV1	103
8.3.1. Papel de las balsas lipídicas	103
8.3.2. Papel de los corrales de citoesqueleto	105
Discusion	117
Conclusiones	125
Bibliografía	127

Anexo	149
.1. Proteínas que interaccionan con TRPV1	149
.2. Publicaciones	152



Índice de figuras

1.1. Clasificación de los nociceptores	7
1.2. Tipos de dolor	11
3.1. Termo-TRPs	21
3.2. Activación TRPV1	26
3.3. Modelo topológico de una subunidad de TRPV1	30
3.4. Signalplex de INAD en <i>Drosophila</i>	32
4.1. Unión de GABARAP, gefirina y receptores $GABA_A$	38
4.2. Regiones de interacción de TRPV1 con tubulina	40
5.1. Reacción LR clonasa	50
5.2. Sistema pTet-On	55
5.3. Técnica de microscopía <i>in vivo</i> FRET	65
5.4. Técnica de microscopía <i>in vivo</i> TIRF	66
6.1. Actividad luciferasa/ β -galactosidasa en HEK293	72
6.2. PCR de diferentes clones de las líneas estables	73
6.3. <i>Patch clamp</i> y WB de clones HEK293	74
6.4. Transientes de Ca^{2+} de los clones HEK293 seleccionados	75
6.5. Inmunocitoquímica del clon $H11.7^{TRPV1wt}$	76
6.6. Inmunocitoquímica del clon $H11.1^{YFP-TRPV1}$	77
6.7. Actividad luciferasa/ β -galactosidasa en F11	78
6.8. <i>Patch clamp</i> de los clones de la línea $F11^{TRPV1wt}$	79
6.9. <i>Patch clamp</i> y Ca^{2+} i de los clones de la línea celular F11	80
7.1. TRPV1 interacciona <i>in vitro</i> con GABARAP	83
7.2. Interacción <i>ex vivo</i> de TRPV1 y GABARAP	85
7.3. GABARAP aumenta la expresión de TRPV1	87
7.4. Internalización de TRPV1 en presencia de GABARAP	88
7.5. Ensayo de pulso-caza de TRPV1 con GABARAP	89
7.6. Cinéticas de apertura y corrientes de TRPV1 con voltaje	90
7.7. Cinéticas de apertura y corrientes de TRPV1 con pH ácido	91
7.8. Cinéticas de apertura y corrientes de TRPV1 con capsaicina	92
7.9. Transientes de Ca^{2+} de TRPV1 con GABARAP con capsaicina	92
7.10. El silenciamiento de GABARAP aumenta la función de TRPV1	93

ÍNDICE DE FIGURAS

7.11. GABARAP modula las corrientes de TRPV1 con capsaicina	94
7.12. GABARAP no afecta las corrientes de TRPV1 en ausencia de Ca^{2+}	95
7.13. GABARAP altera la taquifilaxia inducida por capsaicina	97
8.1. Aumento en la expresión de TRPV1 por TIRF	100
8.2. Imágenes de FRAP	102
8.3. Gráfica de la movilidad de TRPV1 por FRAP	103
8.4. $M\beta\text{CD}$ disminuye la expresión de TRPV1 en membrana	104
8.5. Corrientes de Ca^{2+} de TRPV1 con $M\beta\text{CD}$	105
8.6. La unión de TRPV1 con tubulina modulada por GABARAP	106
8.7. Biotinilación con taxol en células HEK293	107
8.8. Biotinilación e inmunocitoquímica con taxol en DRGs	108
8.9. Imágenes de TIRF tras el tratamiento con taxol	109
8.10. Registros calcio intracelular con taxol en células HEK293 y DRGs	110
8.11. Registros calcio intracelular con taxol en diferentes TRPs	112
8.12. Registros calcio intracelular con taxol y DD04107	113



Índice de tablas

5.1. Cepas bacterianas	47
5.2. Medios de cultivo	48
5.3. Clonación de TRPV1 en el plásmido pEYFP-C1	50
5.4. Clonación de TRPV1 e YFP-TRPV1 en pENTR/D-TOPO	51
5.5. Clonación pTRE-2hyg en plásmido de destino	51
5.6. Clonación de Nt-TRPV1 y Ct-TRPV1 en pGEX-4Ti	52
5.7. Clonación de GABARAP, Δ 37-112 y Δ 1-36 en pGEX-4Ti	52
5.8. Clonación de Nt-TRPV1 y Ct-TRPV1 en pGEX-4Ti	53
5.9. Titulación con el antibiótico G418	57
5.10. Titulación con el antibiótico Hygromicina B	57
5.11. Inmunodetección de proteínas mediante <i>western blot</i>	59
5.12. Anticuerpos primarios	60
5.13. Anticuerpos secundarios	60
.1. Lista de proteínas que interaccionan con TRPV1	149
.2. Lista de proteínas que interaccionan con TRPV1	150
.3. Lista de proteínas que interaccionan con TRPV1	151

Abreviaturas

AC	Adenilil ciclasa	CIPN	Neuropatía periférica inducida por quimioterapia
ADN	Ácido desoxirribonucleico	COX-2	Ciclooxigenasa-2
AEA	Anandamida	CPZ	Capsazepina
AISP	Asociación Internacional para el estudio del Dolor	DAG	Diacilglicerol
AKAP	Proteína de anclaje a proteína quinasa A	DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
cAMP	Adenosón monofosfato	DMSO	Dimetil sulfóxido
AMPA	2-amino-3-(3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-il) propanoico	DOX	Doxiciclina
2-APB	2-aminoetoxi difeniborato	DRG	Ganglios de la raíz dorsal
APS	Persulfato amónico	EET	Ácido epoxieicosatrienoico
ARD	Dominio de anquirinas repetidas	EGF	Factor epidérmico de crecimiento
ASIC	Canales iónicos de detección de pH	EP	Receptores de prostaglandinas
AT₁R	Receptor de angiotensina 1	ER	retículo endoplasmático
ATP	Adenosín 5-trifosfato	ERK	Proteína quinasa regulada por señal extracelular
β-MSH	β-mercaptoetanol	FBs	Suero fetal bovino
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	FMH	Migraña Hemipléjica familiar
BK	Bradiquinina	FRAP	Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo
Ca²⁺	Ión de Calcio	FRET	Transmisión de energía de resonancia
CaM	Calmodulina	GABA	Ácido γ-aminobutírico
CaMKII	Quinasa tipo II dependiente de calcio y calmodulina	GABARAP	Proteína asociada al receptor GABA
CAP	Capsaicina	GATE-16	Proteína estimuladora de ATPasa asociada a Golgi de 16 kDa
CB₁R	Receptores de cannabinoides tipo 1	GKAP	Proteína asociada a guanilato quinasa
CFA	Adyuvante completo de Freund	GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	HA	Hemaglutinina

ÍNDICE DE TABLAS

HA	Hemaglutinina	TrkA	Receptor de tirosina quinasa A
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido	TrkB	Receptor de tirosina quinasa B
KO	ablación génica	TRPs	Receptores de potencial transitorio
LTP	Facilitación sináptica	TRPA	Subfamilia TRP anquirina
MβCD	Methyl- β -cyclodextrina	TRPC	Subfamilia TRP canónica
MAP	Proteína asociada a microtúbulos	TRPM	Subfamilia TRP melastatina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno	TRPML	Subfamilia TRP mucolipina
mGlu	Receptores de glutamato metabotrópicos	TRPP	Subfamilia TRP policistina
MOI	Multiplicidad de infección	TRPV	Subfamilia TRP vanilloide
MTOC	Centro organizador de microtúbulos	TRPV1	Receptor de capsaicina o de vanilloides tipo 1
Nav	Canales de Na ⁺ dependientes de voltaje	TRPV2	Receptor de vanilloides tipo 2
NGF	Factor de crecimiento nervioso	TRPV3	Receptor de vanilloides tipo 3
NK-1	Receptor de neuroquinina 1	TRPV4	Receptor de vanilloides tipo 4
NMDA	Receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato	Y2H	Doble híbrido de levadura
NSF	Factor sensible de N-etilmaleimida		
OLDA	N-oleoildopamina		
OMS	Organización Mundial de la Salud		
PBS	Solución salina		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
PFA	Paraformaldehído		
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa		
PKA	Proteína quinasa A		
PKC	Proteína quinasa C		
PGs	Prostaglandinas		
PI	Inhibidores de proteasas		
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato		
PLC	Fosfolipasa-C		
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo		
PPED	Síndrome de dolor paroxístico		
RR	Rojo de rutenio		
RTX	Resiniferatoxina		
Syt IX	Sinaptotagmina IX		
SNAP25	Proteína de 25 kDa asociada al sinaptosoma		
SNARE	Receptor SNAP		
SNC	Sistema nervioso central		
SP	Sustancia P		
TG	Ganglios trigeminales		
TIRF	Reflexión total interna de la fluorescencia		
TK	Tirosina quinasa		

Resumen

El receptor de potencial transitorio vanilloide 1, TRPV1, juega un papel fundamental en la fisiopatología de la transducción de dolor. En el presente trabajo se describe la interacción de TRPV1 con la proteína asociada al ácido gamma-amino butírico tipo A, GABARAP, mediante ensayos *in vitro* y *ex-vivo*. En particular, se ha observado que GABARAP aumenta la expresión del receptor TRPV1 y promueve la agrupación de receptores en la membrana plasmática en células HEK293 que expresan ambas proteínas, a la vez que altera la apertura y desensibilización del canal. El agrupamiento del receptor en la membrana plasmática inducido cuando GABARAP está presente se ha caracterizado más en detalle utilizando la técnica de microscopía *in vivo* de reflexión total interna de la fluorescencia (TIRF). La naturaleza de las agrupaciones observadas de TRPV1 ha sido investigada mediante la realización de ensayos que alteran las propiedades de la membrana plasmática, bien eliminando el colesterol de la misma como alterando las propiedades del citoesqueleto.

Nuestros resultados muestran que si bien el secuestro y eliminación del colesterol de la membrana plasmática no afecta al aumento de TRPV1 inducido por la presencia de GABARAP ni altera sus cinéticas, la estabilización de la tubulina con taxol produce un aumento de la expresión de TRPV1 en la superficie imitando así los resultados obtenidos cuando interacciona con la proteína de andamiaje GABARAP. Curiosamente, ensayos de arrastre de proteínas demuestran una mayor unión de tubulina a TRPV1 en presencia de GABARAP. Adicionalmente, el aumento en el número de neuronas que responden a capsaicina tras el tratamiento con taxol ha sido restituido tras el empleo del lipopéptido que revierte la excitosis del receptor, DD04107, lo que implica que ese proceso se produce por un mecanismo de excitosis regulada dependiente de Ca^{2+} .

En conjunto, nuestros resultados son consistentes con un modelo en el que la expresión de TRPV1 y su agrupación en la membrana plasmática está fuertemente influenciada por la interacción con el citoesqueleto y sugiere que el síndrome de dolor agudo que se produce tras el tratamiento con taxol está asociado con el incremento del número de neuronas TRPV1 positivas.

Introducción



Capítulo 1

El dolor

1.1. Definición

En 1979, la Asociación Internacional para el estudio del Dolor (AISP) definió el **dolor** como *una experiencia sensorial y emocional desagradable debida a un daño tisular real o potencial, o que se describe en los términos de tal daño*. El dolor es una sensación subjetiva y el individuo aprende a reconocer esta sensación como consecuencia de asimilar experiencias que le causan o pueden causar lesiones y sirve para alertarle de una lesión real, inminente o potencial cuya consecuencia es la activación de los mecanismos de defensa y de las respuestas adecuadas de protección (Julius y Basbaum, 2001). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la subjetividad de esta sensación no solo afecta a los pacientes sino también a los profesionales que lo diagnostican (Lee y Swain, 2006; Ortiz-Cardona y Bendo, 2007).

1.2. Epidemiología del dolor

El dolor es uno de los mayores problemas de salud que existen hoy en día, representando el mayor reto para los profesionales del área sanitaria a la hora de encontrar los tratamientos más adecuados en cada caso. Un estudio realizado a nivel mundial por la OMS reveló que entre el 5 % y el 33 % de los individuos encuestados manifestaba padecer algún tipo de dolor de manera persistente (Gureje y col., 1998). A nivel europeo, un estudio realizado en 2006 publicó valores similares a los obtenidos por la OMS, a saber, que uno de cada cinco europeos (entre el 12-30 % de los encuestados) declaraba padecer algún tipo de dolor crónico (Breivik y col., 2006). No obstante, existen importantes diferencias geográficas en la prevalencia del dolor crónico. Así, mientras España es uno de los países europeos con menor proporción de ciudadanos que padecen dolor crónico (aproximadamente 12%), la prevalencia de éste entre los noruegos asciende hasta el 30 % (según datos presentados en el XIV Congreso Mundial del Dolor, Milán).

En lo relativo a la distribución en la población, la mayoría (aproximadamente un 56 %) de los pacientes con dolor crónico son mujeres con edades comprendidas entre los 40 y los 50 años, fundamentalmente por traumas o enfermedades crónicas. Con la edad, los problemas de salud y los dolores aumentan considerablemente (Davis y col.,

2004), y se considera que entre un 50-80 % de los mayores de 65 años padece algún tipo de dolor (Franco y Seoane de Lucas, 2001). En ese rango de edad el tipo de dolor más común se refiere en las extremidades inferiores mientras que, en la población joven son más frecuentes los dolores de cabeza.

A pesar de la alta prevalencia en la población, hay que destacar que desafortunadamente hasta el 40 % de los encuestados manifestaron su disconformidad con los tratamientos que recibieron, poniendo de manifiesto la importancia de encontrar nuevas terapias para paliar este problema sanitario.

1.3. Bases fisiopatológicas y anatómicas del dolor

El dolor puede clasificarse en función de su origen, de la sintomatología y de su evolución, entre otros aspectos. En 2010, Clifford J. Woolf propuso una clasificación del dolor en función de su origen dando lugar a dos grupos a saber: el dolor fisiológico y el dolor patológico (Woolf y Salter, 2000; Woolf, 2010).

1.3.1. Dolor fisiológico

El dolor fisiológico (también conocido como nociceptivo) describe una experiencia sensorial desagradable pero a su vez imprescindible para la supervivencia de los organismos (OMS, 2006). Este tipo de dolor se produce como resultado de una serie de procesos complejos e interactivos que actúan a distintos niveles del sistema nervioso (Mandadi y Roufogalis, 2008).

El dolor nociceptivo se caracteriza por una *hiperalgesia primaria* que permanece solamente mientras esté presente el estímulo que lo provoca (Costigan y col., 2009). Este tipo de dolor tiene un carácter protector porque la sensación que produce es tan desagradable que el organismo no es capaz de ignorarlo (Woolf y Salter, 2000). Normalmente, el umbral normal para el dolor se recupera una vez que el estímulo desaparece y el tejido se haya recuperado, a menos que se haya producido una lesión del sistema nervioso (Ji y col., 2003).

Debemos destacar que el dolor no se considera una experiencia unitaria sino que el individuo puede diferenciar distintas modalidades. Así, el sujeto es capaz de distinguir un dolor superficial agudo localizado, que provoca bien una sensación de ardor intenso o de dolor mecánico, o bien un dolor sordo, de características difusas y de difícil localización. Esta distinción se logra en parte gracias a la percepción de estímulos dolorosos de diferente naturaleza (mecánicos, químicos, eléctricos y/o térmicos) que pueden provocar un daño tisular, y mediante la activación selectiva de distintas subpoblaciones de nociceptores (Williams y col., 1999; Julius y Basbaum, 2001).

Independientemente de su modalidad, la percepción del dolor agudo se produce en el rango de una fracción de segundo tras la estimulación de las terminales periféricas de un grupo de neuronas de alto umbral conocidas como **neuronas nociceptivas o nociceptores** y que transmiten las distintas propiedades del estímulo nocivo externo (modalidad, duración, intensidad y localización) en forma de impulsos nerviosos hacia el sistema nervioso central. La conducción de estos estímulos dolorosos se produce en forma de potenciales de acción, a través de unas fibras de alta velocidad de conducción conocidas

como fibras $A\delta$, en el caso de estímulos mecánicos, y las fibras no mielinizadas de tipo C, de conducción lenta, que son polimodales y perciben estímulos mecánicos, químicos y térmicos. Esta información alcanza el tálamo y finalmente la corteza cerebral que pondrá en alerta al individuo ante otros posibles daños (figura 1.1) (Scholz y Woolf, 2002; Ortiz-Cardona y Bendo, 2007; Woolf, 2010).

Los nociceptores se consideran neuronas de alto umbral, puesto que necesitan estímulos relativamente intensos para disparar un potencial de acción. Al contrario que las neuronas de otras modalidades sensoriales, los nociceptores son eléctricamente silentes en condiciones normales (Woolf y Ma, 2007) y transmiten potenciales de acción en forma de todo-o-nada cuando son estimulados. Sin embargo, la simple estimulación de estas neuronas no basta para generar dolor sino que la percepción de dolor normalmente depende de la frecuencia de disparo de las aferentes primarias que, a su vez, depende de la intensidad del estímulo que se ejerce sobre éstas. La despolarización de estas neuronas tiene lugar gracias a cambios en la conductancia eléctrica de la membrana debidos a la acción de distintos canales iónicos activados por voltaje y por la actividad de bombas electrogénicas (Hille, 2001).

El umbral de disparo de los nociceptores no es estático sino que puede ser modulado por *procesos adaptativos*. Existen diversas condiciones, como por ejemplo la presencia de ciertas sustancias, que provoca una disminución de ese umbral de activación. Este proceso que se conoce como *sensibilización o facilitación* provoca que estímulos habitualmente indoloros se conviertan en dolorosos, lo que se conoce como alodinia, mientras que estímulos moderadamente dolorosos se perciban como extremadamente dolorosos, lo que se conoce como hiperalgesia (Woolf y Salter, 2000; Sandkühler, 2009). Por otro lado, una estimulación dolorosa repetida o prolongada puede desencadenar la *desensibilización* de los nociceptores, que se manifiesta en forma de analgesia, y conlleva cambios fisiológicos en las terminales de las neuronas sensoriales que puede incluso ser el resultado de la neurotoxicidad (Sawynok, 2003). La excitabilidad neuronal y el patrón de disparo de potenciales de acción, amplitud y frecuencia, intrínsecamente dependen de la existencia y actividad de estos canales iónicos, contribuyendo por tanto de forma substancial a la percepción de dolor en procesos patológicos como se verá más adelante.

Anatómicamente hablando, los nociceptores son neuronas pseudo-monopolares, con un único axón que se bifurca en dos ramas: la terminal periférica inerva la piel y las vísceras (órganos diana), mientras la terminal central inerva el asta dorsal de la médula espinal (Cervero y Laird, 1999). Los cuerpos celulares o somas se alojan en los ganglios trigeminales (TG) o ganglios raquídeos (DRGs) según proyecten sus terminales periféricas a la cara, el cráneo, las meninges y el cuello, o las terminales de las DRGs al tronco y extremidades, incluyendo las vísceras (Julius y Basbaum, 2001; Levy y col., 2012). Asimismo, existe una distinta proyección central, en la médula espinal, de ambos tipos de nociceptores: mientras que las fibras $A\delta$ proyectan en las láminas I y V, las fibras C proyectan en las láminas superficiales I y II (Woolf, 1995; Basbaum y col., 2009).

El dolor fisiológico también se puede clasificar en función de su localización en dolor somático y dolor visceral (OMS, 2006). El dolor somático es aquel que se origina en

la piel, los músculos, articulaciones, ligamentos o huesos, está muy bien localizado y limitado a la zona en la que se ha producido la lesión, lo que permite subclasificarlo a su vez en superficial y profundo (Moreno y Prada, 2004). El dolor visceral, por su parte, se produce cuando ocurren lesiones que afectan los órganos internos. No todas las vísceras son sensibles al dolor, por lo que éste en ocasiones se encuentra mal localizado. Normalmente, el dolor visceral se asocia a la existencia de una enfermedad sistémica, por lo que es uno de los síntomas más comunes en los pacientes que buscan atención médica (Cervero y Laird, 1999).

Clasificación de los nociceptores en función de su velocidad de conducción

Como se acaba de comentar, los nociceptores se distribuyen a través de todos los tejidos corporales incluyendo no solo piel y mucosas, sino también vísceras, huesos y tendones (Woolf, 2010). Sin embargo, la piel es el tejido en que han sido más extensamente estudiados los nociceptores. La mayoría de nociceptores que inervan la piel pueden recogerse en dos grandes grupos que se diferencian principalmente en la velocidad de conducción de los axones, parámetro que está directamente relacionado con su grado de mielinización (Julius y Basbaum, 2001; Kandel y col., 2001). El grupo de las fibras $A\delta$, al estar ligeramente mielinizadas presenta una velocidad de conducción mayor de 5-30 m/s (Kandel y col., 2001). Este grupo de neuronas se puede subdividir a su vez en dos: las de tipo I, que se activan por estímulos mecánicos intensos o por calor nocivo ($> 52^{\circ}\text{C}$), y las de tipo II, sensibles a estímulos mecánicos y su umbral de activación térmica se encuentra sobre los 43°C . Parte de las fibras $A\delta$ pueden ser también activadas por estímulos químicos como los protones, las prostaglandinas (PGs) o la bradiquinina (BK) (Julius y Basbaum, 2001). El grupo de nociceptores constituido por las fibras C, caracterizadas por ser no mielinizadas, tienen una velocidad de conducción de aproximadamente 1.0 m/s. Las fibras C son fibras polimodales, es decir, pueden ser activadas por estímulos físicos, como la temperatura o el estrés mecánico, o por estímulos químicos, como ácidos o sustancias irritantes de distinta naturaleza. (Julius y Basbaum, 2001) (figura 1.1).

Los otros tipos de fibras, las $A\alpha$ y $A\beta$, son de mayor diámetro de soma (entre 13-20 y 6-12 μm , respectivamente), presentan mayor grado de mielinización, y transmiten el impulso nervioso a mayor velocidad (80-120 y 35-75 m/s, respectivamente). Estas neuronas sensoriales $A\alpha$ y $A\beta$ son de bajo umbral mecánico, aunque un pequeño grupo de éstas responde a estímulos de alto umbral (Woolf, 1995).

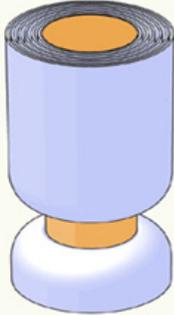
Tipos de fibras	A α	A β	A δ	C
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
				
Diámetro (μm)	13-20	6-12	1-5	0.2-1.5
Velocidad (m/s)	80-120	35-75	5-30	0.5-2
Receptores sensoriales	Propioceptores del músculo esquelético	Mecanorreceptores de la piel	Dolor, temperatura	Temperatura, dolor, picor

Figura 1.1: Las fibras nerviosas periféricas se clasifican en cuatro grupos diferentes en función de la velocidad de conducción y de su diámetro como fibras A α , A β , A δ y C. La velocidad de conducción depende del grado de mielinización y por tanto del diámetro de la fibra. La mayoría de los nociceptores son fibras A δ o C y su velocidad de conducción se encuentra entre 5-30 m/s y 0,5-2 m/s respectivamente. Imagen obtenida de Kandel y col. (2001).

Además de la clasificación en función de las propiedades de conducción, los nociceptores pueden diferenciarse según ciertas características bioquímicas, como es su capacidad de liberar o no péptidos tales como los neuropéptidos sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) en respuesta a estímulos térmicos y de inflamación. De acuerdo a esta característica, los nociceptores se clasifican como peptidérgicos y no peptidérgicos. Una particularidad de las neuronas peptidérgicas es que expresan el receptor específico del factor de crecimiento nervioso (NGF), el receptor de tirosina quinasa A (TrkA), cuya función es muy importante para el desarrollo y la respuesta de estas neuronas (Richardson y Vasko, 2002; Basbaum y col., 2009).

Las neuronas nociceptivas realizan una sinapsis en la médula espinal con neuronas denominadas de segundo orden, que son capaces de transmitir estímulos de dolor, de temperatura y del tacto ligero hasta el sistema nervioso central (SNC) (Ortiz-Cardona y Bendo, 2007). Las neuronas trigeminales proyectan a nivel del tronco encefálico mientras que las de DRGs lo hacen a nivel del asta dorsal de la médula espinal en las capas I, II y V. Dichas neuronas de segundo orden conectan con otras neuronas en el tálamo (de tercer orden) formando en su conjunto el tracto espinotalámico, que es el responsable de la conducción de los impulsos nerviosos de la médula a los núcleos superiores del

SNC y de la corteza somato-sensorial (Vidal y col., 2005).

1.3.2. Dolor patológico

Mientras que el dolor fisiológico está limitado por la presencia del estímulo nocivo y sirve para proteger el área lesionada de posteriores agresiones, el dolor patológico puede inducir síntomas prolongados, más allá de la presencia del estímulo, incluso en ausencia de una lesión identificable como consecuencia de una disfunción del sistema nervioso periférico y/o central. El dolor patológico se puede clasificar a su vez en dolor inflamatorio y en dolor disfuncional.

1.3.2.1. Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio es también un dolor adaptativo y de protección que normalmente desaparece una vez eliminado el daño inicial (Costigan y col., 2009; Woolf, 2010). Las lesiones que originan este tipo de dolor son las fracturas, desgarros musculares, etc. que, a su vez, activan el sistema inmune (respuesta inflamatoria) como consecuencia de una infección o de un daño tisular (Costigan y col., 2009).

La liberación de la denominada “sopa o cocktail inflamatorio o algogénico”, constituida por gran variedad de substancias pro-inflamatorias, como las interleucinas IL-1 β e IL-8 o mediadores lipídicos, como las PGs, por parte de los queratinocitos (Southall y col., 2003), o como las citocinas e histamina liberadas por los mastocitos, macrófagos, granulocitos y neutrófilos (Sörbo y col., 1994; Inoue y col., 2006), junto con la inducción de enzimas como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), provocan que los nociceptores pasen de detectar únicamente estímulos nocivos a detectar estímulos de menor intensidad. Esta hiperexcitabilidad no solamente afecta a las fibras C dando lugar a una hiperalgesia y/o alodinia primaria en el lugar del estímulo, sino que también perturba las fibras β -A dando lugar a una hiperalgesia secundaria, caracterizada por una sensibilidad elevada en las regiones situadas alrededor de la zona lesionada (figura 1.2) (Scholz y Woolf, 2002; Huang y col., 2006a).

Cuando la lesión tisular es de suficiente magnitud, las terminales periféricas pueden liberar neuropéptidos tales como SP y CGRP que, a su vez, estimularán la liberación de otros factores en las células dañadas e inmunes, una mezcla de substancias como la serotonina, ATP, NGF, etc, cuyo efecto provoca vasodilatación, extravasación del plasma en células endoteliales y activación de células del sistema inmunitario que retroalimentan el proceso (Julius y Basbaum, 2001; Richardson y Vasko, 2002). Este proceso se conoce como inflamación neurogénica.

Mediadores pro-inflamatorios y sensibilización periférica

Como consecuencia de un daño o inflamación tisular local, las múltiples substancias pro-inflamatorias liberadas se unen a sus receptores respectivos en la membrana plasmática de la terminal periférica de los nociceptores provocando la activación de numerosas vías de señalización intracelular que incluyen las vías de las proteínas quinasas PKC (Hucho y col., 2005) y PKA (Varga y col., 2006), la fosfatidil inositol 3-quinasa PI3K (Malik-Hall y col., 2005), las MAP quinasas ERK y p38 (Jin y Gereau, 2006; Mizushima y col., 2007) y JNK (Doya y col., 2005). La activación de

estas vías de señalización promueven cambios metabólicos de una serie de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y canales iónicos como por ejemplo los receptores de potencial transitorio (TRPs) (Zhang y col., 2008), receptores purinérgicos P2X (Miras-Portugal y Gualix, 2009), receptores de glutamato (Kim y col., 2009), o canales de Na^+ dependientes de voltaje (Nav), que verán alterados su cinética de activación provocando, en último término, la disminución del umbral de activación, el incremento de la excitabilidad y el aumento de la sensibilidad de los nociceptores. Asimismo, la activación de determinadas vías de señalización puede promover la sensibilización de los nociceptores por un mecanismo adicional alternativo como es el aumento del transporte de efectores de estímulos nocivos hacia la membrana plasmática desde compartimentos intracelulares (Woolf y Ma, 2007). Los cambios bioquímicos también pueden tener sus efectos a más largo plazo en forma de alteraciones en la expresión génica, transcripcionales y post-traduccionales, y por tanto en el fenotipo celular (Woolf y Costigan, 1999).

Sin embargo, los nociceptores no solo tienen una función aferente sino que también ejercen una función eferente local caracterizada por la vasodilatación, el enrojecimiento, el reflejo axonal y la extravasación plasmática, como consecuencia de la liberación de neuropéptidos CGRP y SP que actúan sobre las células inmunes y sobre el tejido vascular (Basbaum y Jessell, 2000). Este proceso, junto a la acción de los neuropéptidos sobre los propios nociceptores, genera una retroalimentación del proceso que se conoce como *sensibilización periférica* y resulta en hiperalgesia térmica importante cuando ocurre una inflamación o una lesión en el organismo (Ji y col., 2003; Planells-Cases y col., 2005).

Sensibilización central

Como se mencionó anteriormente, en muchos síndromes clínicos el dolor no tiene una función propiamente protectora e intervienen distintos procesos de sensibilización central. Aunque fenomenológicamente hablando la sensibilización de origen central o periférica sean parecidas, los mecanismos moleculares responsables y la manifestación sintomatológica son distintos. De hecho, mientras que la sensibilización periférica solamente conlleva una hipersensibilidad térmica, la de origen central se caracteriza por una hipersensibilidad mecánica. Funcionalmente hablando, la sensibilización central se caracteriza por un aumento de la excitabilidad neuronal, un aumento de la eficacia sináptica y una disminución de la inhibición neuronal que tiene como efecto neto la facilitación, potenciación o amplificación de las señales.

La activación de receptores de glutamato, del receptor de la neuroquinina 1 (NK1) por SP, del receptor CGRP1 por CGRP, del receptor TrkB por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y/o del receptor B2 por bradiquinina, son capaces *per se* de disparar la sensibilización central (Dray y Perkins, 1993; Rivera y col., 2002; Suzuki y col., 2002; Sun y col., 2004). Además, otros mecanismos pueden activar las cascadas de las proteínas quinasas PKA, PKC, CaMKII, y/o ERK1/2 que, a su vez, pueden modificar: i) el umbral y la cinética de activación de los receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y de tipo amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), ii) el transporte de estos receptores a la membrana plasmática, y iii) reducir la liberación de neurotransmisores inhibitorios

GABA y glicina y, en consecuencia, disminuir la activación de sus respectivos receptores (Berman y col., 2000; Esteban y col., 2003; Banko y col., 2004; Marsden y col., 2007). Estos cambios anteriormente mencionados son de una duración relativamente corta y reversible. Sin embargo, pueden ocurrir cambios más duraderos que incluyen alteraciones estructurales como ocurre en el caso del dolor neuropático.

1.3.2.2. Dolor disfuncional

Este tipo de dolor no es adaptativo, en el sentido de que no protege al organismo, sino que se debe al mal funcionamiento por sí mismo del aparato somato-sensorial sin que sea posible la localización de la inflamación o del daño (en la mayoría de los casos), por lo que es considerado como una enfermedad (Costigan y col., 2009). Cuando el dolor originado afecta al SN, éste se denomina *dolor neuropático*.

Dolor neuropático

El dolor neuropático es un tipo de dolor muy persistente, que no suele responder tan bien como el dolor nociceptivo a las terapias convencionales contra el dolor, y se caracteriza por manifestarse en ausencia de un estímulo doloroso, o lo que es lo mismo, de inducir hiperalgesia y/o alodinia (Aguilera-Muñoz y col., 2005). El dolor neuropático está provocado por un comportamiento inadecuado del sistema nervioso como consecuencia de una lesión (Treede y col., 2008), enfermedad o trauma, y cuya localización está definida en una zona pequeña (Woolf, 2010). El dolor neuropático puede tener origen en el SNC, como consecuencia de una lesión traumática en la médula espinal o daños cerebrales, por apoplejía o esclerosis múltiple, o estar generado por lesiones en el sistema nervioso periférico, como es el caso de las neuropatías diabéticas, las neuralgias producidas por el Herpes Zóster y las neuropatías inducidas por tratamientos de quimioterapia (OMS, 2006).

Independientemente del origen de la enfermedad primaria, el dolor neuropático se produce como consecuencia de una serie de cascadas de cambios como resultado de una lesión en el sistema nervioso somato-sensorial que resulta en pérdida de la capacidad adaptativa. La mala adaptación del sistema nervioso incluye la generación de potenciales de acción ectópicos, facilitación y desinhibición de los sistemas de transmisión sinápticos y/o aparición de nuevos circuitos o conexiones sinápticas. Algunos de estos cambios ocurren a nivel periférico. Por ejemplo, los impulsos ectópicos parecen generarse por un aumento en la excitabilidad de los nociceptores (por cambios importantes en el perfil de transcripción de las neuronas lesionadas) (Costigan y col., 2002), y la activación de aferentes mielinizadas de bajo umbral (Campbell y col., 1988). Sin embargo, se considera que uno de los procesos sinápticos que contribuyen de forma más importante al dolor neuropático es la facilitación sináptica (o LTP), con cambios a nivel pre- y post-sinápticos semejantes a los descritos en procesos de aprendizaje y memoria en otras regiones del cerebro. Otra de las alteraciones observadas en el dolor neuropático es la hiperalgesia fuera del área lesionada que se atribuye a la incorporación de las fibras densamente mielinizadas a los circuitos nociceptivos (Yamamoto y col., 2008). Por último, cambios en varios mecanismos que incluyen pérdida de inter-neuronas inhibitorias

y cambios estructurales en la reconexión de neuronas lesionadas, parecen contribuir a la aparición del dolor neuropático.

Tanto el dolor neuropático como el inflamatorio se caracterizan por un aumento de la hipersensibilidad tanto en el lugar en el que se ha producido el daño, como en las zonas adyacentes. Tanto el aumento de expresión de receptores en la membrana, como la liberación de mediadores inflamatorios, contribuyen a la disminución del umbral de activación de los nociceptores, y al aumento de su excitabilidad (Costigan y col., 2009). Este mecanismo, en el que se produce la modulación de la transmisión sináptica de los nociceptores, se conoce como sensibilización central (Woolf y Salter, 2000).

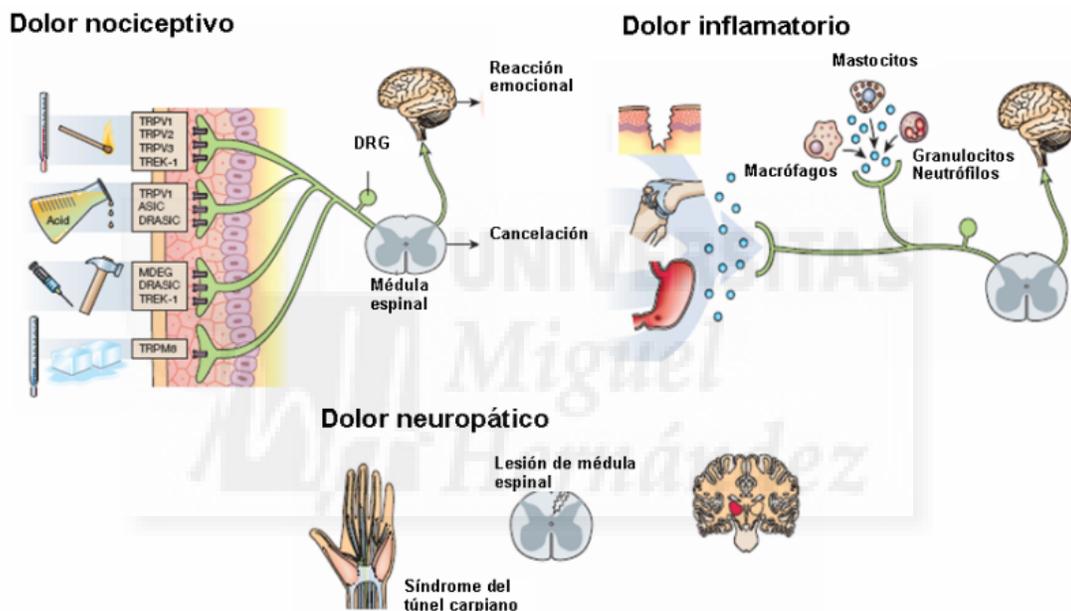


Figura 1.2: Los diferentes tipos de dolor se clasifican en función de su origen en dolor nociceptivo, dolor inflamatorio y dolor neuropático. El dolor nociceptivo se produce por la presencia de un estímulo nocivo y actúa a diferentes niveles del sistema nervioso, el dolor inflamatorio se produce como consecuencia de la liberación de sustancias inflamatorias liberadas por el sistema inmune como consecuencia de una lesión, y el dolor neuropático se ocasiona por el comportamiento incorrecto del sistema nervioso tras una lesión. Las imágenes representan los diferentes factores que provocan cada uno de ellos. Imágenes obtenidas de Scholz y Woolf (2002).

1.4. Dolor neuropático asociado al tratamiento con citostáticos

Aunque el cáncer abarca múltiples síntomas físicos y psicológicos, el síntoma más crítico para los pacientes con cáncer es el dolor, conocido como dolor oncológico. De hecho, se ha probado que el dolor en estos pacientes influye no solamente en su capacidad

para tolerar el tratamiento, sino a la hora de recuperar una vida normal activa o para conseguir una muerte digna. De hecho, al menos un tercio de los pacientes con cáncer describen la aparición de “un dolor de ruido de fondo” que puede llegar a alterar su calidad de vida, ya que puede perturbar la función motora, provocar fatiga, alteraciones del sueño y cambios de humor.

En cuanto al origen del dolor, el dolor oncológico puede aparecer como consecuencia de la opresión o la infiltración de un tumor en otro tejido o por sustancias liberadas por el propio tumor. En efecto, el dolor se considera como un importante indicador clínico de la progresión del tumor. Alternativamente, el dolor puede aparecer como consecuencia del tratamiento recibido, por radioterapia o farmacológico y, normalmente los síntomas desaparecen una vez que se ha terminado con la terapia (Lee y Swain, 2006). El dolor oncológico puede persistir largos periodos de tiempo incluso cuando ya ha desaparecido la causa que lo originó, lo que hace que el dolor pase a ser crónico (Costigan y col., 2009). Este tipo de dolor es característico del dolor neuropático (Grond y col., 1999) y con frecuencia se denomina como neuropatía periférica inducida por quimioterapia (en inglés CIPN).

Diversos antineoplásicos como la vincristina, el taxol, el oxaliplatino, el cisplatino y el bortezomib presentan como efecto secundario más común la CIPN. El oxaliplatino, un derivado de tercera generación del platino que se utiliza generalmente en el tratamiento del carcinoma colorrectal provoca dos tipos diferentes de CIPN: i) una CIPN aguda, que se produce poco después de la administración, y se caracteriza por parestesias (sensación de hormigueo o adormecimiento), entumecimiento y dolor en las extremidades (principalmente en los dedos) e hipersensibilidad al frío, y ii) una neuropatía periférica crónica, que se desarrolla después de tratamientos más prolongados, y resulta en la pérdida de sensación, disestesia, alteración de los reflejos tendinosos, la sensación de vibración y la propiocepción, llegando en casos graves a la ataxia sensorial.

La neuropatía asociada al tratamiento con vincristina o con taxol también se caracteriza por parestesia que suele afectar a las extremidades pero, al contrario que el oxaliplatino, produce sensación de quemazón. Mientras que el tratamiento con dosis bajas provoca hiperalgesia y alodinia, el tratamiento con dosis elevadas provoca parestesias del tipo hipoestesia y anestesia. Esto último se ha relacionado con una degeneración axonal de los nervios periféricos (Cliffer y col., 1998).

Vincristina y taxol ejercen su acción citostática mediante la unión a beta-tubulina. Sin embargo, mientras la primera previene el ensamblaje de los microtúbulos, el taxol favorece la formación de largos polímeros de tubulina, provocando la pérdida de función del huso mitótico y la consiguiente parada del ciclo celular (Jordan y col., 1993). La neurotoxicidad de estos fármacos se atribuye a la disrupción de la dinámica de microtúbulos en los axones neuronales, alterando el transporte axonal y la pérdida parcial de fibras nerviosas periféricas. Este mecanismo puede justificar la existencia de neuropatías en tratamientos con altas dosis del citostático. Además, otros mecanismos parecen subyacer en el desarrollo de las neuropatías periféricas con dosis inferiores. De hecho, parece ser que se produce una serie de cambios funcionales pleiotrópicos significativos que se traducen en un aumento de la excitabilidad de las neuronas tanto en las DRGs como en el asta dorsal de la médula espinal, entre los que cabe destacar cambios

1.4. Dolor neuropático asociado al tratamiento con citostáticos

en diversos canales iónicos como canales de Na^+ , de Ca^{2+} , de K^+ , en los receptores de NMDA y en los receptores de potencial transitorio (TRP) (Thuret-Carnahan y col., 1985; Cata y col., 2006; Nieto y col., 2008; Chen y col., 2011).





Capítulo 2

Papel de los canales iónicos en la transducción del dolor

Los canales iónicos presentes en la membrana plasmática de los nociceptores participan en varios niveles del complejo proceso de la transducción nociceptiva (Belmonte y col., 2008). Así, por ejemplo, existen algunos canales iónicos que transducen el estímulo nocivo (calor, presión, temperatura, sustancias químicas, etc.) en una señal eléctrica, y otros canales que conducen esa señal eléctrica a través del axón del nociceptor primario y lo transmiten sinápticamente a nociceptores de segundo y tercer orden hasta el cerebro, para que éste interprete la señal eléctrica como dolor y ejerza una respuesta adecuada de protección.

Los canales iónicos son proteínas de membrana formados por varios homo- o heterooligómeros que forman poros en las membranas celulares, permitiendo el paso selectivo de determinados iones a favor del gradiente electroquímico en respuesta a determinados estímulos. Su función, tráfico y distribución en la membrana plasmática tiene un papel muy importante en la función celular y especialmente en la plasticidad sináptica (Planells-Cases y Ferrer-Montiel, 2007). En el caso concreto de los nociceptores, se ha demostrado que los canales iónicos tienen un papel fundamental determinando su excitabilidad y la función aberrante de éstos en condiciones patológicas conduce al dolor crónico o al dolor neuropático (Raouf y col., 2010). Esta implicación se ve reforzada por estudios de ablación génica (*knockout*, KO) de determinados canales iónicos en animales modelo que demuestran déficits fundamentales en la percepción de distintos aspectos del dolor (Cregg y col., 2010).

En las terminales presinápticas, existen al menos 12 grandes grupos de canales iónicos diferentes, en los que se engloban a su vez varias decenas de canales (Meir y col., 1999). Destacan los canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} , de K^+ , de Na^+ , de Cl^- , los ASIC (canales iónicos de detección de pH ácido), los receptores TRPs, y los canales dependientes de ligando (receptores de glutamato, receptores purinérgicos P2X y P2Y, y los receptores GABA).

2.1. Canales dependientes de voltaje asociados al dolor

Los canales de Ca^{2+} (VDCCs) comprenden una familia de 10 miembros (subdivididos en las familias: L, N, P/Q, T y R) que se distinguen entre sí tanto por el voltaje necesario para activar sus corrientes como por sus propiedades farmacológicas. Dentro de este grupo, los canales tipo N tienen un papel muy importante en la transmisión del dolor inflamatorio y del dolor neuropático. Saegusa y colaboradores demostraron que los ratones que carecen de estos canales manifiestan una reducción muy severa en las respuestas a estímulos que inducen inflamación, así como de los síntomas previos del dolor neuropático (Saegusa y col., 2001). Por otro lado, los canales de Ca^{2+} de tipo T parecen actuar como amplificadores de las señales nociceptivas periféricas tanto de calor doloroso, estímulos mecánicos dolorosos o estímulos químicos (Todorovic y Jevtovic-Todorovic, 2007). Por último es importante destacar que mutaciones en la subunidad alfa 1 del tipo de canales de Ca^{2+} P/Q (Cav2.1) se han asociado a una forma de migraña hemipléjica familiar (FMH) (Ophoff y col., 1996; Dichgans y col., 2005).

El grupo de los canales de K^+ , es el más numeroso y ampliamente distribuido (Littleton y Ganetzky, 2000). Este grupo está implicado en el mantenimiento del potencial de reposo celular y la repolarización del potencial de membrana por lo que la pérdida o alteración de su función da lugar a neuronas más excitables y una mayor sensibilidad a estímulos dolorosos. Por ejemplo la inhibición farmacológica de la corriente M, mediada por miembros de la familia Kv7, disminuye la frecuencia de disparo de potenciales de acción de los nociceptores por lo que podría utilizarse como analgésico (Delmas y Brown, 2005).

Otras familias, como la de los canales de tipo Shaker (Kv1.1) y los de rectificación de entrada (Kir3.1 y Kir3.2) juegan un papel crucial en la transmisión de dolor puesto que animales KO para cualquiera de estos tres genes presentan una función disminuida a la morfina (Clark y Tempel, 1998; Marker y col., 2004). Por último, animales que carecen de canales de K^+ de tipo “2-dominios P” (K_{2P}) TREK-1 muestran mayor hiperalgesia (Cregg y col., 2010).

Los canales de Na^+ son los responsables de la generación y propagación de los potenciales de acción (Renganathan y col., 2001). Cuatro de los nueve miembros existentes están relacionados directamente con el dolor inflamatorio y crónico (Wood, 2004). Por ejemplo, mutaciones en Nav1.1 se han asociado a epilepsia y migraña (Dichgans y col., 2005), las mutaciones en Nav1.5 provocan dolor visceral (Saito y col., 2009) y en Nav1.8 modulan el dolor mediado por temperaturas frías y parece jugar un papel central en el dolor mecánico e inflamatorio (Kerr y col., 2004). Nav1.9 y su subunidad beta β -2 también tienen efectos en la percepción del dolor (Priest y col., 2005; Lopez-Santiago y col., 2006). No obstante, el canal de sodio más importante en nocicepción es Nav1.7 cuya delección bloquea la nocicepción mecánica y atenúa la inflamatoria, sin ejercer papel alguno en dolor neuropático (Nassar y col., 2004). Además, estos datos vienen avalados por mutaciones que provocan una ganancia de función que se han asociado a síndrome de dolor paroxístico (PPED) que se dispara durante un estímulo mecánico (Fertleman y col., 2006).

Otros canales dependientes de voltaje, como son los canales de Cl^- no se han asociado hasta la fecha con la transducción ni transmisión de los estímulos nociceptivos.

2.2. Canales activados por unión de ligando asociados al dolor

El glutamato, el neurotransmisor excitatorio de las neuronas aferentes primarias, puede activar distintos tipos de receptores post-sinápticos en el asta dorsal de la médula espinal, incluyendo los receptores ionotrópicos AMPA, NMDA, y Kainato, y varios receptores de glutamato metabotrópicos (mGlu). Como se mencionó previamente, existen múltiples evidencias que proponen cambios en la eficacia de las sinapsis glutamatérgicas de las vías involucradas en la señalización del dolor mediadas por cambios en la actividad de receptores NMDA o mGluRs como consecuencia de una lesión neuronal (Abbadie y col., 2009). Estos cambios inducen formas de potenciación homo- y hetero-sináptica en los que intervienen el receptor de NMDA y diversas vías de señalización (Gardoni y col., 1998; Marsden y col., 2007). Otros estudios recientes han propuesto un importante papel de los receptores AMPA en el desarrollo de las respuestas del dolor agudo y crónico (Wang y col., 2010). Por ejemplo, se ha observado que las neuronas de las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal expresan receptores AMPA conteniendo subunidades GluR2 que resultan en canales impermeables a Ca^{2+} . En condiciones de inflamación, curiosamente se produce un aumento del número de receptores que contienen GluR1 en detrimento de aquellos que contienen GluR2, resultando en un aumento importante de la permeabilidad de los receptores de glutamato a Ca^{2+} e incremento del Ca^{2+} intracelular (Petrália y col., 1997; Guan y col., 2003; Ohshiro y col., 2007).

Otro de los efectos principales de la sensibilización central es la desinhibición sustancial del asta dorsal de la médula espinal tanto por una pérdida de corrientes mediadas por receptores de glicina como de receptores de tipo GABA (Moore y col., 2002). Este efecto se ha atribuido a la muerte por apoptosis de interneuronas (Scholz y col., 2005).

2.3. Otros canales iónicos asociados al dolor

La administración intradérmica de ATP es muy dolorosa y se sabe que es capaz de excitar fibras de tipo C mecano-sensibles y no mecano-sensibles (Hilliges y col., 2002). Estudios farmacológicos con antagonistas específicos o utilizando la ablación selectiva de determinados genes han demostrado que la activación de los subtipos ionotrópicos P2X_3 , $\text{P2X}_{2/3}$, P2X_4 y P2X_7 , y del metabotrópico P2Y_2 modulan el dolor (Jarvis y col., 2001; Malin y col., 2008; Gómez-Villafuertes y col., 2009; de Rivero Vaccari y col., 2012). Mientras que la activación de receptores homoméricos de tipo P2X parece contribuir al dolor agudo y al dolor inflamatorio, los heterómeros $\text{P2X}_{2/3}$ modulan la sensibilidad a largo plazo tras una lesión del nervio o una inflamación crónica (Jarvis y col., 2001; Nakagawa y col., 2007). Además, P2X_4 y P2X_7 parecen mantener la sensibilidad durante la nocicepción a través de interacciones neuro-gliales o alternativamente a través de la

2. PAPEL DE LOS CANALES IÓNICOS EN LA TRANSDUCCIÓN DEL DOLOR

interacción con otros receptores que actúan como efectores (Kobayashi y col., 2005; Stanchev y col., 2009).

Los canales iónicos sensibles a pH ácido (ASICs) son los canales principalmente activados por la acidificación del medio característico de los dolores inflamatorio y neuropático. Mazzuca y colaboradores han puesto de manifiesto el papel de los ASIC en la transmisión del dolor, proponiendo al receptor ASIC1a como una diana molecular, ya que su bloqueo tiene propiedades analgésicas importantes para el tratamiento del dolor neuropático (Mazzuca y col., 2007).

La familia de los receptores de potencial transitorio (TRP) está implicada en muy diversas funciones fisiológicas con numerosas formas de activación (Planells-Cases y Ferrer-Montiel, 2007). En los nociceptores, se ha observado la expresión de 6 TRPs (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 y TRPA1) que están directamente implicados en la detección y transducción de estímulos mecánicos, térmicos y/o químicos. La delección de estos receptores en modelos animales provoca serios déficits en las respuestas a estímulos mecano-sensibles, o a las respuestas a agentes irritantes (Caterina y col., 2000; Suzuki y col., 2003; Desai y Clapham, 2005; Kwan y col., 2006). Asimismo, las mutaciones que producen ganancia de función de TRPV4 provocan un síndrome asociado a pérdida de inervación periférica (Landouré y col., 2009) mientras que una ganancia de función en TRPA1 está relacionado con el dolor paroxístico asociado a cansancio (Cregg y col., 2010). El papel de esta familia de canales se describirá con más detalle en el siguiente capítulo.

Capítulo 3

Papel de los receptores TRPs en la transducción del dolor

3.1. La familia de los TRPs

La familia de TRPs está formada por un grupo muy diverso de canales catiónicos que se expresan predominantemente en células excitables del sistema nervioso, donde juegan un papel muy importante en la transducción del dolor, aunque también se expresan en células no excitables (Montell, 2005b; Planells-Cases y Ferrer-Montiel, 2007). El primer componente de esta superfamilia fue descubierto en base a la mutación **trp** en *Drosophila melanogaster* que resultaba en un importante defecto visual (Cosens y Manning, 1969). Estudios posteriores demostraron que, en contraste a la respuesta de entrada de Ca^{2+} sostenida necesaria para el movimiento de pigmentos en los fotorreceptores en la mosca silvestre, *trp* presentaba una respuesta transiente a la luz (Lo y Pak, 1981; Hardie y Minke, 1992).

Los receptores TRP se expresan en una gran variedad de organismos, desde los unicelulares como las levaduras, a organismos multicelulares superiores como los mamíferos. Los TRPs son canales catiónicos, la mayoría de ellos no selectivos, con una baja dependencia a voltaje y presentan una amplia variedad de mecanismos de activación y regulación. Por ejemplo, algunos de ellos requieren la unión de un ligando, otros se activan por cambios en el voltaje, otros en respuesta a distintas temperaturas o por modificaciones covalentes de aminoácidos nucleofílicos en su secuencia. De hecho, se considera que los receptores TRP manifiestan una mayor diversidad de mecanismos de activación y de selectividades iónicas que cualquier otro grupo de canales iónicos descrito hasta la fecha (figura 3.1) (Venkatachalam y Montell, 2007).

Independientemente de esta diversidad, todos los miembros de esta superfamilia comparten una serie de características estructurales comunes obtenidas por predicción de estructura y por estudios de estructura-función. Así, por ejemplo, se acepta que los canales TRP están formados por la asociación de cuatro subunidades idénticas o no, que se ensamblan en la membrana formando un poro iónico. Estructuralmente hablando, cada subunidad está formada a su vez por 6 segmentos transmembrana (S1-S6) y, entre los segmentos S5-S6 presentan un lazo hidrofílico que estructura el poro iónico. Intracelular-

mente presentan los dominios citosólicos amino y carboxilo terminal, que presentan distintos dominios en número y composición, solamente conservados entre miembros de la misma sub-familia, y que confieren al canal determinadas funciones y propiedades (Montell, 2001; Venkatachalam y Montell, 2007). Ambas colas citosólicas contienen dominios de interacción con otras proteínas incluyendo secuencias dianas de quinasas y fosfatasa (Tominaga y Tominaga, 2005; Gaudet, 2008).

La superfamilia se divide principalmente en dos grandes grupos en función de la similitud de secuencia de sus dominios transmembrana, y de la longitud del lazo extracelular que une el primero y segundo de los dominios transmembrana (Montell, 2005a). El primero de ellos contiene 5 subfamilias, que incluyen las que comparten mayor homología con el Trp de *Drosophila*. Este grupo incluye la subfamilia TRPC (C de Canónica) que contiene 7 canales diferentes (TRPC1-7), la subfamilia TRPV (V de Vanilloide) con 6 miembros (TRPV1-6), la subfamilia TRPM (M de Melastatina) con 8 canales TRPM1-8, TRPA (A de Anquirinas) con sólo 1 miembro (TRPA1), y TRPN (N de no-mecanorreceptores) siendo TRPN el único que no se expresa en mamíferos. El segundo grupo está comprendido por las familias TRPP (P de Policistina) con 3 miembros (TRPP1-3), y la subfamilia TRPML (ML de Mucolipina) también con 3 miembros (TRPML1-3).

Dentro de esta superfamilia, las subfamilias que están directamente implicadas en los mecanismos de termorregulación son las de los TRPV, TRPM y TRPA1.

3.2. Termo-TRPs

Un pequeño número de estos receptores TRP se consideran termo-receptores dado que son capaces de activarse por temperaturas que van desde el frío doloroso ($<15^{\circ}\text{C}$) al calor doloroso ($>42^{\circ}\text{C}$). Específicamente, se incluyen algunos miembros de la subfamilia de los vanilloides TRPV (V1-V4), de los de melastatina TRPM (M2, M3, M5 Y M8) y TRPA (A1). Estos receptores, además pueden activarse tras unión a distintos compuestos químicos, a cambios del voltaje e incluso algunos receptores se abren en respuesta a estímulos osmóticos (Huang y col., 2006b) (figura 3.1).

A continuación se describirán brevemente algunas características de los termorreceptores que se han asociado con la percepción del dolor, para terminar detallando TRPV1 y su papel en el dolor inflamatorio.

3.2.1. TRPA1

La subfamilia TRPA presenta solamente un miembro en humanos, TRPA1, que fue descubierto en 2003 (Story y col., 2003). TRPA1 es un receptor polimodal que se expresa en neuronas nociceptivas peptidérgicas de DRG y TG (McKemy, 2005), donde colocaliza con TRPV1 pero no con TRPM8, y en células del oído interno (Story y col., 2003). TRPA1 se activa por sustancias químicas como el aceite de mostaza, el ajo o el wasabi, además de por otras sustancias irritantes como la acroleína, y compuestos oxidantes (Bautista y col., 2006; Bessac y col., 2008). Además, TRPA1 se activa por temperaturas por debajo de 20°C (Obata y col., 2005).

Estructuralmente hablando, TRPA1 comparte todas las características topológicas de la superfamilia TRPs, aunque presenta la particularidad de poseer 18 repeticiones de anquirinas en su dominio N-terminal (Karashima y col., 2009).

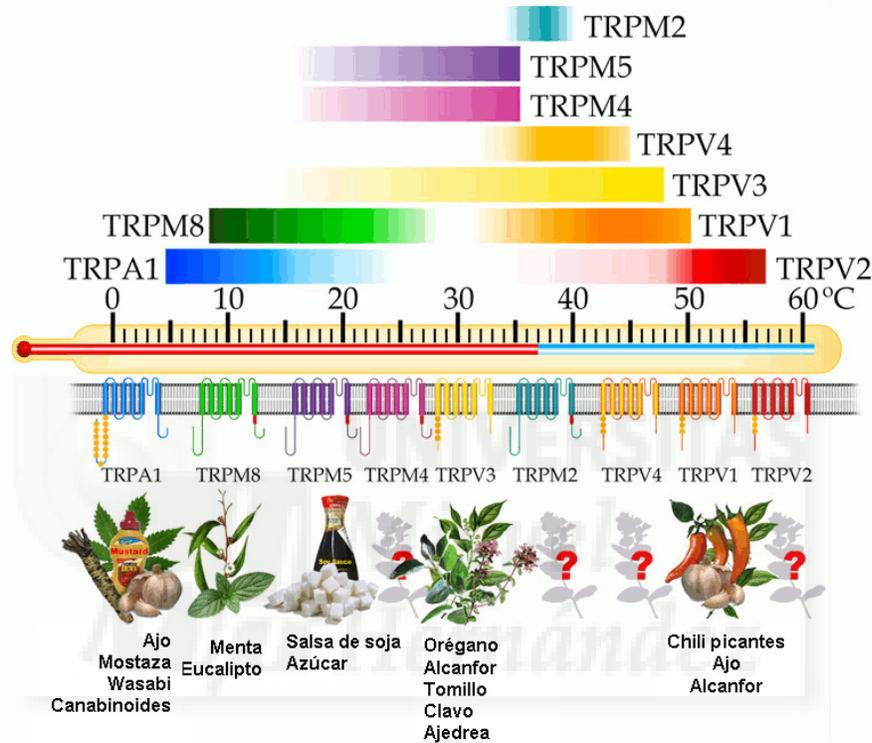


Figura 3.1: Representación esquemática de los termo-TRPs implicados en la detección de temperaturas en diferentes rangos de calor y frío nocivo. Las barras de color representan los rangos de temperatura para cada uno de los canales, siendo mayor intenso el color cuanto mayor es la activación del canal. Se representa también la topología y los dominios funcionalmente importantes, así como diferentes compuestos naturales que actúan como agonistas para cada uno de ellos. El esquema está obtenido de la página web del laboratorio del Dr. Brauchi (<http://www.brauchilab.org/research.html>).

Numerosos estudios denotan la importancia de este receptor en los mecanismos de transducción nociceptiva química y térmica al frío. De hecho, se ha demostrado que tras una inflamación o una lesión del sistema nervioso periférico se produce una regulación al alza del mRNA de TRPA1 y que los ratones con niveles reducidos de TRPA1 (*knock-down*) presentan menor hiperalgesia a estímulos fríos (Obata y col., 2005; Katsura y col., 2006). Asimismo, se ha demostrado *in vitro* que el bloqueo farmacológico de TRPA1 revierte la hiperalgesia al frío por un mecanismo transcripcional y transducional dependiente de NGF por la vía de activación de p38 (Obata y col., 2005). Notablemente, TRPA1 parece ejercer un importante papel en el sistema respiratorio como efector en el

3. PAPEL DE LOS RECEPTORES TRPs EN LA TRANSDUCCIÓN DEL DOLOR

reflejo de la tos a sustancias irritantes (Bautista y col., 2006), a través de un mecanismo en el que intervienen como mediadores pro-inflamatorios endógenos prostaglandina E2 y BK (Grace y col., 2012).

Estructuralmente hablando, TRPA1 comparte todas las características topológicas de la superfamilia TRPs, aunque presenta la particularidad de poseer 18 repeticiones de anquirinas en su dominio N-terminal (Karashima y col., 2009). La característica abundancia de anquirinas en el dominio N-terminal del receptor y su expresión en oído interno hizo pensar que quizás podría tener un papel primordial en la transducción mecánica auditiva. Sin embargo, los ratones TRPA1 KO no muestran cambios en la percepción del sonido y mantienen un correcto equilibrio por lo que se ha descartado un papel en la audición (Kwan y col., 2006).

3.2.2. TRPM8

Varios miembros de la subfamilia TRPM se expresan en células del sistema nervioso, siendo TRPM8 el único miembro que responde a temperatura (Morenilla-Palao y col., 2009). TRPM8 también es un receptor polimodal puesto que se activa por mentol, icilina o por eucaliptol, sustancias que provocan en humanos una sensación placentera de frescor (McKemy y col., 2002; Peier y col., 2002; Chuang y col., 2004; Voets y col., 2004), y por temperaturas frescas (25°C en sistemas de expresión heteróloga, algo mayor en sistemas nativos (de la Peña y col., 2005)).

Su papel fisiológico *in vivo* se demostró en ratones TRPM8 KO que presentaban déficit en su capacidad de percibir temperaturas frescas no dolorosas aunque no el frío en el rango doloroso (Bautista y col., 2007; Colburn y col., 2007; Dhaka y col., 2007). Al igual que ocurre con TRPA1, cuando se produce una lesión tisular o lesión periférica del nervio aumenta la expresión de TRPM8 en las DRGs, lo que sugiere su contribución a los mecanismos de alodinia al frío (Xing y col., 2007; Frederick y col., 2007). El aumento de expresión puede en determinados casos tener un efecto analgésico, como se publicó en un trabajo de Proudfoot y colaboradores en 2006 donde demostraron que la activación de TRPM8, mediada por receptores mGlu, presentaba propiedades analgésicas (Proudfoot y col., 2006).

3.2.3. Termorreceptores de la subfamilia TRPV: TRPV1 al TRPV4

La subfamilia de los TRPs vanilloides está constituida por 6 miembros que a su vez se pueden distinguir en dos subgrupos en función de su grado de homología, el primero incluiría los receptores TRPV1 al TRPV4 y el segundo subgrupo a TRPV5 y TRPV6 (Venkatachalam y Montell, 2007). Las proteínas de esta subfamilia presentan en común de 3 a 5 repeticiones de anquirinas en el dominio N-terminal y una caja TRP en el C-terminal (Montell, 2005a). Los receptores TRPV1-4 son polimodales, capaces de integrar diferentes estímulos químicos y se activan a temperaturas calientes por encima de los 25°C, como se muestra en la figura 3.1 (Ferrer-Montiel, 2009). El segundo grupo (TRPV5-6) no se activan por calor, y son los miembros con mayor selectividad a Ca^{2+} (con una probabilidad de entrada de Ca^{2+} relativa a la de Na^+ de $PCa:PCa > 100$) (Yue y col., 2001).

TRPV1, del que hablaremos en más detalle en el siguiente apartado, es posiblemente el termo-TRP del que mejor se conocen los mecanismos de activación, ya que está implicado en la aparición de hiperalgesia térmica y mecánica (Zhang y col., 2008). TRPV1 es un canal que se activa por una amplia gama de agonistas como los vanilloides, por pH ácido, por calor y por despolarización de la membrana (Tominaga y col., 1998; Voets y col., 2004; Zhu, 2007). La temperatura umbral de activación es $>43^{\circ}\text{C}$ aunque ésta puede disminuir por la acción de mediadores pro-inflamatorios. En general, estos mediadores pueden clasificarse entre los que actúan vía GPCRs activando PKA y/o PKC (Planells-Cases y col., 2005) y los que lo hacen a través de receptores de factores de crecimiento vía activación de tirosinas quinasas (TK) (Vay y col., 2012). La liberación de mediadores inflamatorios como las BK, PGs, serotonina, ATP, PG_2 y NGF (entre otros) promueven por un lado la potenciación de la actividad de TRPV1 incrementando la probabilidad de apertura por fosforilación del receptor y por otro lado la translocación de receptores desde reservorios intracelulares a la membrana plasmática (Camprubí-Robles y col., 2009). En muchos casos, la actividad de TRPV1 está ligada a los niveles de otras proteínas, como es el caso de NGF. De hecho, por ejemplo, se ha observado que en el

desarrollo de neuropatía diabética se reducen los niveles de expresión de NGF y TRPV1 (Facer y col., 2007). Por otro lado, varios estudios han demostrado que las regiones citoplasmáticas de TRPV1 pueden unir no solo agonistas sino moléculas reguladoras de su actividad como calmodulina (CaM), ATP, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2), así como algunas proteínas que desempeñan un importante papel regulando la actividad del canal (Kwak y col., 2000; Numazaki y col., 2003; Prescott y Julius, 2003). Como ejemplo, una disminución en las concentraciones de PIP_2 , que tiene lugar a partir de la producción de agentes proalgésicos como la BK y NGF, potencia las respuestas producidas como consecuencia de la aplicación del agonista capsaicina y disminuye el umbral de temperatura para la activación del canal (Chuang y col., 2001).

TRPV2, aparte de activarse por calor con umbrales de activación $>52^{\circ}\text{C}$, también lo hace por estímulos físicos como es el estrés osmótico (Caterina y col., 1999; Muraki y col., 2003) y químicos como el 2-aminoetoxi difeniborato (2-APB) (Hu y col., 2004) y el canabidiol (Qin y col., 2008). La PI3K promueve su actividad y regula su inserción en la membrana plasmática (Penna y col., 2006). Se ha observado que, al igual que ocurre con algunos termo-receptores, cuando se produce un daño en los nervios periféricos aumenta ligeramente la expresión de TRPV2 en las DRGs, lo que sugiere su importancia y contribución a los mecanismos de hipersensibilidad térmica y mecánica (Frederick y col., 2007) aunque sus posibles papeles fisiológico y patológico permanecen desconocidos.

TRPV3 también es un receptor polimodal que se activa a temperaturas moderadas con umbrales de $34\text{-}38^{\circ}\text{C}$ (Xu y col., 2002; Benham y col., 2003) y por diferentes compuestos que provocan en humanos una sensación cálida placentera, como el timol, el tomillo, el carvacrol (presente en el orégano) o el eugenol (presente en diversas especias como el clavo, nuez moscada, canela, etc) (Xu y col., 2006) (figura 3.1). La actividad de TRPV3 en células de la lengua y la piel se potencia significativamente por

fosfolipasa-C (PLC). *In vivo*, los ratones TRPV3 KO exhiben déficits en la percepción de sensación de calor inocuo y nocivo sugiriendo un importante papel en la percepción de estas cualidades (Moqrich y col., 2005; Mandadi y col., 2009).

TRPV4, además de activarse por temperatura, también lo hace por la hipotonicidad extracelular y por compuestos químicos como la anandamida (AEA) y el ácido araquidónico (Montell, 2005a). También se ha descrito el papel del canal TRPV4 y su implicación en la vasodilatación en respuesta a los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) (Earley, 2011). En procesos inflamatorios, TRPV4 actúa como transductor en los nociceptores de pequeños cambios en la osmolaridad, contribuyendo así a la manifestación del dolor (Alessandri-Haber y col., 2005). Al igual que TRPV1 (del que hablaremos más en detalle en el siguiente apartado), TRPV4 está directamente implicado con el desarrollo de neuropatías periféricas en pacientes de cáncer que reciben quimioterapia (Alessandri-Haber y col., 2004).

3.3. TRPV1. Importancia fisiológica y patológica y mecanismos asociados

A pesar de activarse *in vitro* a temperaturas superiores a 42°C, TRPV1 no parece jugar un importante papel fisiológico en la detección de estímulos calientes puesto que, utilizando una estrategia genética, se ha mostrado que los ratones TRPV1 KO responden de forma semejante a como lo hacen los animales silvestres a estímulos calientes dolorosos (Caterina y col., 2000; Davis y col., 2000). Sin embargo, es ampliamente aceptado que TRPV1 desempeña un papel crucial en la hiperalgesia térmica asociada el dolor inflamatorio en modelos de dolor en animales como es la respuesta al aceite de mostaza, a la carragenina o al adyuvante completo de Freund (CFA) o utilizando antagonistas específicos del receptor (Caterina y col., 2000; Davis y col., 2000; Caterina y Julius, 2001; García-Martínez y col., 2006; Messeguer y col., 2006). En cuanto a su papel en la hiperalgesia mecánica, TRPV1 parece estar involucrado en su desarrollo de esta modalidad de dolor, aunque tampoco esté directamente involucrado en la transducción de estímulos mecánicos (Davis y Perkins, 1996; Hua y col., 1997; Kwak y col., 1998; Caterina, 2003).

TRPV1 se comporta como un integrador molecular tanto de estímulos físicos como químicos, entre los que se encuentran varios componentes de la “sopa inflamatoria”, y modula la excitabilidad de los nociceptores. Se considera que una excesiva actividad de los receptores TRPV1, conseguida por un aumento de la actividad intrínseca del receptor así como por la mayor cantidad de receptores en la membrana, contribuyen de forma importante a la sensibilización periférica y en consecuencia a la hipersensibilidad térmica. Muchos estudios se han destinado a resolver la contribución de los distintos mediadores, las vías de señalización, dianas y mecanismos moleculares por los que se modula la actividad de TRPV1 y son objeto de recopilación en el siguiente apartado.

3.3.1. Mecanismos de activación y modulación de la actividad de TRPV1

TRPV1 se aisló mediante un método de expresión-clonación a partir de una genoteca de cDNA de DRGs de rata expresada en la línea celular HEK293 utilizando un ensayo basado en la detección de incrementos de Ca^{2+} intracelular en respuesta a un pulso del vanilloide capsaicina (Caterina y col., 1997). Desde este trabajo seminal, se ha demostrado que, además de activarse por capsaicina, TRPV1 lo hace en respuesta a pH ácido ($\text{pH} < 6$), a otras sustancias químicas exógenas como el vanilloide olvanil, la resiniferatoxina (RTX), por capsinoides o por alcanfor, por agonistas endógenos como la anandamida (AEA), N-oleoildopamina (OLDA), y por productos de la lipoxigenasa como el LTB4 (Clapham, 2003; Dhaka y col., 2006).

Numerosas sustancias se han descrito como antagonistas competitivos y no competitivos de TRPV1 (Messeguer y col., 2006). El más conocido de los antagonistas competitivos es la capsazepina (CPZ) cuya aplicación produce la inhibición de la activación de TRPV1 por capsaicina e incluso por RTX (Bevan y col., 1992). Dentro de los antagonistas no competitivos destaca el rojo de rutenio (RR) cuya acción provoca el bloqueo del poro en todos los receptores de la familia de los TRPs (Amann y Maggi, 1991).

En la actualidad, además existen numerosos antagonistas de TRPV1 que se han sintetizado químicamente (Messeguer y col., 2006) y otros que se han obtenido a partir de la modificación de agonistas como son 6-yodo-norhidrocapsaicina (Appendino y col., 2003) y el 5-yodo-RTX (Wahl y col., 2001).

Se puede inferir que los nociceptores pueden ser activados simultáneamente y sinérgicamente por varios estímulos nocivos térmicos y químicos a través de TRPV1 (Tominaga y col., 1998; Caterina y Julius, 2001; Clapham y col., 2001). Precisamente, temperaturas superiores a $42\text{-}43^\circ\text{C}$ al igual que $\text{pH} < 6$ son capaces de activar directamente el canal *in vitro*. Sin embargo, la acidificación del medio a pH ligeramente ácido sensibiliza el receptor a estímulos de capsaicina y disminuye el umbral de temperatura de 42°C a 37°C . Además, la activación de TRPV1 tiene una ligera dependencia del voltaje, que se mueve en el rango de voltajes no fisiológicos pero tras la unión de su agonista se desplaza a los voltajes fisiológicos (Nilius y col., 2005).

En la figura 3.2 se muestra un esquema de los diferentes estímulos que integra el receptor TRPV1 y que provocan su activación y el consiguiente flujo de Ca^{2+} al interior de la célula.

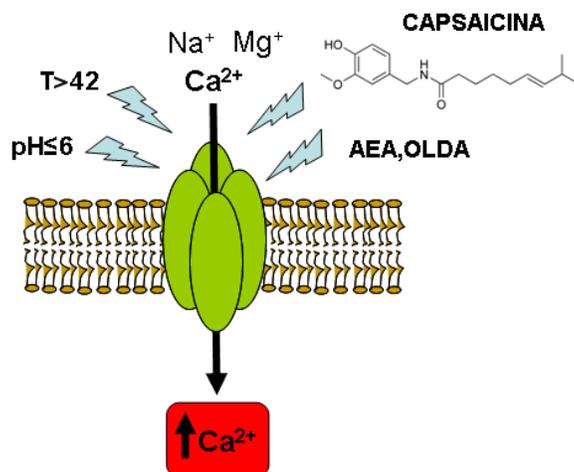


Figura 3.2: Representación esquemática del canal TRPV1 como un integrador térmico, físico y químico de estímulos nocivos. Diferentes estímulos como la temperatura superior a 42°C, el pH ácido (pH<6), compuestos químicos como capsaicina, AEA, OLDA, provocan la activación del canal lo que conlleva a la entrada de cationes (principalmente Ca^{2+}) al interior de la célula.

Potenciación de la actividad de TRPV1

Varios de los mediadores liberados durante una lesión o por inflamación aumentan la excitabilidad de los nociceptores mediante el incremento de la actividad de algunos receptores y canales entre los que se encuentra TRPV1. Este aumento de la actividad tiene lugar porque los nociceptores también expresan receptores específicos para esos mediadores pro-inflamatorios que, a su vez, activarán determinadas cascadas de señalización celular y alterarán la actividad de TRPV1 en forma de potenciación de la actividad. A corto plazo, la potenciación de TRPV1 ocurre por la fosforilación de algunos aminoácidos diana del receptor TRPV1, incrementando así la probabilidad de apertura del receptor (P_o) y modulando su tráfico a la membrana (Morenilla-Palao y col., 2004; Tominaga y Tominaga, 2005) (figura 3.2).

La fosforilación de TRPV1 por PKA, PKC, CaMKII modula desde la afinidad del receptor por los vanilloides, a la potenciación y/o la probabilidad de apertura del receptor. Por ejemplo, PGE_2 provoca la activación de la cascada de cAMP/PKA que previene la desensibilización de TRPV1 por fosforilación directa (Adcock, 2009). BK y SP activan la PLC que a su vez activa $\text{PKC}\epsilon$ que también fosforila el receptor TRPV1 aumentando la P_o del canal (Chuang y col., 2001). Igualmente, la fosforilación de TRPV1 por CaMKII también incrementa la P_o del canal (Jun y col., 2003). Importan- temente, existe un segundo mecanismo que facilita el aumento rápido de la actividad del receptor que consiste en el incremento del número de receptores en la membrana plasmática por translocación desde un reservorio intracelular (Morenilla-Palao y col., 2004; Zhang y col., 2005). Varios agentes como ATP, IGF-I y NGF pueden provocar la exocitosis regulada de receptores provocando de esta manera la sensibilización de los

3.3. TRPV1. Importancia fisiológica, patológica y mecanismos asociados

nociceptores (Camprubí-Robles y col., 2009).

Además de la sensibilización a corto plazo (en minutos) de los nociceptores por una modificación post-traducional (por fosforilación) o por exocitosis regulada, se puede producir una sensibilización a largo plazo, que puede durar varios días, por regulación post-transcripcional. Así, por ejemplo, NGF y GDNF pueden inducir la expresión de TRPV1 (y otros genes nociceptivos como SP, CGRP, BDNF, etc.) (Woolf y Costigan, 1999).

Las proteínas quinasas activadas por el mitógeno (MAPK) también participan en los mecanismos que producen hipersensibilidad al dolor. Por ejemplo, el estrés celular y la liberación de citoquinas van a provocar la activación de MAPK p38, mediada por NGF, que produce un aumento en la expresión de TRPV1 en las neuronas nociceptivas (Ji y col., 2002). Otra vía de sensibilización es la mediada por MAPK ERK, cuya activación está mediada por NGF y se produce tras una estimulación eléctrica y/o dañina que provoca la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula. Su activación produce cambios a largo plazo debidos al aumento en la regulación y expresión de genes como son BDNF y NK-1 (Obata y col., 2004).

Disminución de la actividad de TRPV1

Mientras que un aumento de la actividad de TRPV1 en la membrana plasmática se refleja en la aparición de hiperalgesia, una disminución de la actividad provoca el efecto contrario, es decir, hipoalgesia o incluso analgesia.

Al igual que sucede con otros receptores activados por ligando, la exposición prolongada de TRPV1 a su agonista capsaicina produce la desensibilización del mismo, siendo la magnitud de ésta dependiente de la concentración del agonista, del tiempo de exposición y del Ca^{2+} extracelular (Cholewinski y col., 1993; Koplas y col., 1997). Existen diferentes tipos de desensibilización. Cuando la aplicación del agonista se produce de manera prolongada se considera aguda y se caracteriza por una pérdida rápida de la activación del receptor. En cambio, cuando se produce la administración repetida, se produce la denominada taquifilaxia, caracterizada por la disminución progresiva de la respuesta (Mohapatra y Nau, 2003).

Numerosos trabajos relacionan la desensibilización del receptor como la consecuencia de la pérdida o degeneración de fibras nerviosas (tanto mielinizadas como no mielinizadas) debida al efecto de capsaicina de una manera dosis dependiente (Nagy y col., 1983; Cruz y col., 1997; Nolano y col., 1999; Szöke y col., 2002). Sin embargo, concentraciones bajas del agonista o exposiciones puntuales al agonista provocan la desensibilización del receptor (Mohapatra y Nau, 2003) y una exposición moderada también produce endocitosis y transporte del receptor a los lisosomas donde es degradado (Sanz-Salvador y col., 2012), lo que apoya la idea de que existen distintos niveles de intervención en la reducida actividad de TRPV1 en la membrana que van desde la actividad del canal, al transporte y hasta la neurodegeneración neuronal.

3.3.2. Características estructura-función de TRPV1

TRPV1 es una proteína integral de membrana de ~95 kDa que forma homotetrámeros, aunque también puede formar heterotetrámeros con TRPV2 y TRPV4 (Hellwig y col., 2005) y con TRPV3 (Benham y col., 2003). Las propiedades funcionales de los heterotetrámeros no difieren significativamente de aquellas de los homotetrámeros (Tominaga y Tominaga, 2005).

TRPV1 presenta al igual que los otros miembros de la familia de TRPs, una topología semejante a la de los canales de K^+ dependientes de voltaje. El dominio citosólico amino terminal de TRPV1 (Nt-TRPV1), que comprende los aminoácidos 1 al 414, presenta 3 dominios de anquirina (aminoácidos 200 a 354) que parecen jugar un papel clave en la tetramerización de las subunidades (Schindl y col., 2007) y a través de los cuales interacciona con proteínas citosólicas y del citoesqueleto (Sedgwick y Smerdon, 1999), lo que le permite formar complejos multiproteicos. También en este dominio se encuentran los sitios susceptibles a fosforilación por PKA (S116, S144 y T370), y defosforilación por calcineurina (T370) (Tominaga y Tominaga, 2005).

En el lazo citosólico entre TM2 y TM3 (aminoácidos 498 a 513) se encuentra uno de los lugares de unión de capsaicina (Jordt y Julius, 2002). Dicha región fue delimitada con el empleo de una serie de canales iónicos quiméricos que contenían fragmentos del receptor en aves (que son insensibles a capsaicina), en el contexto del receptor de rata que sí es sensible a capsaicina, y viceversa. Mediante el ensayo funcional en quimeras progresivamente más pequeñas se comprobó que mutaciones en el aminoácido Y511 eliminaban la capacidad de respuesta del receptor a RTX y capsaicina. Posteriores modelos con diferentes especies ampliaron dicha región a la zona comprendida entre los aminoácidos L547 e I550 (Gavva y col., 2004). También se encuentran los sitios susceptibles de fosforilación por PKC (S502), y CaMKII (S502) (Tominaga y Tominaga, 2005).

El dominio citosólico carboxilo terminal de TRPV1 (Ct-TRPV1) contiene la caja TRP entre los aminoácidos 684 al 721, una región importante para la asociación de las subunidades facilitando la oligomerización de subunidades alrededor del poro (García-Sanz y col., 2004). También en este dominio citosólico se halla la región que parece proporcionar susceptibilidad a temperatura. Para llegar a esta conclusión, en el grupo del Dr. Latorre se realizaron quimeras en las que intercambiaron el dominio C-term de TRPV1 con el de TRPM8 y observaron que la activación de esta quimera se producía a bajas temperaturas, mientras que la que tenía el esqueleto de TRPM8 con un fragmento de TRPV1 se activaba a temperaturas elevadas (Brauchi y col., 2006). Curiosamente, se ha descrito que la exposición a pequeñas concentraciones de agonista o cambios en el medio lipídico puede provocar cambios en el umbral de temperatura de activación en otros termo-receptores (Rohács y col., 2005; Morenilla-Palao y col., 2009), mecanismo que podría estar influenciado por cambios dinámicos en PIP_2 (Fujita y col., 2013), que también se une en este dominio (Prescott y Julius, 2003). Por último, también se han descrito en este dominio los lugares de unión a CaM (Numazaki y col., 2003), a tubulina (Goswami y col., 2007), los sitios de fosforilación por PKC (T704 y S800) y CamKII (T704) (Tominaga y Tominaga, 2005) e incluso un sitio de unión de vanilloides (E761) (Pingle y col., 2007).

3.3. TRPV1. Importancia fisiológica, patológica y mecanismos asociados

En conjunto, se desprende de estos hechos que ambos dominios citoplasmáticos de TRPV1, Nt-TRPV1 y Ct-TRPV1, intervienen en la interacción del receptor con otras proteínas (señalizadoras, de andamiaje y del citoesqueleto celular) u otros componentes, todos ellos necesarios para el correcto funcionamiento y la regulación de la función del receptor.

Dominio de membrana. Las características estructurales del poro determinan su secuencia de permeabilidad a cationes, que es la siguiente: $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^+ \approx K^+ \approx Cs^+$ (Caterina y col., 1997). Dentro del poro, existen varios aminoácidos cruciales que determinan la sensibilidad del pH, destacan E600 y E648. Situado entre el filtro de selectividad se encuentra T633, que es crítico para la activación del canal por pH ácido (figura 3.3). Otros aminoácidos también implicados en la selectividad son D646 e Y671 (García-Martínez y col., 2000).



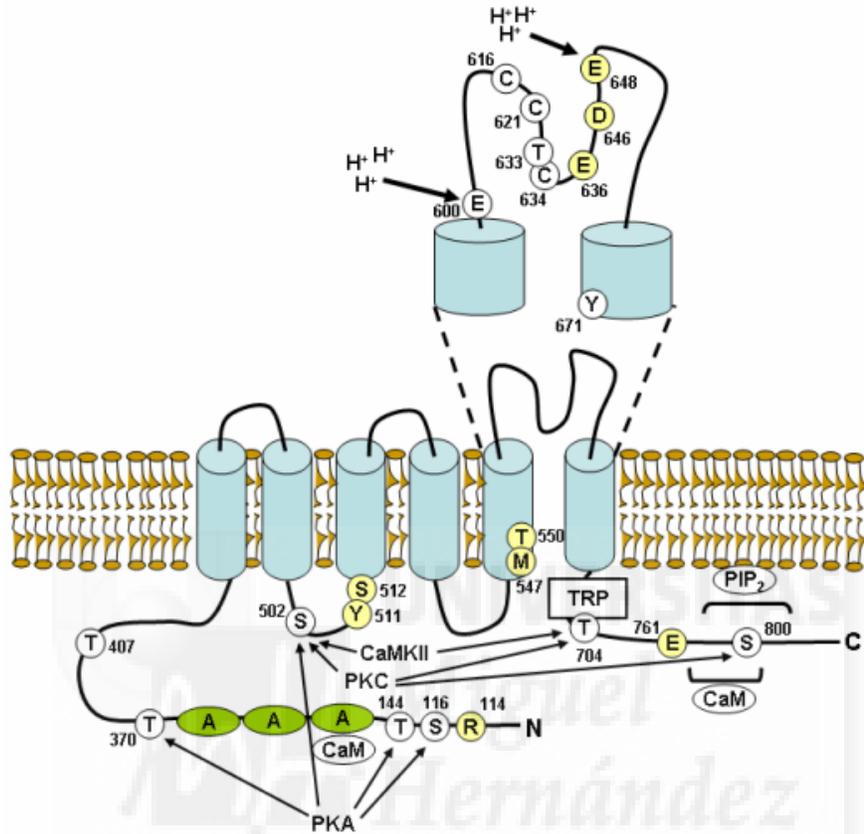


Figura 3.3: Modelo de la estructura de una subunidad del homotetrámero TRPV1 en la que se muestran los 6 dominios transmembrana, y los dominios intracelulares N-terminal y C-terminal. También están representados los residuos específicos de sensibilidad a capsaicina, para la activación por protones (E600 y E648), los residuos importantes para su fosforilación por proteína kinasas A y C (PKC Y PKA), Ca^{2+} calmodulina dependiente kinasa II (CaMKII), y la secuencia en el Ct-TRPV1 conservada en todos los canales TRP (caja TRP). Las letras indican los aminoácidos ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), arginina (R), metionina (M), serina (S), tirosina (Y) y treonina (T). Las letras en amarillo representan las zonas de unión de los compuestos vanilloides. La imagen ha sido modificada a partir de Tominaga y Tominaga (2005).

3.4. Importancia del signalplex como mecanismo primario de señalización

Los receptores neuronales no existen como entidades independientes sino formando parte de grandes complejos macromoleculares de proteínas que interaccionan, complejos que se denominan generalmente signalplex, o transducisoma. La composición de estos complejos puede ser muy dinámica en el espacio y en el tiempo. Así, acoplado o acercando físicamente los canales y/o receptores a elementos de señalización celular fun-

cionalmente conectados (receptores, transportadores, quinasas, proteínas de andamiaje, etc.) se logran unidades funcionales espacialmente restringidas que permiten un control ajustado y eficaz de algunos procesos como los que se enumeran a continuación: i) procesos de activación/inhibición de receptores, ii) transporte de/desde membrana y iii) localización específica en determinadas regiones de membrana (Montell, 2005b; Beresewicz, 2006).

De hecho, según se identifican nuevas proteínas que interaccionan o se profundiza más en el estudio de éstas, nos damos cuenta de que la función de los receptores se ve modificada por las interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, la activación de unos receptores puede influir en las propiedades de otros receptores (por ejemplo la activación de TRPA1 sobre la función de TRPV1 (Akopian y col., 2007)). Otros ejemplos más evidentes son los de la acción de fosfatasa y quinasas, aunque también debemos incluir proteínas de andamiaje o del citoesqueleto.

Existen dos complejos supramoleculares que se consideran en la actualidad los mejor caracterizados en sistemas neuronales que son: 1) el de los fotorreceptores en la mosca, con el receptor *trp* (el primer miembro aislado de la familia de receptores TRP), su homólogo TRPL, la proteína de andamiaje INAD y las proteínas de señalización rodopsina, PLC y PKC (figura 3.4) y 2) el del receptor NMDA con la proteína MAGUK (Guanilato quinasas asociadas a membrana) PSD-95 en sinapsis excitatorias.

3.4.1. Signalplex de *trp* en fotorreceptores de *Drosophila*

En el caso de *Drosophila*, el descubrimiento del Signalplex fue muy importante para el conocimiento de los mecanismos fundamentales para comprender la rápida activación de la cadena de fototransducción (figura 3.4).

El principal componente de este complejo macromolecular es INAD (del inglés, *inactivation no afterpotential D*), una proteína de anclaje compuesta por cinco dominios PDZ. Para la retención del canal TRP en los rabdómeros de los fotorreceptores es necesario que esté presente INAD (Montell, 2005b). En este complejo también se encuentra la PLC (denominada NORPA) y una PKC (denominada INAC). Estas tres proteínas están siempre expresadas en el complejo y dependen de INAD para su localización y la estabilidad de las proteínas. Aparte de éstas, también se pueden unir para formar el complejo multiproteico rodopsina (Rh1), miosina III, otro canal de tipo TRP que se denomina TRPL, calmodulina y la inmunofilina FKBP59 (Tsunoda y col., 1997; Montell, 2005b). La retención de estas proteínas en rabdómeros no depende de INAD sino de TRP que en este caso no tiene funciones de canal.

La idea principal de este complejo es que el acercamiento de las proteínas de señalización al receptor y al canal permitirá una respuesta rápida en respuesta a la luz. De hecho las mutaciones en el sitio de unión de PKC a INAD, alteran la velocidad de terminación de respuesta a la luz (Adamski y col., 1998; Wes y col., 1999) aunque este no sea el caso en el sitio de unión de TRP a INAD (Li y Montell, 2000). Alternativamente, la formación de estos complejos multiproteicos podría servir para compartimentalizar las quinasas con sus sustratos en un intento de lograr especificidad.

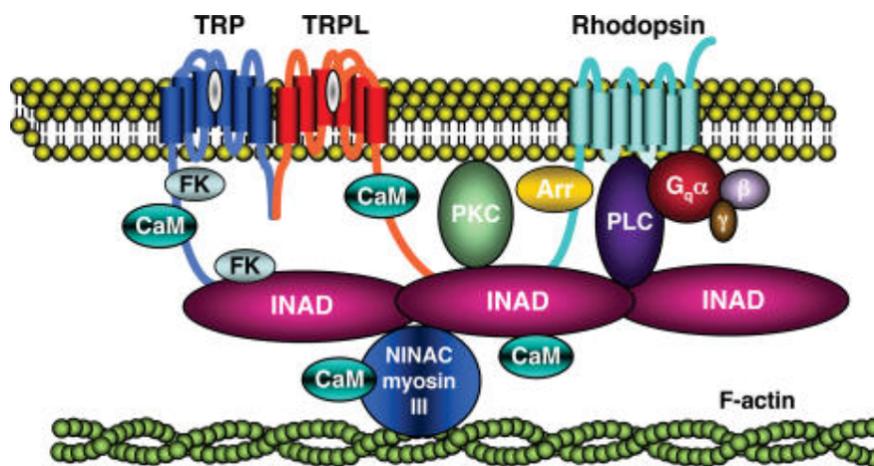


Figura 3.4: Las proteínas necesarias para que se produzca la fototransducción en *Drosophila* se encuentran asociadas en un complejo denominado signalplex de INAD. A la proteína de andamiaje INAD se van a unir las proteínas TRP, PLC (NORPA) y PKC (INAC) que a su vez van a favorecer la unión al complejo de rodopsina, calmodulina (CaM), miosina III, TRPL y FKBP59 (FK). La unión de todas estas proteínas constituye un macrocomplejo necesario para que *Drosophila* perciba y reaccione ante estímulos de luz. Imagen obtenida de Montell (2005b).

3.4.2. Signalplex del receptor de NMDA

Los receptores NMDA están implicados directamente en los procesos de plasticidad sináptica y memoria. Los mecanismos moleculares que permiten su localización post-sináptica y las vías de señalización que los activan han sido objeto de extenso estudio, y se ha llegado a la conclusión de que a través de sus dominios citosólicos son capaces de interactuar con proteínas de anclaje entre las que destacan PSD95, SAP-120, KIF17 y LIN10 (Niethammer y col., 1996; Cuthbert y col., 2007; Lau y Zukin, 2007).

La interacción del receptor NMDA con PSD95, que se produce a través del dominio C-terminal de NMDA con los primeros dominios PDZ de PSD95, promueve el agrupamiento del receptor y su expresión en las membranas sinápticas, su anclaje al citoesqueleto y el ensamblaje de complejos de transducción de señales en los lugares post-sinápticos (Husi y col., 2000; Roche y col., 2001). Además, tanto PSD95 como SAP-102, que actúan favoreciendo la unión de moléculas de señalización como nNOS o PKA y PKC a los receptores NMDA, regulan la función, el número de receptores en la zona de sinapsis y el ensamblaje de las subunidades. Precisamente, la potenciación de la actividad del canal debida a PKC se ve parcialmente reducida cuando PSD95 está presente (Sattler y col., 1999; Lin y col., 2006). Por su parte, SAP-102 se encuentra presente en las vesículas de transporte que llevan el receptor a la membrana y facilita tanto la inserción como la internalización del receptor en la membrana (Lau y Zukin, 2007). Por último, KIF17 junto con LIN10 forman un complejo que interviene en el transporte de las vesículas que contienen los receptores a las zonas de sinapsis (Hirokawa y Takemura, 2005).

3.4. Signalplex como mecanismo primario de señalización

Numerosas proteínas interactúan a su vez con el complejo PSD95-NMDA, como son la proteína asociada a guanilato quinasa (GKAP) y la proteína de andamiaje Shank. GKAP interactúa directamente con PSD95 y se encuentra ampliamente expresada en los lugares post-sinápticos donde forma parte del complejo PSD95/NMDA. Debido a su estructura, y dado que también está presente en otros complejos de interacción canal iónico/PSD95 como es el complejo Kv1.4/PSD95, también podría en este caso actuar como adaptador permitiendo la interacción de los acúmulos de PSD95/NMDA a otras proteínas (Kim y col., 1997). Por otro lado, Shank y cortactina interactúan también con NMDA/PSD95/GKAP: Shank se une al complejo a través del dominio C-terminal de GKAP, y cortactina, proteína implicada en la regulación de actina en las regiones dinámicas de las células como son los conos de crecimiento de las neuronas, se une a su vez a Shank. Los receptores de glutamato, efectores principales en la transmisión sináptica excitatoria, se conectan con la actina del citoesqueleto a través de estas proteínas (Naisbitt y col., 1999).





Capítulo 4

Proteínas que interaccionan con TRPV1 y posible papel sobre la función del receptor

Numerosas proteínas se han descrito hasta el día de hoy que son capaces de interaccionar con TRPV1. En la base de datos de la *Mammalian TRansient receptor potential channel-Interacting Protein* (TRIP) (<http://www.trpchannel.org/>) organizada por Shin y colaboradores de la Universidad de Corea, se recogen 76 proteínas obtenidas bien por cribados de doble-híbrido en levaduras (Y2H, del inglés *Yeast 2-Hybrid*) o bien por inmunopurificación y posterior análisis por espectrometría de masas. De esas 76 proteínas se ha validado la interacción de unas 40 proteínas, de éstas solamente se han caracterizado trece y han resultado en una consecuencia funcional sobre TRPV1 catorce proteínas (ver anexo I).

Como se ha mencionado en el anterior capítulo, la actividad de TRPV1 se puede alterar a corto plazo principalmente por la modificación post-traducciona l de la proteína o por cambios en el transporte de la proteína. De hecho, dentro del listado con el interactoma de TRPV1, uno puede inmediatamente localizar proteínas de señalización como son las quinasas PKC, PKA, PI3K, CaMKII, etc., que fosforilan los dominios citosólicos del receptor. Asimismo, se encuentran otros receptores de la familia TRP como TRPA1, TRPV2 y TRPV3, y receptores de otras familias como el receptor purinérgico P2X₃. En cultivos primarios de DRGs, se ha comprobado la interacción directa entre el receptor P2X₃ y TRPV1 que provoca una inhibición en el segundo receptor (Stanchev y col., 2009). Otros receptores que interaccionan con TRPV1 son el de de NGF, TrkA y el receptor de NMDA (Chuang y col., 2001; Lee y col., 2012). Además, se ha detectado la interacción con canales de K⁺ como son KCNQ2 y KCNQ3, dos canales que intervienen regulando negativamente la excitabilidad neuronal. Curiosamente, mientras que la interacción de TRPV1 con KCNQ2 y KCNQ3 no produce ningún efecto funcional aparente sobre TRPV1, la activación de TRPV1 induce cambios en la probabilidad de apertura, la disminución de la amplitud de las corrientes así como la insensibilidad a determinados agonistas de KCNQ2 y KCNQ3 (Zhang y col., 2011). En conjunto, la interacción de TRPV1 con KCNQ2 y KCNQ3 favorece la hiperexcitabilidad neuronal

en situaciones dolorosas.

Dentro del grupo de proteínas de andamiaje encontramos la proteína de anclaje a proteína quinasa A (AKAP), una proteína encargada de guiar a PKA, PKC y calcineurina a varios efectores, que tiene la capacidad de modular numerosos canales iónicos. Se ha demostrado que TRPV1 y AKAP79/150 forman complejos de señalización capaces de modular la sensibilización del receptor cuando se produce la liberación de mediadores inflamatorios (Zhang y col., 2008). Más recientemente se ha descrito que AKAP79/150 facilita la formación de un complejo de adenilil ciclasa (AC) con TRPV1, cuyo efecto último es eliminar la desensibilización del receptor producida por agonistas adrenérgicos, mediada a su vez por PGE₂ y PKA (Efendiev y col., 2013).

Entre las proteínas de transporte podemos encontrar arrestina-2, que estaría involucrada en la maquinaria de internalización del receptor por la vía de clatrina (Por y col., 2012). Además, tal como describió previamente nuestro grupo, TRPV1 interacciona con proteínas SNAREs (del inglés “*soluble NSF attachment receptor*”) que están implicadas en procesos de secreción, fusión de membrana y tráfico intracelular de proteínas. Específicamente, demostramos que TRPV1 interacciona con Sinaptotagmina IX (Syt IX) (Morenilla-Palao y col., 2004) y también con Snapin, que a su vez interacciona con SNAP25 modulando la interacción con Syt IX (Huang y col., 2002). El propósito de la interacción de TRPV1 con proteínas SNARE parece ser la rápida modulación en la cantidad de receptor expresado en la membrana plasmática mediante translocación de vesículas, por exocitosis regulada, que contienen TRPV1. La exocitosis por las proteínas SNARE estaría a su vez promovida por la activación de PKC (Morenilla-Palao y col., 2004). Posteriormente, describimos que en nociceptores esta movilización es dependiente de la actividad del receptor en respuesta a algunos, no todos, los componentes liberados de la “sopa inflamatoria” (Camprubí-Robles y col., 2009).

En el mismo cribado de Y2H, nuestro grupo identificó y aisló otra proteína que potencialmente interaccionaba con el receptor TRPV1: la Proteína Asociada al Receptor GABA_A (en inglés abreviada como GABARAP) (Laínez y col., 2010), en la que se ha centrado particularmente este trabajo.

4.1. Proteína Asociada al Receptor GABA_A (GABARAP)

En 1999, se describió por primera vez GABARAP utilizando como cebo la subunidad gamma $\gamma 2$ del receptor GABA_A (GABA_AR) en cribados de Y2H, (Wang y col., 1999). Dicha interacción se reprodujo posteriormente *in vitro* y *ex vivo* utilizando extractos de cerebro, y se confirmó que la unión era específica con la subunidad γ del receptor (Nymann-Andersen y col., 2002).

GABARAP es una proteína citosólica de 117 aminoácidos, que tiene un peso molecular de aproximadamente 16 kDa, y su secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada entre distintas especies (Wang y Olsen, 2000). La estructura cristalina de la proteína humana ha sido determinada con una resolución de 1.6 Å, resultando estar compuesta por dos dominios: un dominio C-terminal que comprende los aminoácidos 36

4.1. Proteína Asociada al Receptor GABA_A (GABARAP)

a 117 y es estructuralmente similar a ubiquitina, y un dominio N-terminal (aminoácidos del 1 al 36). Presumiblemente, GABARAP existe en dos conformaciones: una forma monomérica, presente cuando la proteína se encuentra a bajas concentraciones tanto de proteína como de sales y en la que no se hallaría asociada a otras proteínas, y otra forma oligomérica estabilizada con altas concentraciones de sales. En estas últimas condiciones, el dominio hidrofóbico de la proteína estaría más expuesto y la proteína sería capaz de interactuar con otras proteínas, como por ejemplo tubulina (Coyle y col., 2002).

El dominio N-terminal de GABARAP está altamente cargado, con cargas positivas, y contiene una secuencia similar a la cadena ligera de MAP1A y MAP1B, dos proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). De los 36 aminoácidos correspondientes al N-terminal de GABARAP, sólo 22 son necesarios para la unión a tubulina (Wang y Olsen, 2000). La unión de GABARAP con tubulina se debe a interacciones iónicas ya que concentraciones salinas altas (400 mM) la inhiben. Hasta ahora no se ha observado una interacción directa entre GABARAP y actina (Wang y Olsen, 2000).

GABARAP se encuentra mayoritariamente en compartimentos intracelulares como son el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y cisternas post-sinápticas (Kittler y col., 2001). Curiosamente, GABARAP es homólogo a la proteína p16 (posteriormente denominada GATE-16, de Estimuladora de ATPasa asociada a Golgi), descrita como un factor esencial de transporte de proteínas en la red intra-Golgi (Legesse-Miller y col., 1998).

A nivel funcional, GABARAP parece promover el agrupamiento de GABA_AR y su tráfico a la membrana (Chen y col., 2000). La coexpresión de GABARAP resulta en una menor afinidad de GABA_AR por su agonista GABA y una menor desensibilización del receptor, lo que se traduce en una rápida desactivación a concentraciones altas, y una lenta desensibilización a concentraciones bajas de GABA (Chen y col., 2000). GABARAP se considera que está involucrada en el transporte de receptores GABA_AR en ciertas condiciones, aunque no está implicada en el anclaje directo del receptor a la membrana, puesto que este papel lo desempeña gefirina (Kneussel y col., 2000), que forma superestructuras oligoméricas debajo de las zonas de sinapsis (Tretter y col., 2012). Tal como muestra el modelo ilustrado en la figura 4.1, GABARAP estaría implicada en el transporte de gefirina y los receptores GABA_A a la membrana plasmática, ya que estas tres proteínas se encuentran asociadas en vesículas intracelulares. La disminución en la afinidad del receptor a GABA se explicaría por la propia asociación de GABA_AR al citoesqueleto y a los acúmulos que se forman en la membrana del complejo GABA_AR/Gefirina/GABARAP/tubulina (Kennedy, 2000).

4. PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON TRPV1

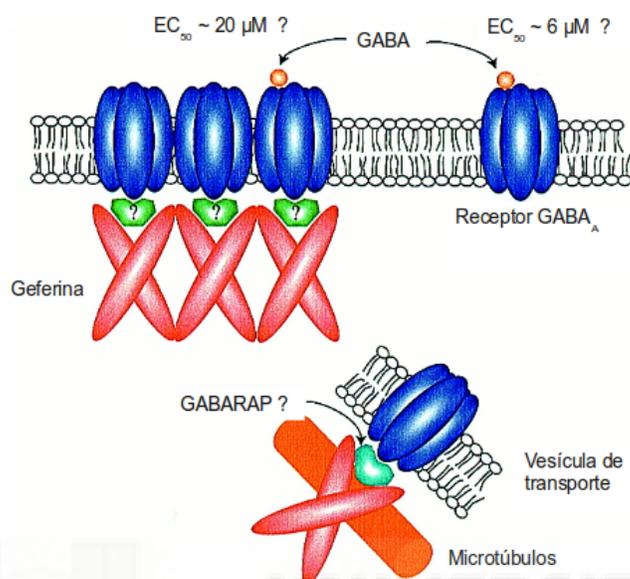


Figura 4.1: La unión entre el receptor *GABA_A*, gefirina, GABARAP y tubulina es necesaria para el agrupamiento del receptor en la membrana plasmática en las zonas de sinapsis. La interacción entre GABARAP y el receptor *GABA_A* produce un aumento en la expresión del receptor en la membrana y promueve la aparición de acúmulos del mismo, lo que produce una disminución en su afinidad a GABA. La presencia de gefirina es necesaria para que se produzca el anclaje del receptor en la membrana. Imagen obtenida de Kennedy (2000).

Aparte de las proteínas mencionadas anteriormente, diferentes trabajos demuestran la interacción de GABARAP con otras proteínas, como son NSF (Kittler y col., 2001), los receptores de transferrina (Coyle y Nikolov, 2003), p130 (Kanematsu y col., 2002) y los receptores de angiotensina II tipo 1A (*AT₁R*) (Cook y col., 2008). En todos estos casos, GABARAP está implicada en su transporte. En el caso de los receptores *AT₁R*, por ejemplo, péptidos capaces de penetrar en la célula cuyas secuencias representan regiones del dominio citoplasmático relacionados con la unión a GABARAP han permitido bloquear la interacción *AT₁R*/GABARAP, resultando en una reducción intracelular de *AT₁R* y menor tráfico a la membrana plasmática (Vitko y col., 2011).

GABARAP presenta una elevada homología de su secuencia con proteínas que también están relacionadas con el tráfico de receptores u otras proteínas a la membrana plasmática o entre compartimentos intracelulares, a través de su interacción con el citoesqueleto. Por ejemplo, presenta gran similitud a GEC-1 (cuya similitud es del 87%) (Mansuy y col., 2004), GABARAPL3 y GABARAPL4 (Bavro y col., 2002). Por otro lado, su secuencia se asemeja a la de GATE-16 (Tanida y col., 2003; Schwarten y col., 2009) por lo que se ha sugerido que GABARAP podría estar implicada en otras funciones como la autofagia, sin embargo, en este trabajo no se incidirá en este posible aspecto de su función.

4.2. Tubulina

Tubulina pertenece a una familia de proteínas de aproximadamente 55 kDa formada principalmente por las tubulinas α , β y γ , siendo el heterodímero $\alpha\beta$ la subunidad estructural de los microtúbulos (Nogales y col., 1998). El dominio C-terminal de tubulina está cargado negativamente y está muy expuesto, lo que le confiere la propiedad de interactuar fácilmente con muchas proteínas (Goswami y col., 2007).

En 2004, Goswami y colaboradores describieron la interacción de TRPV1 y tubulina a través del dominio C-terminal del receptor. Específicamente, puntualizaron que la unión a α -tubulina era dependiente de Ca^{2+} extracelular mientras que la unión a β -tubulina era independiente de la presencia del catión (Goswami y col., 2004). Posteriormente observaron que en las células transfectadas con TRPV1 se producía un aumento en la acumulación de tubulina en regiones de membrana y en el MTOC (Centro Organizador de Microtúbulos) (Goswami y col., 2006). En un trabajo posterior curiosamente observaron que la activación del receptor provocaba una desestabilización de los microtúbulos y la aparición de varicosidades a lo largo de las neuritas, con la posterior inhibición de la extensión y movilidad neuronal (Goswami y Hucho, 2007), lo que atribuyeron al desensamblaje de los microtúbulos (Goswami y col., 2006).

La unión de TRPV1 a tubulina se ha acotado a dos regiones básicas del dominio C-terminal de TRPV1, entre los aminoácidos 710-730 y 770-797 (Goswami y col., 2007). Aunque existen pequeñas diferencias de secuencia entre especies, la distribución de los residuos cargados positivamente está altamente conservada (Sardar y col., 2012). Los dos sitios descritos de unión de tubulina al dominio C-terminal de TRPV1 se encuentran muy cerca de regiones funcionalmente muy importantes para el receptor como son el dominio de tetramerización, los lugares de fosforilación de CamKII (S702) y PKC ϵ (S800), los sitios de unión de PIP $_2$ (aminoácidos 778 a 819) y calmodulina, y uno de los sitios de activación requerido por RTX y capsaicina (761) (figura 4.2). Que los sitios de unión a tubulina se encuentren tan cerca de regiones que son muy importantes para las diferentes funciones del receptor podría provocar la alteración de dichas propiedades cuando ambas proteínas interactúan. Así, por ejemplo, la fosforilación de S800, que produce una potenciación de la respuesta de TRPV1, también reduce un 22% la unión de tubulina al receptor. Además, se ha observado que la fosforilación de S800 es también necesaria para la desestabilización de microtúbulos por estrógenos (Goswami y col., 2011). En conjunto, estos datos reflejan que el dominio C-terminal de TRPV1 tiene un efecto estabilizador sobre los microtúbulos (Goswami y col., 2006).

4. PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON TRPV1

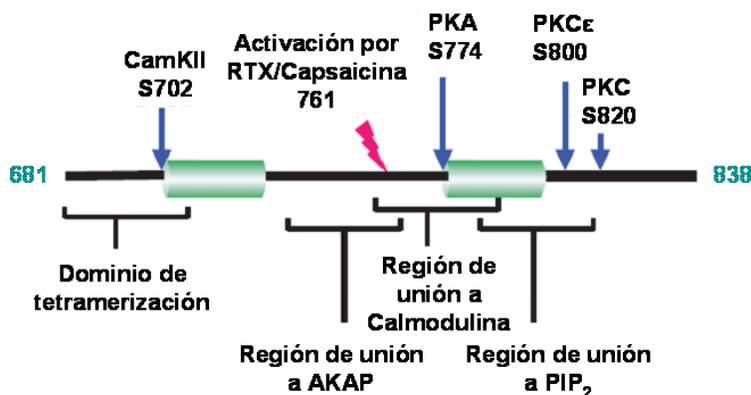


Figura 4.2: El dominio C-terminal de TRPV1 contiene estructuralmente y funcionalmente residuos y regiones importantes para el correcto funcionamiento del receptor. Las flechas indican los diferentes residuos de fosforilación de CamKII (S702), PKA (S774), PKC ϵ (S800), PKC (S820) y los corchetes los dominios importantes. Los números en verde representan la longitud en aminoácidos de toda la región, las áreas verdes representan las regiones de unión de tubulina. El símbolo rosa indica el lugar de activación de resiniferatoxina y capsaicina (761) (Goswami y col., 2011).

En el trabajo que aquí se presenta abordaremos la caracterización *in vivo* y *ex vivo* entre TRPV1 y GABARAP, así como la repercusión funcional que tal interacción podría tener sobre la función del receptor. Para ello se utilizarán sistemas de expresión heteróloga y cultivos primarios de neuronas de DRGs, y extractos proteicos bacterianos y de cerebro. Dado que tubulina interacciona tanto con TRPV1 como con GABARAP, también nos proponemos dilucidar el papel que ejerce esta proteína del citoesqueleto en la posible asociación de GABARAP a TRPV1, para lo que emplearemos el agente citostático taxol.

Objetivos





Debido a la implicación e importancia de TRPV1 en la regulación de numerosos procesos fisiológicos del organismo, la finalidad de este proyecto de tesis doctoral ha sido el estudio de la interacción entre TRPV1 y GABARAP. Proponemos inicialmente verificar utilizando diferentes aproximaciones experimentales la interacción de ambas proteínas TRPV1 y GABARAP, y determinar los dominios proteicos involucrados en dicha asociación. Una vez confirmados se pretende abordar las consecuencias funcionales sobre el receptor de dicha unión, si los hubiere, así como la influencia de su asociación a citoesqueleto, empleando el agente estabilizador de la dinámica de microtúbulos, el citostático taxol, sobre la expresión y función del receptor.

Específicamente, los objetivos se desglosan en las siguientes etapas:

1. Confirmar la interacción de TRPV1 y GABARAP y determinar la unión de los dominios entre ambas proteínas. Para ello, se realizarán ensayos de arrastre de proteínas y de FRET para corroborar dicha unión y para esclarecer la posible implicación de los distintos dominios citosólicos para asociarse a la otra proteína.
2. Estudiar si la interacción de GABARAP provoca alteraciones en la función y la distribución del receptor. Para ello, estudiaremos la expresión del receptor en la membrana cuando es co-expresado junto a GABARAP y evaluaremos si resulta en alteraciones en el transporte y en la activación del receptor en respuesta a diferentes estímulos.
3. Investigar la naturaleza de los acúmulos de TRPV1 en la membrana consecuencia de la co-expresión con GABARAP. Se evaluará la estabilidad y las características funcionales de TRPV1 tras la potencial intervención farmacológica sobre estos acúmulos de membrana.
4. Evaluar los cambios de expresión de TRPV1 y funcionales asociados al tratamiento agudo con el citostático taxol para proponer un mecanismo adicional responsable de la hiperalgesia asociada a algunos citostáticos.



Material y Métodos





Capítulo 5

Materiales y Métodos

5.1. Modelos celulares utilizados

5.1.1. Líneas celulares procariotas

5.1.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas pertenecen a la especie *Escherichia coli* y se describen en tabla 5.1.

Tabla 5.1: Tabla resumen de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo donde se indica el nombre, genotipo y el uso dado para cada una de ellas.

Nombre cepa	Genotipo	Uso
Bl-21	F- dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal [malB+]K-12(λ S)	Expresión de proteínas
C41	F- ompT gal dcm hsdSB(rB- mB-) (DE3)	Expresión de proteínas
DB3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xy15 Δ leu mtl1	Propagación de plásmido que contienen el operón ccdB
Xl-Blue	endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'	Propagación de plásmidos para la obtención de ADN

5.1.1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados de forma habitual para el crecimiento bacteriano se detallan a continuación (tabla 5.2).

Tabla 5.2: Tabla resumen de la composición de los medios utilizados para crecer las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo donde se indica el nombre, la composición y el uso general para cada uno de ellos.

Nombre cepa	Genotipo	Uso
LB	10 g/l NaCl, 10g/l triptona y 5 g/l de extracto de levadura en agua destilada. pH 7.4 con NaOH	Crecimiento de bacteria para la obtención de ADN
2xYT	5 g/l NaCl, 16 g/l tristona, 10 g/l de extracto de levadura en agua destilada. pH 7 con NaOH	Crecimiento de bacterias para expresión de proteínas

5.1.2. Modelos celulares eucariotas

5.1.2.1. Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares que fueron:

- HEK293, del inglés *Human embryonic kidney* ATCC CRL-1573. Proceden de células renales embrionarias humanas (Graham y col., 1977).
- F11, ATCC HB-11761. Proceden de la fusión de neuroblastoma de ratón de la línea N18TG-2 y neuronas de los ganglios dorsales de la médula de ratas embrionarias (Fan y col., 1992).
- SH-SY5Y, ATCC CRL-2266, es una línea celular procedente de neuroblastoma humano (Biedler y col., 1978).

5.1.2.2. Medios de cultivo, procedimiento general

- Células HEK293, crecieron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) de Gibco, 2 mM de L-glutamina de Gibco, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (P/S) de Gibco.
- Células F11. Cedidas por el laboratorio del Dr. Tim Hucho (Departamento de Genética Molecular Humana. Instituto Max Planck, Berlín, Alemania), crecieron en medio F-12 HAM'S (Sigma-Aldrich) suplementado con 20 % FBS, 1 % L-glutamina, 1 % P/S y 1 % suplemento HAT (Sigma-Aldrich).
- Células SH-SY5Y. Se cultivaron en medio 1:1 (v/v) DMEM: F-12 HAM'S, 15 % FBS, 1 % P/S y 1 % L-Glutamina.

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C y 5 % CO₂ en incubadores HEPA CLASS 100 (Thermo Electron corporation). Para expandirlas se utilizó tripsina-EDTA al 0.25 % durante 1 min a 37 °C.

5.1.3. Aislamiento y cultivo primario de los ganglios raquídeos (DRG) de rata neonatales o adultas

Para la obtención de las DRGs se emplearon ratas neonatales (de 1-3 días), o adultas (cepa Wistar) que fueron sacrificadas mediante decapitación o asfixiadas con CO₂ respectivamente. Para la extracción, primeramente se aisló la médula espinal y posteriormente se extrajeron todas las DRG posibles (aproximadamente 35 de cada animal) que fueron inmediatamente transferidas a 2 ml de solución salina (PBS). Los troncos neuronales y el tejido conectivo fueron eliminados y las DRG se transfirieron a 1 ml de medio DMEM suplementado con 0.25 % de colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich), durante 1 h en un incubador humidificado (a 37 °C, 5 % CO₂). Transcurrido dicho tiempo, los ganglios se lavaron dos veces con 10 ml de medio A (DMEM conteniendo 10 % FBS al, 1 % P/S 1 % L-glutamina) y se resuspendieron en 2 ml de medio A. Mediante una disgregación mecánica con pipetas pasteur de diferentes grosores se obtuvo finalmente una mejor suspensión celular.

A continuación, se realizó una última centrifugación a 1000 rpm durante 5 min y el pellet resultante se resuspendió en 1-1.5 mL de medio B (Medio A suplementado con 50 ng/mL NGF (Promega) y 1.25 µg/mL citosina arabinosido (Sigma-Aldrich)). Una vez aisladas las DRGs, se sembraron en cubreobjetos redondos de vidrio (de 25 mm de diámetro, grosor 0, Knittel gläser) previamente pre-tratados con poli-L-ornitina 10 µg/ml (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37 °C, y posteriormente con laminina (Sigma-Aldrich) durante toda la noche. Todos los experimentos se realizaron en cultivos mantenidos 3 días *in vitro*.

5.2. Métodos de Biología Molecular

Los métodos básicos de manipulación de ADN utilizados en el presente trabajo son convencionales y se realizaron según se describen en los manuales clásicos de biología molecular (Sambrook y col., 1989).

5.2.1. Clonación de TRPV1 en diversos vectores

El ADNc del receptor TRPV1 silvestre (TRPV1wt) de rata fue cedido por el Dr. David Julius (Departamento de Fisiología, Universidad de California San Francisco, Estados Unidos).

5.2.1.1. Generación del plásmido de expresión de YFP-TRPV1/pCINeo para expresión en líneas celulares de mamífero

Con objeto de poder controlar fácilmente la expresión y la localización subcelular del receptor, decidimos construir una proteína de fusión conteniendo la proteína fluorescente amarilla YFP ubicada en el extremo N-terminal de TRPV1. Para ello, se clonó TRPV1wt entre los lugares de restricción Hind III (5') y Sal I (3') del plásmido pEYFP-C1 (Clontech) incorporando estos sitios de restricción mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y utilizando los oligonucleótidos y el ciclo de PCR que se describen a continuación (tabla 5.3).

Tabla 5.3: Oligonucleótidos utilizados para clonar TRPV1 silvestre en el plásmido pEYFP-C1 en dirección 5'-3'. La columna de la derecha representa el ciclo de PCR que se utilizó para amplificar el ADN.

Nombre primer	Secuencia (5' a 3')	
H3TRPV1	CTCAAGGCTTCGATGGAACAACGGGCTAGCTTA	92° 30"
		92° 10"
		37° 30"
		68° 2'
SalTRPV1	ACCGTCGACTTATTTCTCCCCTGGGACCAT	92° 30"
		50° 30'
		68° 2'

Para la realización de las PCR se utilizó siempre un termociclador “Mastercycler” (Eppendorf, Alemania). Las condiciones de cada PCR se adaptaron a las necesidades de molde y cebadores, y se describen en las tablas que muestran dichos experimentos. La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos en cada amplificación fue calculada y adaptada empíricamente.

5.2.1.2. Generación de los plásmidos de expresión de YFP-TRPV1/pTREHyg y TRPV1/pTREHyg para expresión inducible por doxiciclina en líneas celulares de mamífero

Para facilitar el proceso de clonación, en algunos casos decidimos utilizar el sistema *Gateway*TM (Invitrogen) que se basa en el uso de la integrasa lambda para recombinar la secuencia codificante de interés flanqueada por sitios de recombinación *attL1* y *attL2* con los sitios *attR1* y *attR2* del vector de destino de interés (figura 5.1). Como resultado de esta recombinación se produce un intercambio de la secuencia codificante de interés junto con un casete conteniendo el gen *ccdB*, citotóxico, en el vector de destino. Las bacterias recombinantes pueden ser por tanto seleccionadas positivamente por su resistencia a ampicilina y negativamente por pérdida del gen *ccdB*.

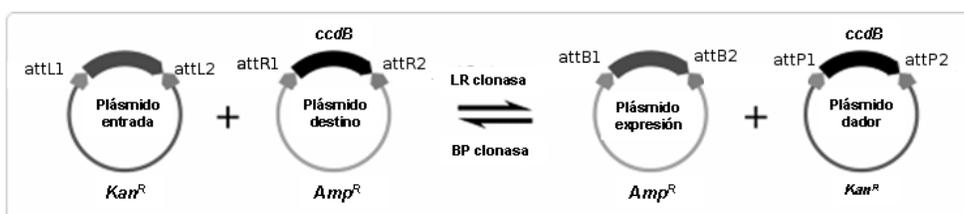


Figura 5.1: Esquema resumen de la reacción LR clonasa. Mediante el intercambio de los fragmentos comprendidos entre las regiones *attL1* y *attL2* del plásmido de entrada y *attR1* y *attR2* del plásmido de destino se obtiene el gen de interés clonado en el plásmido de expresión correspondiente.

En este sistema se emplea una construcción de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen), un vector lineal que contiene la secuencia GTGG compatible con una secuencia insertada en el producto de PCR y que se utiliza como lanzadera durante la posteri-

or recombinación. En nuestro caso particular, TRPV1wt e YFP-TRPV1 se clonaron en pENTR/D-TOPO, con los oligonucleótidos TopoTRPV1+ y pENT-YFPTRPV1+ utilizando el programa que se describe en la tabla 5.4.

Tabla 5.4: Oligonucleótidos utilizados para clonar los ADNc de TRPV1 silvestre e YFP-TRPV1 en el plásmido de entrada del sistema Gateway, pENTR/D-TOPO, en dirección 5'-3'. La columna de la derecha representa el ciclo de PCR que se utilizó para amplificar el ADN.

Nombre primer	Secuencia (5' a 3')	
TopoTRPV1+	CACCATGGAACAACGGGCTAGCTTAGACT	92° 2'
		92° 10"
		74° 30'
pENT-YFPTRPV1+	CACCCTACCGGTCGCCACCATGGTG	68° 2'
		92° 10"
TRPV1-	TTATTTCTCCCCTGGGACCATGGAATC	74° 30"
		92° 2'

5.2.1.3. Transformación del plásmido pTRE-2hyg en plásmido de destino

En el siguiente paso, modificamos el plásmido pTRE2hyg (Clontech) en plásmido de destino para utilizarlo en el sistema *Gateway*TM, que denominamos pTRE2hyg-DEST, añadiendo para ello la secuencia attR1-ccdB-CmR-attR2 contenida en todos los plásmidos de destino, en el que CmR es el gen de resistencia a cloranfenicol. La secuencia de attR1-ccdB-CmR-attR2 se amplificó por PCR mediante primers que insertaban en ambos extremos las secuencias de las enzimas de restricción Mlu I y Eco RV flanqueando ambos extremos. Los oligos y el ciclo de PCR utilizados para amplificar dicha región mediante PCR se describen en la tabla 5.5.

Tabla 5.5: Oligonucleótidos (5'-3') utilizados para amplificar por PCR la región attR1-ccdB-CmR-attR2 del plásmido de destino pT-REX-DEST-31.

Nombre primer	Secuencia (5' a 3')	
Mlu-attR1+	AGAATCACGCGTACAAGTTTGTACAAA	92° 2'
		92° 30"
		33° 30"
		68° 2'
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	92° 30"
		48° 30"
		68° 2'

El segmento amplificado por PCR se insertó en pTRE2hyg y los clones resultantes se analizaron inicialmente por los patrones de digestión y posteriormente se secuenciaron. Se recombinó pTRE2hyg-DEST con TRPV1wt en pENTR/D-TOPO y con YFP-TRPV1 en pENTR/D-TOPO con lo que obtuvimos los plásmidos de destino adecuados para realizar las líneas celulares doblemente estables e inducibles.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1.4. Generación de los plásmidos de expresión GST-NtTRPV1 y GST-CtTRPV1 para expresión en procariontas

El plásmido para expresión en bacterias del dominio Ct-TRPV1 fusionado a GST, GST-CtTRPV1, fue cedido por el Dr. Antonio Ferrer Montiel (Universidad Miguel Hernández de Elche). El dominio Nt-TRPV1 se clonó en el plásmido pGEX-4Ti (GE Healthcare). Para ello, se amplificó por PCR introduciendo las secuencias de las enzimas de restricción BamHI y EcoRI en los extremos 5' y 3', respectivamente. Los oligonucleótidos y el programa de ciclos de PCR utilizados para amplificar dicha región se describen en la tabla 5.6.

Tabla 5.6: Oligonucleótidos (5'-3') utilizados para amplificar por PCR el dominio Nt-TRPV1 e introducir en sus extremos las secuencias de las enzimas de restricción BamHI y XhoI.

Nombre primer	Secuencia (5' a 3')	
BamHITRPV1+	ATTATAGAATTCTAATGGAACAACGGGCTAGCTTAGACT	92° 2'
		92° 10"
		37° 30"
		68° 2'
EcoRINtTRPV1	CTTAAGATTACTGGACGTGGCCAGGAAGACCGAC	92° 30"
		50° 30"
		68° 2'

5.2.2. Clonación de GABARAP en diversos vectores

5.2.2.1. Clonación de GABARAP y los fragmentos amino y carboxi terminal para expresión como proteínas de fusión a GST en procariontas

Los oligonucleótidos y el ciclo de PCR utilizados para clonar GABARAP y sus fragmentos N-terminal (aminoácidos 1 a 36) y C-terminal (aminoácidos 37 a 112) en el plásmido de expresión en procariontas pGEX-4Ti se describen en la tabla 5.7. Mediante PCR se amplificaron las secuencias de las regiones de interés y se añadieron a sus extremos las secuencias de las enzimas de restricción BamHI y XhoI, respectivamente.

Tabla 5.7: Oligonucleótidos (5'-3') utilizados para amplificar por PCR GABARAP y sus dominio N-term ($\Delta 37-112$) y C-term ($\Delta 1-36$) e introducir en sus extremos las secuencias de las enzimas de restricción BamHI y XhoI.

Nombre primer	Secuencia (5' a 3')	
GABA+	CCTGTCCAGCCCGGATCCCGGAGG	92° 30"
GSTGABARAP-	CCGCTCGAGTCACAGACCGTAGACACT	50° 30"
		68° 2'
GSTGABARAP	CGTTAAGGATCCAGGATGAAGTTC	92° 10"
37-112GGABREV	AAACTCGAGTCAAGCCTTTTCT ACTATCACCGGCAC	37° 30"
		68° 2'
1-36GGABFOR	CGTGGATCCATGGCTCGGATAGGAGACCTG	92° 2'

5.2.2.2. Clonación de GABARAP para expresión como proteínas de fusión a CFP e YFP en líneas celulares de mamífero

Con el objeto de controlar la expresión y la localización celular de la proteína de andamiaje, decidimos construir una proteína de fusión de GABARAP con la proteína fluorescente azul CFP y otra con la proteína fluorescente amarilla YFP ambas en su extremo N-terminal. Para ello se clonó GABARAP entre los lugares de restricción HindIII y BamHI de los plásmidos de restricción pECFP-C1 y pEYFP-C1 (Clontech) mediante PCR y utilizando los oligonucleótidos que se describen a continuación (tabla 5.8). Estas clonaciones fueron realizadas por Mari Carmen Lidón.

Tabla 5.8: Oligonucleótidos (5'-3') utilizados para amplificar por PCR el dominio Nt-TRPV1 e introducir en sus extremos las secuencias de las enzimas de restricción BamHI y XhoI.

Nombre primer	Secuencia (5' a 3')	94° 2'	}x35
HindIII-GABARAP+	GTGCAAGCTTGGATGAAGTTCGTG	94° 30"	
		45° 30"	
BamHI-GABARAP-	GCAGGATCCTAGACCGTAGACT	72° 2'	
		92° 2'	

5.2.3. Extracción de ADN genómico y amplificación por PCR

El pellet celular se resuspendió en 500 μ l de tampón de lisado (en mM: 50 Tris pH 8, 100 EDTA, 100 NaCl y 1 % SDS más 0.4 mg/ml de Proteína K), y se incubó toda la noche a 55 °C. Al día siguiente se extrajo con 500 μ l de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1) durante 30-60 min, y posteriormente se precipitó con isopropanol. El resultante se resuspendió en 200 μ l de TE (10 mM Tris pH 8.0 con HCl, 1 mM EDTA). La presencia de TRPV1 se determinó por PCR.

5.3. Transfección e infección de líneas celulares y DRGs

5.3.1. Transfección de líneas celulares y DRGs

Para expresión de las distintas proteínas en líneas celulares, las células se sembraron y se dejaron crecer en monocapa hasta alcanzar una confluencia del 85 % aproximadamente. A continuación se transfectaron transitoriamente empleando Lipofectamine 2000 (LF2000, Invitrogen) o JetPei (PolyPlus) siguiendo las recomendaciones del fabricante (proporción 1:2 μ g DNA: μ l de lipofectamina o solución de JetPei). Pasadas 4h de la transfección con LF2000, se cambió el medio de cultivo y se esperó 48h antes de comenzar el ensayo. Siempre se emplearon en la realización de los experimentos, pases celulares inferiores a 20.

Para la transfección en DRGs, una hora antes de comenzar la transfección el medio de los pocillos fue retirado (se guardó para su posterior uso) y se reemplazó por medio MEM. Para cada pocillo se utilizaron entre 2-3 μ g de ADN en 35 μ l de agua, a lo que se le añadió 5 μ l de 2,5M $CaCl_2$. Mientras se burbujeaba la mezcla, se añadieron gota

a gota 40 μ l de 2X HBS (150 mM NaCl y 20 mM HEPES) a pH 7. Posteriormente se incubó a oscuras durante 25 min y se añadió al cultivo, se incubó a 37 °C durante 45-75 min, y se realizaron dos lavados con medio completo. Finalmente se añadió el medio que se había retirado al inicio. Los ensayos se realizaron transcurridas 48 horas.

5.3.2. Pruebas de infección con el virus adenoasociado que expresa YFP-TRPV1

El stock de adenoasociado tenía una titulación de $9,3 \times 10^9$ unidades de infección (UI)/ml. Células SH-SY5Y se infectaron cuando se encontraban a un confluencia de un 80 % aproximadamente con 250 y 500 MOI más polibreno a una concentración final de 1 μ g/ml. Las mejores condiciones de expresión se obtuvieron al cabo de 72 h con 250 MOI.

5.4. Generación de las líneas celulares HEK293 y F11 doblemente estables e inducibles que expresan TRPV1 silvestre o la proteína de fusión fluorescente YFP-TRPV1

Para la realización de las líneas doblemente estables e inducibles se empleó el sistema avanzado Tet-On (Clontech). Este sistema utiliza dos plásmidos: un plásmido regulador, pTet-On que contiene como proteína reguladora Tet “reverso”, rTetR, que produce una proteína de fusión (rtTA). rtTA sólo se puede unir al promotor del segundo plásmido del sistema, el plásmido de expresión pTRE2hyg, en presencia de doxiciclina (DOX). Dicha unión activa la transcripción del gen de interés, en nuestro caso TRPV1 (figura 5.2). El nivel de expresión de la proteína de interés depende de la presencia y tiempo de incubación de las células a DOX, lo que nos permite tener una expresión controlada de la misma.

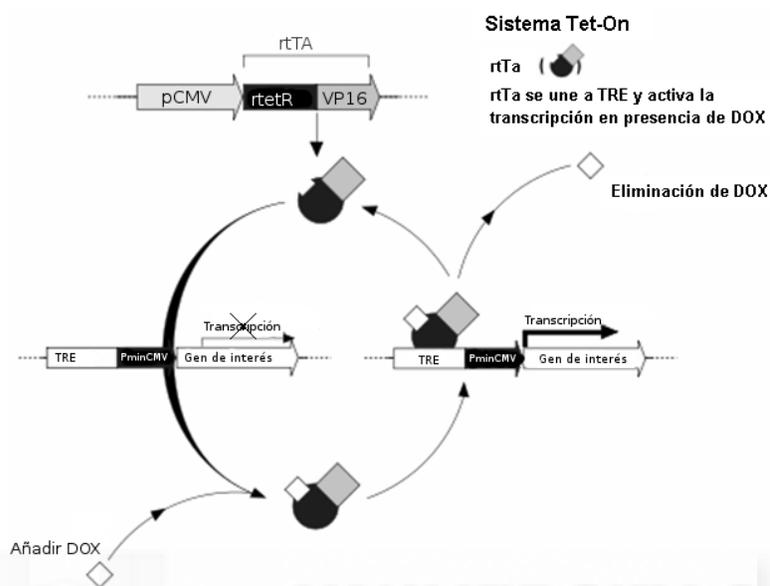


Figura 5.2: Representación esquemática del sistema avanzado pTet-On. Brevemente, rtTA se une a TRE (que está al lado del promotor CMV) en presencia de doxiciclina, y se produce la activación de la transcripción del gen de interés (<http://www.clontech.com>).

Para realizar la línea doblemente estable e inducible, comenzamos por hacer una titulación G418 (Invitrogen) a distintas concentraciones de las células HEK293 y F11 sin transfectar, seleccionando aquella concentración de antibiótico capaz de provocar la muerte celular en un plazo de 3-5 días. Como se observa en la tabla 5.9 la concentración idónea para las células HEK293 fue de 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mientras que para F11 fue de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

A continuación transfectamos células con el plásmido regulador pTet-On y, tras 48 horas se empezó la selección con el antibiótico G418, renovando el medio con antibiótico cada 48h. Al cabo de doce días, se pudieron visualizar colonias que se aislaron y expandieron en placas de 96-well. Tras varios días de crecimiento, se transfirieron cada uno de los clones primero a placas de 24 y posteriormente de 12 pocillos.

La selección de los clones que mejor expresaban el plásmido pTet-On, se realizó mediante el ensayo de luciferasa y β -galactosidasa. Para ello, los distintos clones pTet-On sembrados en placas de 12 pocillos, se transfectaron simultáneamente con 0.5 μg del plásmido pTRE2hyg-luc (para medir la actividad la luciferasa) y con 40 ng del plásmido tk-lacZ (para medir la actividad β -galactosidasa). La actividad enzimática se obtuvo tanto en presencia como en ausencia de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DOX, utilizando el kit de ensayo enzimático de luciferasa y β -galactosidasa (Promega), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Los mejores clones seleccionados por luciferasa y β -galactosidasa se volvieron a titular, esta vez con el antibiótico higromicina B (Hyg B) a distintas concentraciones, durante 12 días. Se seleccionó aquella concentración que provocaba la muerte celular en

5. MATERIALES Y MÉTODOS

un plazo de 7-8 días. Como se observa en la tabla 5.10 la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ Hyg seleccionada para ambos tipos de células provocó la muerte en un plazo de siete días.

A continuación, se transfectaron con los plásmidos TRPV1/ pTRE2hyg-DEST o con (YFP-TRPV1/pTRE2hyg). A las 48 horas (previa titulación del antibiótico, tabla 5.10), se comenzó la selección de las colonias con 200 $\mu\text{g/ml}$ Hyg (Sigma-Aldrich) y 100 $\mu\text{g/ml}$ de G418 (concentración de mantenimiento del plásmido regulador recomendada por el fabricante). El medio con antibióticos se renovaba cada dos días y transcurridos doce días se pudieron aislar y crecer las colonias. La selección de los clones se realizó mediante ensayos bioquímicos y funcionales (de aumento de calcio intracelular en presencia de agonista o por electrofisiología) que se describen a continuación. No todos los ensayos se realizaron a todos los clones obtenidos.



Tabla 5.9: Titulación de la resistencia de las líneas celulares HEK293 y F11 al antibiótico G418. Los símbolos representan lo siguiente: (++) no hay muerte celular, (++) comienza la muerte celular y (/) muerte celular completa.

	control		200 $\mu\text{g}/\text{mL}$		500 $\mu\text{g}/\text{mL}$		800 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	HEK293	F11	HEK293	F11	HEK293	F11	HEK293	F11
Día 1	++	++	++	++	++	++	++	++
Día 3	++	++	++	++	++	+-	++	+-
Día 5	++	++	++	++	++	/	/	/
Día 6	++	++	++	++	+-	/	/	/
Día 7	++	++	++	+-	+-	/	/	/
Día 8	++	++	+-	+-	+-	/	/	/

Tabla 5.10: Titulación de la resistencia de las líneas celulares HEK293 y F11 al antibiótico Hygromicina B. Los símbolos representan lo siguiente: (++) no hay muerte celular, (++) comienza la muerte celular y (/) muerte celular completa.

	control		200 $\mu\text{g}/\text{mL}$		500 $\mu\text{g}/\text{mL}$		800 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	HEK293	F11	HEK293	F11	HEK293	F11	HEK293	F11
Día 1	++	++	++	++	++	++	++	++
Día 3	++	++	++	++	++	++	++	++
Día 5	++	++	++	+-	++	+-	+-	+-
Día 6	++	++	++	+-	+-	+-	+-	/
Día 7	++	++	+-	/	+-	/	+-	/
Día 8	++	++	/	/	/	/	/	/

5.5. Métodos Bioquímicos

5.5.1. Obtención de extractos totales de proteína

Los extractos totales de proteína a partir de células se recogieron en PBS, se centrifugaron y el pellet celular se resuspendió en tampón de lisis (Tris 50 mM pH 7.4, 1% Triton X-100, al que se añadió como inhibidores de proteasas (PI) 1 mM iodoacetamida y 1mM PMSF). La extracción se realizó durante 30 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 4°C durante 20 min a 16000 rpm, y se recogió la fracción soluble. El mismo proceso se realizó para la extracción de proteínas de DRGs con la diferencia de que éstas se lisaron durante 1 h a 4°C. La concentración de proteínas se determinó por BCA (Thermo Scientific). Aproximadamente 30 μ g de proteína se desnaturalizaron en condiciones reductoras y se cargaron en gel de SDS poliacrilamida (SDS-PAGE).

5.5.2. Obtención de extractos de tubulina

La extracción de tubulina se realizó a partir de médula de rata siguiendo el protocolo descrito por Goswami y col. (2004) pero modificado. Concretamente, la médula de una rata adulta se homogeneizó en 15 ml de tampón de médula (20 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EGTA, 320 mM sacarosa, 5 mM de $CaCl_2$ más PI, se centrifugó a 48000 g durante 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, que se solubilizó con Tween-20 1% (p/v) durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se volvió a centrifugar a 100000 g durante 2h a 25°C. Las capas más superficial (mielina) y la del fondo del tubo (material insoluble) se descartaron y se guardó la capa intermedia que es la porción en la que se encuentra la tubulina solubilizada.

5.5.3. Obtención de extractos de cerebro

Para los extractos de cerebro de rata adulta, una vez extraído el tejido se pesó y se añadieron 10 volúmenes de tampón de cerebro (10 mM Tris HCl pH 7.4, 1% Triton X-100 más PI) y se realizó una disgregación mecánica. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 4°C y 1000 g y se recuperó el sobrenadante.

5.5.4. Geles de SDS-poliacrilamida y transferencia a membrana

Los geles de SDS-poliacrilamida para proteínas y la transferencia a membranas se hicieron según protocolos estándar (Sambrook y col., 1989). La separación de proteínas se realizó en minigeles de poliacrilamida de distinto porcentaje dependiendo del tamaño de las proteínas de interés con un gel empaquetador al 4%, que cumple la función de alinear las proteínas de la muestra antes de ser separadas. La electroforesis se realizó a 100-120V con una fuente Power Pac Basic de Biorad, y se empleó un marcador de pesos moleculares pre-teñido (Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen).

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ m de poro (Biorad). Las condiciones de transferencia (el tiempo y el voltaje utilizados) fueron

diferentes en función del tamaño de la proteína de interés. La composición de los tampones empleados, se muestra en la tabla 5.11.

Tabla 5.11: Reactivos necesarios para realizar la inmunodetección de proteínas por *western blot*.

Tampón de carga SDS (6x)	Tampón de electroforesis	Tampón de transferencia
1.3 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	3 gr Tris base	3 gr de Tris base
0.53 ml glycerol 100 %	14.5 gr glicina	1.4 gr glicina
2.1 ml SDS 10 %	10 ml SDS 10 %	600 ml agua, pH8.3 con HCl
0.5 ml β -mercaptoetanol	Completar hasta 1l con agua	400 ml metanol
5.3 ml agua		

La eficacia de la transferencia se comprobó tiñendo la membrana con una solución de rojo Ponceau (0.1 % Ponceau-Sen 1 % ácido acético).

5.5.5. Bloqueo e incubación con los anticuerpos y revelado

Las membranas se bloquearon con tampón TBS (50 mM Tris-Cl, pH 7.5 y 150 mM NaCl) con 0.1 % NP40 (Roche biotest) y un 5 % de leche desnatada, en agitación y a temperatura ambiente en un tiempo mínimo de 1 hora (o 30 min a 37°C). Tras el bloqueo, se incubaron con anticuerpo primario (a la dilución especificada) en 1 % BSA en PBS. El tiempo de incubación fue de 2 horas a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó 3 veces por 10 minutos con TBS-0.1 % NP40 a temperatura ambiente, y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (HRP) en el tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido ese tiempo se lavaron tres veces con TBS-0.1 % NP40 y se procedió a revelar las membranas. La señal se detectó por el sistema ECL plus (Amersham Biosciencias), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las membranas se expusieron con películas Hyperfilm (Amersham) y se revelaron en una reveladora AGFA Curix 60.

5.5.6. Anticuerpos

Se han utilizado numerosos anticuerpos tanto para inmunocitoquímica como para *western blot*. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo están recogidos en la tabla 5.12, y los anticuerpos secundarios en la tabla 5.13.

Tabla 5.12: Lista de los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de diferentes proteínas por *western blot* e inmunocitoquímicas. (*) Suero producido en Elche por el laboratorio del Dr. Antonio Ferrer, (***) Suero producido en Valencia por el laboratorio de la Dra. Rosa Planells. RT, temperatura ambiente.

Anticuerpo	Stock	Dilución	Especie	Tiempo incubación	Casa comercial
suero α -TRPV1	previa titulación	1:1000	conejo	2h RT	*
Suero α -TRPV1 extracelular	1 mg/ml	1:1000	conejo	1h 4 °C	GenScript
α -Nt-TRPV1	1 mg/ml	1:1000	conejo	Toda la noche a 4 °C	Neuromics
suero α -GABARAP	previa titulación	1:1000	conejo	2h RT	**
α -Calnexina	1 mg/ml	1:4000	ratón	Toda la noche a 4 °C	Abcam
α -Tubulina	0.1 mg/ml	1:1000	ratón	Toda la noche a 4 °C	Sigma-Aldrich
α -GST	1 mg/ml	1:1000	ratón	Toda la noche a 4 °C	Sigma-Aldrich
α -HA	0.4 mg/ml	1:500	rata	Toda la noche a 4 °C	Roche
α -His6	0.1 mg/ml	1:1000	ratón	Toda la noche a 4 °C	Roche

Tabla 5.13: Lista de los anticuerpos secundarios utilizados para la inmunodetección de diferentes proteínas por *western blot* e inmunocitoquímicas. gp, cobaya.

Anticuerpo	Stock	Dilución	Especie	Tiempo incubación	Casa comercial
α -IgG-HRP	0.8 mg/ml	1:10000	conejo	1h RT	Jackson ImmunoResearch
α -IgG-HRP	0.8 mg/ml	1:10000	ratón	1h RT	Jackson ImmunoResearch
α -IgG-HRP	0.8 mg/ml	1:5000	rata	1h RT	Jackson ImmunoResearch
C γ 3 α -gp	1.25 mg/ml	1:200	mono	1h RT	Jackson ImmunoResearch
C γ 3 α -ratón	1 mg/ml	1:50	cabra	1h RT	ZYMED laboratories
Alexa 488 α -ratón	1 mg/ml	1:200	cabra	1h RT	Molecular Probes

5.5.7. Detección de proteínas de membrana por biotilación en superficie

Las proteínas de la superficie celular se marcaron covalentemente con sulfo-NHS-SS-biotina (Thermo Fisher Scientific), un reactivo soluble en agua e impermeable a la membrana celular debido a su grupo sulfonato. Las células HEK293 se lavaron con PBS y se incubaron con sulfo-NHS-SS-biotina ($\sim 0,5$ mg/ml de PBS) durante 30 min a 4°C . A continuación, se lavaron dos veces, el último lavado con tampón de bloqueo (en mM: 10 Tris pH 7,4; 154 NaCl) durante 30'. Finalmente las células se lisaron durante 1h a 4°C en 50 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 10% Glicerol, 1% v/v Tritón X-100, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5% deoxicolato sódico más PI. Para recuperar la fracción soluble se centrifugaron las muestras a 16000 rpm durante 20 min a 4°C y tras su cuantificación, con el ensayo colimétrico *BCA Protein Assay kit* (Thermo Fisher Scientific), para llevar todos los lisados a la misma concentración de proteína total, se incubaron con la resina estreptavidina-agarosa a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 5000 rpm 10' para separar las proteínas biotiniladas, que se encontrarán en la resina, del resto de proteínas. Ambas muestras fueron desnaturalizadas a 5 min a 100°C para analizarla mediante *western blot*.

Para la biotilación en DRGs se utilizó esencialmente el mismo procedimiento aunque la composición del tampón de lisis fue 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton.

5.5.8. Ensayos de pulso-caza

Células HEK293 fueron transfectadas con TRPV1-HA más GABARAP (o YFP como control) y a las 48 h se lavaron y preincubaron durante 30 min a 37°C con medio DMEM sin metionina ni cisteína (Invitrogen) con 5% de FBS dializado. Se realizó un pulso con medio sin metionina y cisteína que contenía $100 \mu\text{Ci/ml}$ $L^{[35\text{S}]}\text{-Met}/L^{[35\text{S}]}\text{-Cys}$ (PerkinElmer Life Sciences) más 5% de FBS. Transcurridas 2 h a 37°C , las células se lavaron con medio de captura (DMEM suplementado con 10% de FBS y 5 mM L-Met), y se recogieron muestras a diferentes tiempos de los que se obtuvieron los respectivos extractos proteicos que se inmunoprecipitaron utilizando el kit *ProfoundTM HA Tag IP/Co-IP Kit* (Thermo) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las muestras fueron separadas mediante *western blot* e inmunodetectadas con los anticuerpos correspondientes. La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó con el software ImageQuantTM (GE Healthcare).

5.5.9. Coimmunoprecipitación de proteínas

Células HEK293 transfectadas con los ADN correspondientes fueron recogidas en PBS a las 48 h y lisadas durante 30 min a 4°C en tampón RIPA (en mM: 150 NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxicolato, 0.1% SDS, 50 Tris pH 7.5 más PI). Tras centrifugar a 17000 rpm a 4°C , por cada $300 \mu\text{l}$ de muestra se añadieron $10 \mu\text{l}$ del anticuerpo α -HA, y se incubó la mezcla en una columna específica durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente se lavó la columna 3 veces con tampón TBS-T (25mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 0.05% Tween-20) y desnaturalizó en tampón no reductor durante 5 min a 100°C . Las muestras se analizaron mediante *western blot*.

5.5.10. Ensayos de arrastre de proteínas

5.5.10.1. Obtención de las proteínas en procariontas

Se utilizaron bacterias de las cepas *E.coli* B121 o C41 transfectadas con los ADN de las proteínas de interés. Se crecieron en medio 2xYT (tabla 5.2) desde una densidad óptica a 600nm (OD_{600}) de 0.1 hasta 0.4-0.6, momento en que se indujo la expresión con 1 mM isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 2 horas a 37°C o bien durante toda la noche a temperatura ambiente. A continuación se colectaron las bacterias y los pellets se resuspendieron en tampón BFS (en mM: 150 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 1.7 KH₂PO₄, pH 7.4 más PI). El homogenado celular se lisó durante 10 min a temperatura ambiente con lisozima, se sonicó y se añadió Triton X-100 a un % final de 0.01 y se agregó glicerol a una concentración final de 15 %. La lisis procedió durante 30 min a 4°C y posteriormente se recogió la fracción soluble.

La proteína Nt-TRPV1-*His*₆ se expresó como se ha descrito anteriormente pero la extracción se realizó en tampón (en mM): 10 Tris HCl, 150 NaCl, 16 β -mercaptoetanol, 20 imidazol, pH 8, y 1 % Triton X-100.

5.5.10.2. Inmovilización de las proteínas de fusión y arrastre

Todos los ensayos de arrastre de proteínas con proteínas de fusión a GST utilizaron *Gluthatione Sepharose 4B* preequilibrada en tampón de lisis, que se incubó con el extracto proteico durante 2h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se lavaron 5 veces durante 10 min con tampón BFS. Antes de incorporar las proteínas a arrastrar, se realizó un preequilibrado y se incubó durante toda la noche con el extracto celular. Al día siguiente se lavó al menos 6 veces y se desnaturalizaron las proteínas inmovilizadas para su posterior análisis por *western blot*.

El ensayo de interacción con tubulina consistió en una pre-incubación de la tubulina durante 1 hora con un extracto puro de GABARAP y/o $\Delta 37 - 112$ que posteriormente se agregó a las proteínas inmovilizadas en *Gluthatione Sepharose*. Por lo tanto, para purificar GABARAP y $\Delta 37 - 112$, se inmovilizó la proteína de fusión en 200 μ l de *Gluthatione Sepharose 4B* durante 2 h a temperatura ambiente y tras los correspondientes lavados, se digirió durante 5 h a temperatura ambiente (o bien 3 h a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C) con trombina (GE Healthcare, 1 unidad de trombina por cada 100 μ g de proteína) y se recuperó el sobrenadante.

5.5.11. Microscopía de inmunofluorescencia

Las células sembradas sobre cristales de 18 mm de diámetro, transfectadas 24 o 48 h con los ADN correspondientes, se lavaron dos veces con PBS frío y se fijaron durante 30 min a 4°C con 4 % paraformaldehído (PFA) más 4 % sacarosa en PBS. Después de tres lavados con PBS, se permeabilizaron y bloquearon durante 30 min a temperatura ambiente con 3 % suero de cabra, 2 % BSA, 0.1 % NP40 en PBS, y se incubaron con el/los anticuerpo(s) primario(s) de interés durante toda la noche a 4°C (a excepción del anticuerpo para calnexina que se utilizó a 37°C por 2h). A continuación se lavaron en primer lugar dos veces con PBS y después dos veces más con PBS más 0.5 M de NaCl. Tras un segundo bloqueo de 30 min a

temperatura ambiente con 2 % BSA en PBS, se incubó con anticuerpo(s) secundario(s) correspondiente(s) durante 1h a temperatura ambiente. Tras 4 lavados con PBS, y se marcó los núcleos celulares con DAPI durante 5 min a temperatura ambiente.

Cuando se realizó la inmunocitoquímica con el anticuerpo TRPV1 (E2), que reconoce el epítipo extracelular del receptor 607-LPMESTPHKCRGSA-620 (Klionsky y col., 2006), se incubaron las células sin permeabilizar con el anticuerpo primario durante 1h a 4°C. Tras lavar intensamente, se incubó con el anticuerpo secundario a 4°C y, posteriormente, se fijaron las células y se continuó el procedimiento como se ha descrito anteriormente.

Obtención y análisis de las imágenes

La microscopia confocal se efectuó en el Servicio de Microscopía Confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Las imágenes se adquirieron con un microscopio (invertido) láser confocal Leica, modelo TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems) usando un objetivo de inmersión de 63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A. Las imágenes se adquirieron bidimensionalmente y en pseudo color (255 niveles de color), con una resolución de 1024x1024 pixels. Todas las imágenes fueron adquiridas bajo las mismas condiciones y los análisis de distribución de fluorescencia fueron hechos mediante el software de leica “Leica Lite” versión 2.61.

5.6. Ensayos funcionales

5.6.1. Ensayos de calcio intracelular

Las neuronas y las células HEK293 sembradas en cristales se cargaron durante 1h a 37°C con 10 μ M Fura-2AM (Molecular Probes) en presencia de 0.02 % ácido plurónico F-127 (Molecular Probes) en tampón fisiológico estándar (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5 mM glucosa y 40 mM manitol ajustada a pH 7.4 con NaOH). La misma solución con 10 mM MES sustituyendo a HEPES se utilizó para preparar la disolución a pH ácido.

Se empleó un microscopio invertido Leica modelo DM IRE2, con cámara CCD refrigerada (Hamamatsu Photonics) y objetivo 20X equipado con rueda de filtros Lambda 10-2 (Sutter Instruments Co.). Las células se excitaron a 340 y 380 nm y se registró la fluorescencia a 510 nm. Los datos se analizaron con el software Aquacosmos v2.5-v2.6 de Hamamatsu Photonics. El tiempo de exposición empleado en los registros fue de 61.1 ms, con una frecuencia de adquisición de 0.5 Hz. Todos los registros se llevaron a cabo a una temperatura aproximada de 22°C. El análisis de los datos se realizó con los programas Graph-Prism 4 (GraphPad Software Inc.) y Origin 8 (OriginLab Corporation).

5.6.2. Ensayos de electrofisiología

El microscopio utilizado fue el empleado en los ensayos de calcio intracelular con un amplificador EPC-10 (HEKA, Alemania). Las pipetas se estiraron a partir de capilares de cristal de borosilicato con un grosor externo de 1.5 milímetros (mm) e internos de 1

mm (World Precision Instruments, Estados Unidos) en un puller horizontal P-97 (Sutter Instruments, Estados Unidos), fueron posteriormente pulidas con una microforja MF-830 (Narishige, Japón). La resistencia de los capilares fue de 2-3 $M\Omega$. La resistencia en serie fue siempre menor o igual a 12 $M\Omega$ y compensada hasta un 70-90 % con el fin de minimizar errores de voltaje en los registros.

La solución estándar externa empleada fue: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 5 mM Glucosa y 20 mM Mannitol. El pH fue ajustado a 7.4 con NaOH, y la osmolaridad fijada a 320 mosm/kg. El electrodo contenía una solución cuya composición era: 144 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES y 5 mM EGTA, pH 7.2 y osmolaridad 295 mosm/Kg. Las diferentes soluciones salinas fueron aplicadas con una micro-perfusión que funciona por gravedad y que tiene un flujo de aproximadamente 500 μ l/minuto y que se encuentra localizada a aproximadamente 300 μ m de la célula registrada. Todos los registros se llevaron a cabo a una temperatura aproximada de 22°C.

Los datos fueron obtenidos a una frecuencia de 1 kHz y filtrados a 100 Hz en los protocolos de pulso de voltaje, y a 500 Hz y 50 Hz en el caso de las rampas de voltaje. Las corrientes de TRPV1 provocadas por los estímulos de capsaicina o pH ácido, fueron tomadas a 20 Hz. En todos los experimentos se mantuvo el potencial de reposo a -60 mV. Para la obtención de los registros se utilizó el programa informático Pulse y Pulse-Fit (HEKA, Alemania). El análisis de los datos se realizó con los programas GraphPrism 4 (GraphPad Software Inc.) y Origin 8 (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

A las células transfectadas con TRPV1 y GABARAP se les aplicaron pulsos cuadrados de voltaje de 100 ms desde -120 hasta +160 mV. Los valores de conductancia para cada células fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann: $G = G_{max} / (1 + \exp[(V - V_{0,5})/a_n])$, donde G es la conductancia, G_{max} es la conductancia máxima (a +200 mV), $V_{0,5}$ es el voltaje necesario para alcanzar la mitad de la máxima activación, y a_n es la pendiente de la curva de la conductancia respecto al voltaje (I-V).

5.7. Ensayos de microscopía *in vivo*

5.7.1. Ensayos de microscopía *in vivo* de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP, del inglés Fluorescence recovery after photobleaching)

FRAP es una técnica óptica que permite evaluar la dinámica de diversas moléculas como lípidos o proteínas en la membrana plasmática en función del tiempo (Reits y Neefjes, 2001).

Células SH-SY5Y y HEK293 transfectadas durante 48 horas con YFP-TRPV1 más CFP o con YFP-TRPV1 más CFP-GABARAP se registraron tomando 3 imágenes con un intervalo de 2 segundos en condiciones basales y posteriormente se activó el láser a 405 nm al 12-20 % de intensidad (se tomaron 2 imágenes con un intervalo de 2 s) para fotoblanquear la imagen de interés (ROI) y se continuó el registro adquiriendo imágenes cada 2 s con una resolución de 512 x 512. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa SigmaPlot 8 (Systat, Point Richmond, CA), en el que representamos los valores de recuperación de fluorescencia en el tiempo y los ajustamos la curva a la

ecuación $y=a*(1-\exp(-t*b))$, donde a es la amplitud de cada componente, t el tiempo y la constante de tiempo se calculó a partir de $1/b$. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Mann Whitney. Los registros fueron realizados en el laboratorio del Dr. Mike Tamkun en la Colorado State University (CSU). El microscopio utilizado fue un Olympus FV1000 y los registros se analizaron con el programa Volocity 3.5 (Improvision, Lexington, MA). Los datos de fracción móvil se representan como la media \pm S.E.

5.7.2. Ensayos de microscopía *in vivo* de transmisión de energía de resonancia (FRET, del inglés Fluorescence resonance energy transfer)

FRET es una técnica fluorescente que permite observar las interacciones moleculares mediante la transferencia de energía de un fluoróforo a otro (figura 5.3) (Roy y col., 2008).

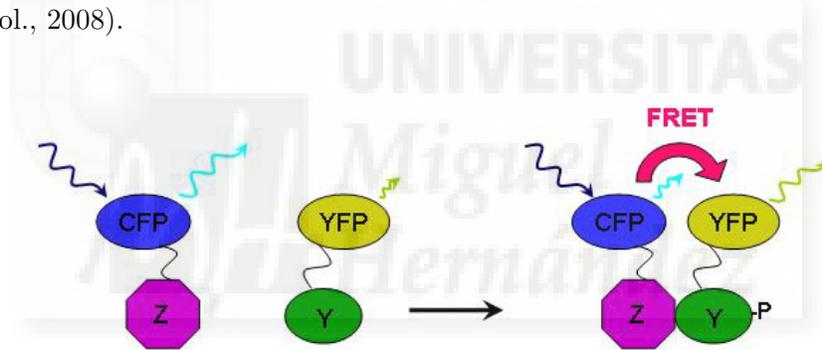


Figura 5.3: Técnica de microscopía *in vivo* FRET. Cuando las proteínas (Z e Y) están separadas, como se muestra en la imagen de la izquierda, al excitar el fluoróforo dador, CFP, no se observa transferencia de energía al fluoróforo receptor, YFP. En el caso de que las proteínas estén cerca, imagen de la derecha, existe esta transferencia de energía y por lo tanto se puede registrar emisión del receptor. Imagen obtenida de la página web de la Universidad de Harvard.

Células HEK293 transfectadas con cantidades equimolares de diferentes combinaciones entre los ADN: CFP, YFP, CFP-TRPV1, YFP-TRPV1, CFP-GABARAP e YFP-GABARAP. A las 24 h, el medio fue sustituido por PBS a temperatura ambiente. Las células fueron excitadas a 440 nm durante 200 ms y la emisión fue registrada a 480 nm (Df) y 535 nm (Ff) utilizando un set de filtros dicróicos de FRET para CFP/YFP ($\lambda \geq 455$ nm, Chromas). Con los ADN que no interactúan, CFP e YFP, obtuvimos una línea recta (comparando el valor de Ff frente a Df) con una pendiente de 0.91 ± 0.02 ($n=5$), por lo que una pendiente >1.0 fue considerada como indicadora de una interacción de FRET entre las diferentes parejas de dador y receptor (Ruiz-Velasco y Ikeda, 2001). Los datos se representan como la media \pm S.E, siendo n el número de experimentos realizados. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Tukey.

5.7.3. Ensayos de microscopía *in vivo* de reflexión total interna de la fluorescencia (TIRF, del inglés Total internal reflection fluorescence)

TIRF es una técnica que se basa en la excitación y visualización de fluoróforos en un espesor de 100 nm que comprende la membrana plasmática (de aproximadamente 20 nm) y la región cercana a la misma, tanto de células vivas como fijadas (figura 5.4A). A diferencia de la microscopía confocal que integra la imagen de unos 300 nm, TIRF permite registrar imágenes más nítidas y selectivas de los eventos que ocurren en o cerca de la membrana gracias a la capacidad del sistema de modificar el ángulo de incidencia del láser sobre la muestra (Trache y Meininger, 2005)(figura 5.4B).

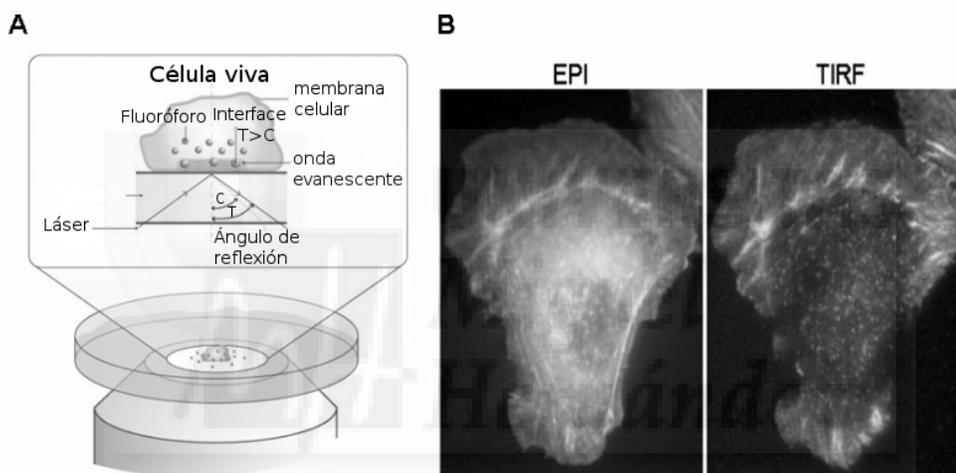


Figura 5.4: Técnica de microscopía *in vivo* TIRF. (A) Imagen explicatoria de la metodología TIRF, obtenida de la web <http://www.semrock.com/tirf.aspx> del grupo Semrock, The Standard in Optical Filters for Life Science, Lasers & Optical Systems. (B) Comparación de una célula observada con Epifluorescencia (EPI) en el que la fluorescencia penetra toda la célula, y la misma célula observada en modo TIRF, donde la luz refleja debido a la modificación del ángulo de incidencia del láser y nos permite observar la región más externa de la célula. La imagen fue obtenida de la web <http://www.einstein.yu.edu/aif/instructions/tirf/index.htm> del departamento de Imagen Analítica del Instituto de Medicina Albert Einstein de Nueva York.

Células SH-SY5Y fueron transfectadas con CFP ó CFP-GBARAP e infectadas durante 72 h con 250 MOI (multiplicidad de infección, es decir, el ratio de partículas de virus por célula) de un virus adenoasociado que expresaba YFP-TRPV1. Las imágenes se adquirieron con una profundidad de 100 nm y un tiempo de exposición de 500 ms.

El equipo utilizado para estos ensayos fue un microscopio invertido Leica MI6000 con un sistema de *time lapse* con cámara para microscopio, un módulo con escáner de precisión para posicionamiento del láser, sistema de autoalineamiento y control automático de la profundidad de la onda evanescente, y un HCX PL APO 100x/1,46 de

inmersión. El equipo tiene también un controlador de temperatura y CO_2 .

Para el cálculo de las intensidades de fluorescencia se utilizó el Sistema de Imagen Multidimensional Leica AF6000. El resto de cuantificaciones fueron realizadas con los programas ImageJ, Igor Pro 4.0, y para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism aplicando el test de Mann Whitney.





Resultados





Capítulo 6

Generación de líneas celulares HEK293 y F11 que expresan de forma estable e inducible TRPV1 silvestre (TRPV1wt) o fusionado a la proteína fluorescente amarilla YFP-TRPV1

La generación de estas líneas celulares de mamífero que expresan TRPV1 establemente de forma inducible, además de evitar en cierta medida el uso de cultivos primarios y, por lo tanto, el sacrificio innecesario de animales de experimentación, permite controlar y modular la expresión génica del receptor en función según la concentración y el tiempo de exposición a doxiciclina (DOX). Específicamente, el sistema Tet-On contiene como proteína reguladora un represor Tet “reverso” (rTetR), capaz de unirse al operador en presencia de tetraciclina o sus derivados e iniciando así la transcripción del producto génico. Además, el plásmido que contiene rTetR posee un gen de resistencia a neomicina para su selección.

6.1. Generación de las líneas celulares HEK293 doblemente estables e inducibles que expresan TRPV1wt o YFP-TRPV1

Células HEK293 transfectadas con el plásmido regulador pTet-On, que contiene rTetR, se incubaron durante 12 días con 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 (figura 5.2) y resultaron inicialmente en 32 clones que se expandieron. La ausencia de expresión de proteínas en ausencia de DOX y la elevada capacidad de inducción en presencia de antibiótico DOX se determinó mediante la transfección transitoria de pTRE2-Luc, un plásmido conteniendo el promotor mínimo TRE (elemento de

6. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES

respuesta a tetraciclina) seguido del gen luciferasa, en los 32 clones seleccionados. Además se co-transfectó un plásmido no inducible conteniendo el gen β -galactosidasa. La actividad luciferasa en cada clon se midió tras 48h de incubación y se obtuvo de restar el valor de luminiscencia en ausencia de DOX del valor obtenido en presencia de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DOX utilizando un ensayo estándar de luciferasa. Los valores obtenidos se normalizaron con los valores de β -galactosidasa.

Como se observa en la figura 6.1, el rango de valores obtenidos de la relación luciferasa/ β -galactosidasa entre los distintos clones varió entre 1 y 48. Cuatro de los 19 clones analizados presentaron un aumento de expresión superior a 20, valor umbral de aumento de expresión recomendado por el proveedor. El ensayo se duplicó en los clones más eficaces, confirmando que los clones H11 y H18 eran los que producían mayor expresión en presencia de antibiótico.

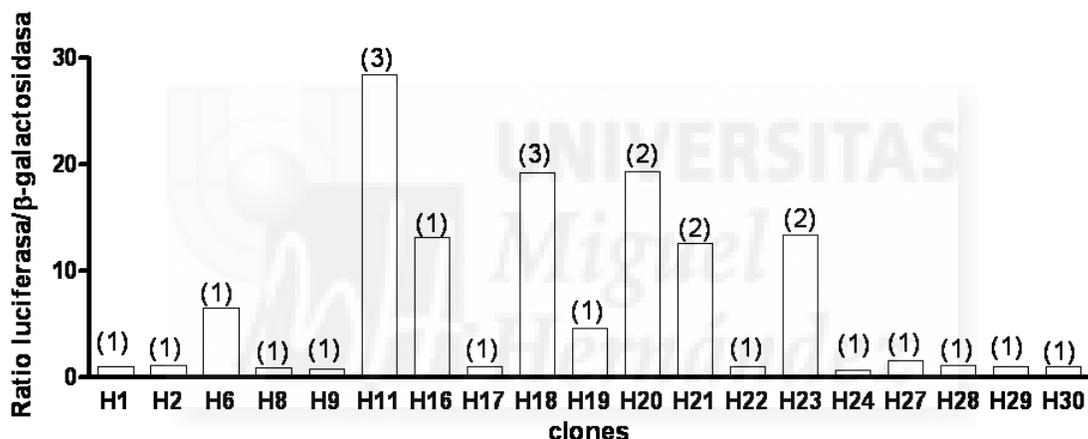


Figura 6.1: Los clones H11 y H18 fueron seleccionados por sus altos niveles de expresión en el ensayo de la actividad luciferasa/ β -galactosidasa tras la inducción con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DOX. Cada columna pertenece a un clon diferente de la línea celular HEK293. Los datos están representados como la media y en paréntesis el número de veces que se repitió el ensayo para cada uno de los clones.

A continuación, los clones H11 y H18 se transfectaron con el vector de expresión TRPV1wt/pTRE2hyg o con YFP-TRPV1/pTRE2hyg. Tras 12 días de selección con 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Hygromycin B y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418, se llegaron a aislar y expandir 30 colonias transfectadas con TRPV1wt/pTRE2hyg, que se denominaron $H11,1^{TRPV1wt}$ al $H11,30^{TRPV1wt}$, y 15 colonias con YFP-TRPV1/pTRE2hyg ($H11,1^{YFP-TRPV1}$ al $H11,14^{YFP-TRPV1}$) y 1 solamente una colonia a partir de H18 con YFP-TRPV1/pTRE2hyg ($H18,1^{YFP-TRPV1}$). Todas ellas fueron expandidas para posteriores ensayos.

El primer cribado de estos clones doblemente estables se realizó por PCR del ADN genómico aislado a las 48 horas post inducción con DOX y utilizando los oligonucleótidos TopoTRPV1+ y TRPV1- (descrito en el apartado 5.2.1.2). Como control positivo se utilizó el propio TRPV1wt, y como negativo, ADN de un extracto de células HEK293 no transfectado (figura 6.2).

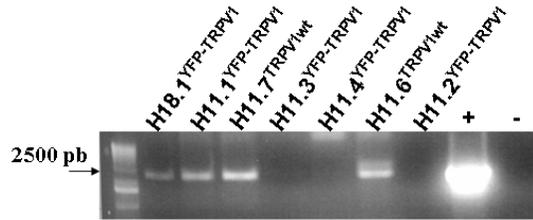


Figura 6.2: Productos de PCR de diferentes clones de la línea celular HEK293 que expresan el receptor silvestre o el receptor fusionado a YFP. Los clones $H18.1^{YFP-TRPV1}$, $H11.1^{YFP-TRPV1}$, $H11.7^{TRPV1wt}$ y $H11.6^{TRPV1wt}$ se seleccionaron para siguientes ensayos.

Solamente los clones $H18.1^{YFP-TRPV1}$, $H11.1^{YFP-TRPV1}$, $H11.7^{TRPV1wt}$ y $H11.6^{TRPV1wt}$, que amplificaron una banda del tamaño correspondiente a TRPV1 por PCR, se seleccionaron posteriormente para ser analizados funcionalmente por ensayos de *patch clamp* en configuración de célula completa. Concretamente, las células se evaluaron sin inducir y tras 48h de inducción con DOX. El protocolo de registro consistió en mantener un potencial en reposo de -60mV y aplicar dos pulsos de 1 μ M capsaicina durante 15 s intercalados por un período de lavado de 1 min, que resultaron en una corriente de entrada de distinta magnitud en presencia del agonista. De estos ensayos se desprendió que solamente dos clones expresaban TRPV1wt: el clon $H11.7^{TRPV1wt}$ con valores de corriente de 1584.5 ± 1463.07 pA con $n = 6$ (figura 6.3A) y el clon $H11.14^{TRPV1wt}$ con corrientes de 166.67 ± 115.47 pA con $n = 3$ (no se muestran los datos). Por otro lado, y utilizando el mismo protocolo, la corriente de entrada del clon $H11.1^{YFP-TRPV1}$ resultó ser 426 ± 323 pA, $n = 3$ células.

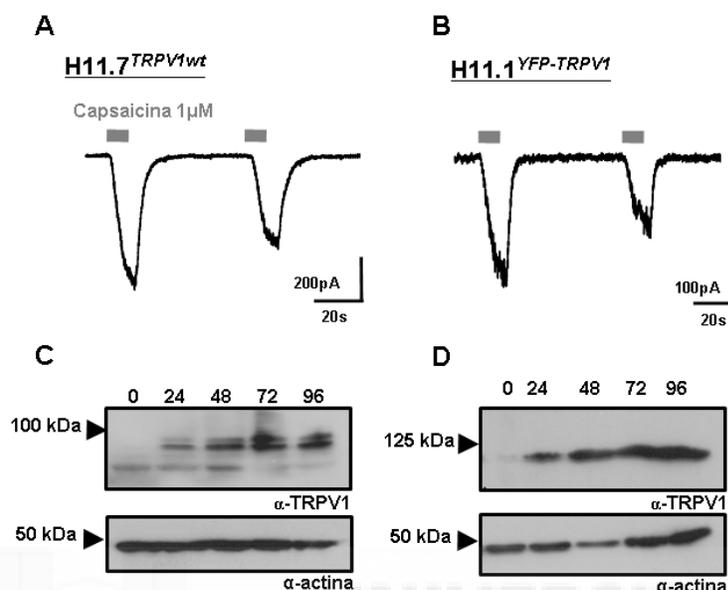


Figura 6.3: Registros de *patch clamp* y *western blot* de los clones seleccionados de la línea celular HEK293 que expresan el receptor silvestre y el receptor fusionado a la proteína fluorescente YFP. (A-B) Respuestas consecutivas a capsaicina 1 μM durante 15 s tras 48 horas de inducción con DOX 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los clones $H11.7^{TRPV1wt}$ (A) y $H11.1^{YFP-TRPV1}$ (B). (C-D) *Western blots* en los que se muestra la expresión temporal a las 0, 24, 48, 72 y 96h post-inducción con DOX 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del clon $H11.7^{TRPV1wt}$ y del clon $H11.1^{YFP-TRPV1}$ respectivamente.

Además se hizo un seguimiento temporal de la expresión de proteína mediante *western blot* del extracto total de proteína, comenzando a las 0 h, muestra no inducida, y a las 24, 48, 72 y 96 h post inducción (figura 6.3C-D). Como se observa para el clon $H11.7^{TRPV1wt}$, se detectó la aparición específica de una banda de aproximadamente 95 kDa al cabo de 24h de exposición al antibiótico, que alcanza casi el 100% de los niveles máximos a las 48h y se mantiene en exposiciones más prolongadas (figura 6.3C). Como control de carga se incluye la detección con beta-actina en la parte inferior de cada gel. Similarmente, tras exposición con DOX se observó que el clon $H11.1^{YFP-TRPV1}$ expresó una banda de aproximadamente 120 kDa, que corresponde a la del receptor más la proteína fluorescente YFP, que alcanzó niveles máximos a las 48h (figura 6.3D).

Para evaluar funcionalmente el desarrollo temporal de la expresión del receptor contamos con la ventaja de que la activación del receptor provoca la apertura de un canal catiónico no selectivo con elevada permeabilidad a Ca^{2+} . Por ello, se realizaron ensayos funcionales de calcio intracelular (Ca^{2+i}) incubando las células con Fura-2AM un colorante fluorescente, permeable a la membrana quedando atrapado en el interior celular, que permite el análisis de fluorescencia ratiométrico y, por lo tanto, independiente de cambios en la intensidad de fluorescencia ajenos a las propias fluctuaciones en el Ca^{2+} citosólico. La fluorescencia se registró a 510 nm tras excitar alternativamente a

6.1. Líneas HEK293 que expresan TRPV1wt o YFP-TRPV1

340 nm y a 380 nm, las dos longitudes de onda donde se hayan las mayores diferencias de emisión entre fluoróforo unido y libre. Los registros se efectuaron en células que se expusieron durante 0, 24 y 48 h al antibiótico (figura 6.4). La actividad de TRPV1wt o YFP-TRPV1 se determinó por la aplicación de un estímulo ácido (pH 5) seguido por capsaicina 100 nM y por último capsaicina 1 μ M. Cada estímulo tuvo una duración de 15 s y se intercaló por un período de lavado de aproximadamente 2 min. Como se observa en la figura 6.4, paneles A y B, las células no inducidas no respondieron a ninguno de los tres estímulos. Por el contrario, en las células $H11.7^{TRPV1wt}$ se observó que la magnitud del aumento de Ca^{2+} tanto a pH ácido como a capsaicina aumentó temporalmente, siendo la magnitud de las respuestas a los tres estímulos de pH y vanilloide similar al cabo de 48h. Para el clon $H11.1^{YFP-TRPV1}$ las respuestas fueron en general de menor magnitud. Así, por ejemplo, a las 48 horas la respuesta en $H11.1^{YFP-TRPV1}$ a pH=5 fue de 0.032 ± 0.003 u.a (n = 35) y para el clon $H11.7^{TRPV1wt}$ de 0.152 ± 0.005 u.a (n = 71). En el caso de la respuesta a 100 nM capsaicina, para $H11.1^{YFP-TRPV1}$ fue de 0.117 ± 0.008 u.a (n = 35) mientras que en $H11.7^{TRPV1wt}$ fue de 0.148 ± 0.003 u.a (n = 71) (figura 6.4C).

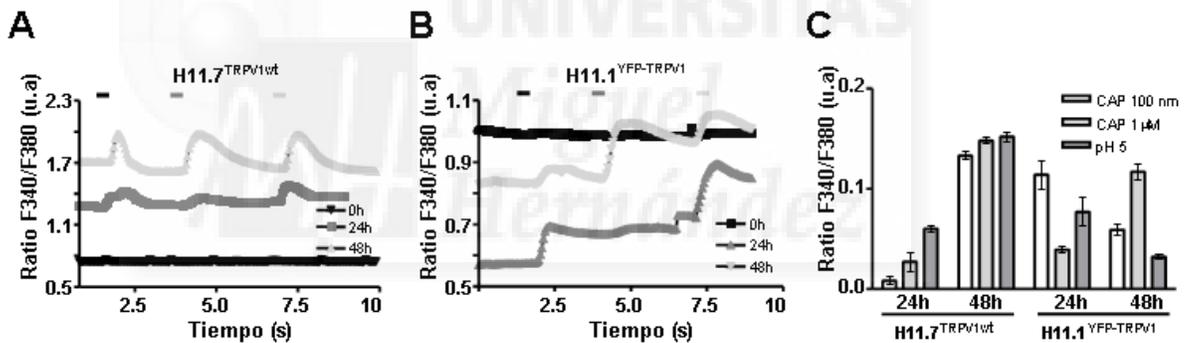


Figura 6.4: Los clones $H11.7^{TRPV1wt}$ y $H11.1^{YFP-TRPV1}$ presentan mayores transientes de Ca^{2+} a las 48h post inducción con DOX. Las gráficas representan los registros de Ca^{2+} de los clones $H11.7^{TRPV1wt}$ (A) y $H11.1^{YFP-TRPV1}$ (B) obtenidos a las 0h (negro), 24h (gris oscuro) y 48h (gris claro) post-inducción con 2 μ g/ml de DOX, donde se observa la respuesta frente a los diferentes estímulos aplicados: pH 5 (primer estímulo), capsaicina 100 nM (segundo estímulo), y capsaicina 1 μ M (tercer estímulo). (C) Cuantificación de la amplitud del transiente de Ca^{2+} obtenido tras el estímulo de capsaicina 100 nM y 1 μ M y pH 5. Los datos se representan como la media \pm S.E y fueron obtenidos al realizar el ratio de las corrientes obtenidas con las fluorescencias 380 y 340.

El porcentaje de células que expresaban TRPV1 en ambos clones celulares tras la inducción con antibiótico también se determinó por inmunofluorescencia en cultivos del clon $H11.7^{TRPV1wt}$ expuestos a 2 μ g/ml DOX durante 24 h. Tras este período las células se fijaron y se incubaron con un anticuerpo específico contra TRPV1 (α -TRPV1) y los núcleos se marcaron con DAPI. Como se muestra en la figura 6.5A, aproximadamente el 100 % de las células expresaban TRPV1. Además, la distribución subcelular del receptor

6. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES

TRPV1 en células $H11.7^{TRPV1wt}$ a las 48 h de inducción se caracterizó por una clara expresión del receptor en la membrana plasmática (figura 6.5B, rojo). La localización subcelular de TRPV1 coincide con el retículo endoplasmático (ER) como demuestra la tinción simultánea con un anticuerpo frente a calnexina, una chaperona específica del ER (figura 6.5C, verde).

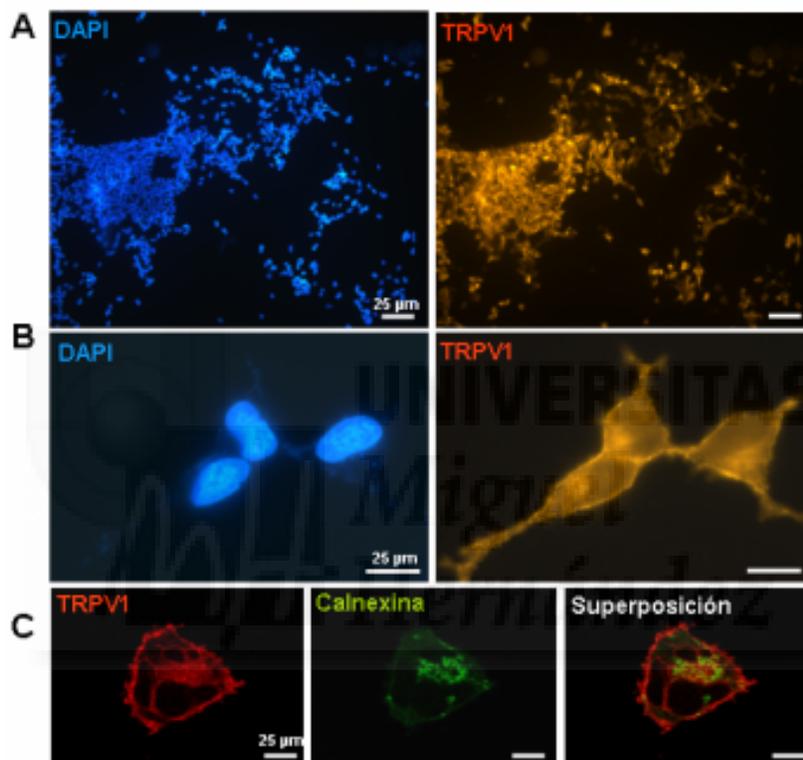


Figura 6.5: El clon $H11.7^{TRPV1wt}$ presenta una pureza de casi el 100 % de expresión de TRPV1 tras la inducción con DOX durante 24 horas. (B) $H11.7^{TRPV1wt}$ presenta una distribución clara del receptor en la membrana plasmática, así como en el ER (C). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal con los objetivos 10X (A), 63X (B) y 100X (C), TRPV1wt fue marcado con α -TRPV1 gp (rojo), el ER con α -calnexina (verde) y los núcleos con DAPI (azul). La barra de escala representa 25 μ m.

La visualización por microscopía de fluorescencia de la proteína fluorescente amarilla en células del clon $H11.1^{YFP-TRPV1}$ mostró que solamente un 20 % de las células expresaban visiblemente TRPV1 tras 48 h de inducción. La purificación del clon mediante un citofluorímetro de flujo FACS (por *Fluorescence-Activated Cell Sorter*) solamente logró un enriquecimiento del 60 %. No obstante, a pesar de que la marca de YFP aparecía en general más difusa, el marcaje de TRPV1 fue muy similar al observado para $H11.7^{TRPV1wt}$ (figura 6.6).

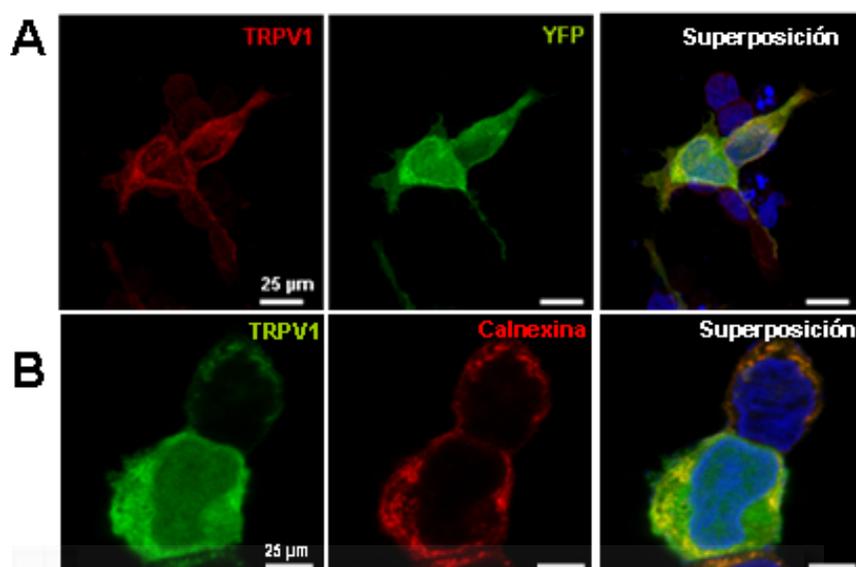


Figura 6.6: Imágenes tomadas en el microscopio confocal de la línea celular $HEK293^{YFP-TRPV1}$ donde se muestra la distribución de TRPV1 en la membrana plasmática (A) y la posterior colocalización en ER (B). Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal con los objetivos 63X (A) y 100X (B), TRPV1wt fue marcado con α -TRPV1, el ER con α -calnexina y los núcleos con DAPI. La barra de escala representa 25 μ m.

En conjunto podemos concluir que hemos generado dos clones a partir de células HEK293 que expresan de forma estable e inducible TRPV1 ó YFP-TRPV1, que ambas proteínas son funcionales, activándose en respuesta a pH ácido y al vanilloide capsaicina, al igual que el receptor silvestre expresado de forma transiente en la misma línea celular.

6.2. Generación de las líneas F11 doblemente estables e inducibles que expresan TRPV1wt e YFP-TRPV1

Similar al procedimiento descrito en el apartado anterior, las células F11 fueron transfectadas con el plásmido pTet-On y tras su selección durante 12 días con 500 μ g/ml G418 se obtuvieron 9 colonias cuya capacidad de inducción por DOX se analizó mediante la prueba de actividad de la luciferasa/ β -galactosidasa. Como se observa en la figura 6.7, en tres clones se alcanzaron unos incrementos de actividad > 50-veces. Dos de ellos, los clones F5 y F6, se seleccionaron para ser transfectados con los plásmidos TRPV1wt/pTRE2hyg o con YFP-TRPV1/pTRE2hyg. La selección de colonias que expresaban los plásmidos conteniendo TRPV1wt o YFP-TRPV1 se realizó durante 12 días con G418 (100 μ g/ml) e Hygromicina B (200 μ g/ml) y resultó en 28 clones que expresaban TRPV1wt y 8 clones que expresaban YFP-TRPV1.

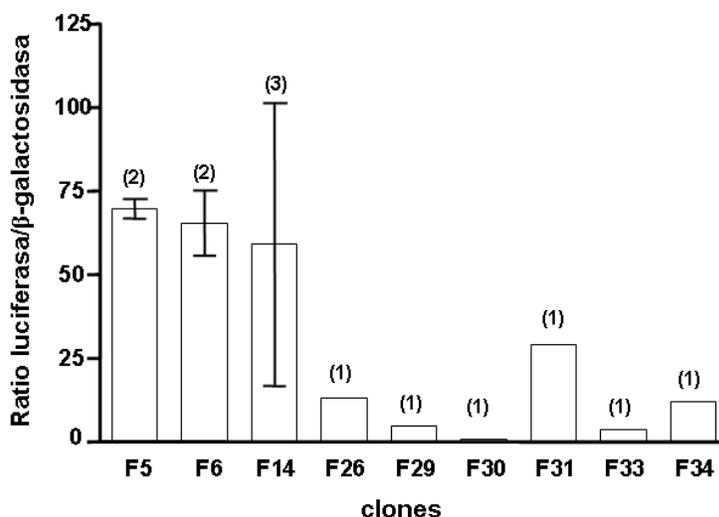


Figura 6.7: Selección de clones mediante los ensayos de luciferasa/ β -galactosidasa. Los clones F5 y F6 fueron seleccionados por sus altos valores de expresión de la actividad luciferasa/ β -galactosidasa tras la inducción con 2 μ g/ml DOX durante 48 horas. Los datos están representados como la media \pm S.E, en paréntesis se expresa el número de veces que se repitió el ensayo para cada uno de los clones.

Dado que, a diferencia de lo publicado por Goswami y col. (2004), en esta línea celular identificábamos una banda de aproximadamente 95 kDa inmunoreactiva al anticuerpo TRPV1 en muestras no inducidas, obviamos hacer los ensayos de expresión temporal de proteína y el análisis genómico de ADN por PCR y procedimos directamente a cribar funcionalmente los diferentes clones por *patch clamp* y por análisis de Ca^{2+} intracelular.

La figura 6.8 representa un resumen de las magnitudes de corriente evocada tras la infusión de un solo pulso de 1 μ M capsaicina durante 15 s a células desde un potencial en reposo V_h de -60 mV. Aquellos clones que presentaron una corriente más reproducible fueron seleccionados y corresponden con los números 7, 11, 12, 17 y 18 (todos ellos procedentes del clon pTet-On estable F6). De los 8 clones de la línea celular que expresa YFP-TRPV1, solamente fuimos capaces de registrar corrientes tras el estímulo de 1 μ M capsaicina durante 20 s en uno de ellos, el número 2 (que procede del clon pTet-On estable F6)(figura 6.8).

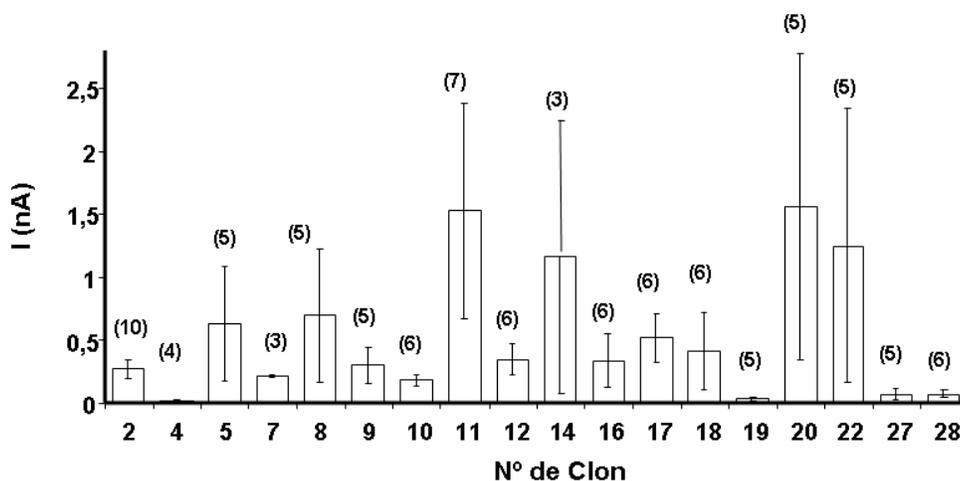


Figura 6.8: Registros de *patch clamp* obtenidos para los diferentes clones analizados de la línea $F11^{TRPV1wt}$ a las 48h post-inducción con DOX. En paréntesis se representa el número de células que se registraron para cada uno de los clones. Los datos están representados como la media \pm S.D.

La figura 6.9 ilustra las corrientes registradas a partir de los dos clones elegidos de la línea celular F11 que expresan TRPV1wt (figura 6.9A, panel superior) e YFP-TRPV1 (figura 6.9B, panel inferior). Las corrientes del clon que expresa YFP-TRPV1 en general fueron de menor magnitud que las corrientes de TRPV1wt. Así, $F6.11^{TRPV1wt}$ presentó unas corrientes con una amplitud de 1500 ± 1300 pA ($n = 7$) en respuesta a 20 s de estimulación con capsaicina $1 \mu\text{M}$, mientras que las del clon $F6.2^{YFP-TRPV1}$ fueron de 273.9 ± 244.73 pA ($n = 9$).

Los ensayos de Ca^{2+} i en ambos clones sirvieron no solo para confirmar estos resultados sino también para determinar el porcentaje de células que era capaz de responder a los estímulos de capsaicina, que en ambos casos resultó ser prácticamente del 100% (figura 6.9A-B). Además, tal como se observó en el análisis de *patch clamp*, el incremento de Ca^{2+} i del clon $F6.11^{TRPV1wt}$ resultó de mayor magnitud que la del clon $F6.2^{YFP-TRPV1}$ (0.88 u.a para WT respecto a 0.67 u.a de la proteína de fusión tras el primer estímulo). A la luz de estos resultados decidimos seleccionar los clones $F6.11^{TRPV1wt}$ y $F6.2^{YFP-TRPV1}$.

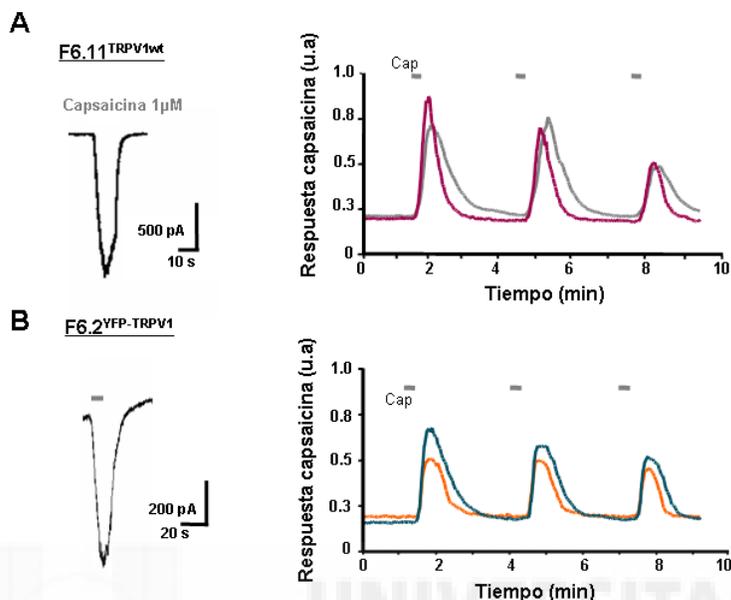


Figura 6.9: Los clones *F6.11^{TRPV1wt}* y *F6.2^{YFP-TRPV1}* fueron seleccionados por sus registros de *patch clamp*. (A) Registro del clon *F6.11^{TRPV1wt}* y (B) registro de *patch clamp* del clon *F6.2^{YFP-TRPV1}* tras 20 s de aplicación de capsaicina 1 μM de capsaicina (panel izquierdo) y análisis de Ca²⁺i (panel derecho) a las 24 horas post-inducción con DOX 2 μg/ml. Las respuestas del transiente de Ca²⁺ fueron obtenidas tras la aplicación de tres estímulos consecutivos de 20 s de duración de 1 μM capsaicina a los tiempos indicados con un segmento gris. Los gráficos muestran las respuestas de dos células representativas para cada uno de los clones.

En cuanto a la distribución de la proteína analizada por microscopía de fluorescencia, el marcaje obtenido en el clon *F6.11^{TRPV1wt}* resultó ser más difuso que los obtenidos en las líneas celulares derivadas de HEK293. No obstante, también se observó una distribución del receptor TRPV1 en la membrana plasmática y en el ER.

Capítulo 7

Interacción de TRPV1 y GABARAP

Mediante cribado por doble híbrido de levadura (Y2H) de una genoteca de DRG de rata y utilizando como cebo el dominio amino terminal (aminoácidos 1-414) de TRPV1 de rata, Nt-TRPV1, se identificaron diferentes proteínas que potencialmente interaccionaban con el receptor. Entre ellas destacan las proteínas vesiculares Snapin y Synaptotagmin IX, implicadas en la exocitosis y tráfico vesicular regulado por Ca^{2+} (Morenilla-Palao y col., 2004). Otra de las proteínas aisladas de este cribado fue la proteína asociada al receptor GABA_A (GABARAP). El objetivo principal de este trabajo ha sido confirmar tal interacción y determinar si como consecuencia de esta asociación se producían alteraciones en el tráfico o las propiedades biofísicas del receptor TRPV1. Parte de los resultados que se recogen en esta tesis ya han sido publicados (Laínez y col., 2010).

7.1. Interacción *in vitro* de TRPV1 y GABARAP

Para intentar confirmar la posible interacción entre TRPV1 y GABARAP, en primer lugar realizamos ensayos de arrastre de proteínas *in vitro*. Para ello fusionamos el cDNA que codifica GABARAP en pauta al cADN de GST en el vector pGEX-4Ti, resultando el plásmido que denominamos GST-GABARAP. La proteína de fusión GST-GABARAP se purificó a partir de extractos de *E. coli* C41 transformados con este plásmido que se inmovilizaron y purificaron sobre resinas de *Glutathione Sepharose 4B*. Como control, se inmovilizó la proteína GST preparada a partir de extractos de bacterias transformadas con el plásmido pGEX-4Ti vacío. Como fuente de Nt-TRPV1 se utilizó el plásmido Nt-TRPV1-*His*₆, que contiene el dominio citosólico N-terminal de TRPV1 al que se ha fusionado una cola de histidinas en el vector pET-22b (Qiagen), quedando la cola de *His*₆ en el extremo carboxilo terminal (Morenilla-Palao y col., 2004). En el ensayo de arrastre se inmovilizó GST-GABARAP o GST y se incubó con un extracto de bacterias que expresaban Nt-TRPV1-*His*₆. Como se observa en el *western blot* de la figura 7.1A, en la fracción inmunoprecipitada se detectó una banda de 50 kDa correspondiente a Nt-TRPV1-*His*₆ en el carril donde se había inmovilizado GABARAP

7. INTERACCIÓN DE TRPV1 Y GABARAP

en contraste a la sefarsa conteniendo únicamente GST (control).

Dado que existen diversos dominios de GABARAP involucrados en la interacción con la subunidad gamma $GABA_A$ o con tubulina, decidimos ensayar si existía un dominio específico de GABARAP que se uniese a TRPV1. Para ello, hicimos dos construcciones de fusión con GST: una correspondiente al dominio N-terminal de GABARAP, que denominamos GST- Δ 37-112, y la otra correspondiente al dominio C-terminal de GABARAP o GST- Δ 1-36. Los ensayos de arrastre con ambas construcciones, incluidos en la figura 7.1A, muestran que fue el dominio C-term de GABARAP, GST- Δ 1-36, el que interaccionaba con el dominio Nt-TRPV1.

Una vez confirmada la interacción *in vitro* entre Nt-TRPV1 y GABARAP, quisimos comprobar si la proteína completa de TRPV1 también era capaz de unirse a GABARAP. GST-GABARAP y su control GST se inmovilizaron y se incubó con un extracto celular de la línea doblemente estable e inducible $H11.7^{TRPV1wt}$ (inducida durante 48 h con DOX). Como se ilustra en la figura 7.1B, TRPV1 interacciona selectivamente con GABARAP. También GABARAP fue capaz de unir TRPV1 nativo procedente de extractos de DRGs y cerebro de rata (figura 7.1C). Sorprendentemente, cuando se evaluó la afinidad por los distintos dominios de GABARAP se observó que, a diferencia de los ensayos con el dominio citosólico, el receptor TRPV1 completo expresado heterológamente o nativo tiene más afinidad por el dominio N-terminal de GABARAP (GST- Δ 37-112) (figuras 7.1B y D, respectivamente).

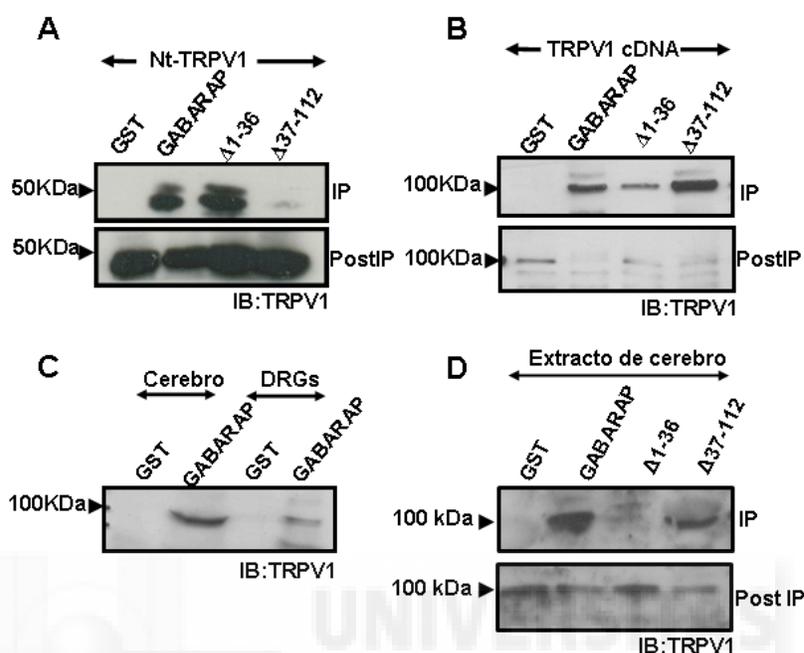


Figura 7.1: TRPV1 interacta *in vitro* con GABARAP. (A) Ensayo de arrastre de proteínas en el que se inmovilizó GST, GST-GABARAP, GST- Δ 1-36 y GST- Δ 37-112 y se incubaron con el dominio citosólico Nt-TRPV1. Se observa la interacción con GABARAP y el dominio Δ 1-36. (B) Proteínas inmovilizadas como en (A), pero la incubación se realizó con la proteína completa de TRPV1. Se observa también la interacción con GABARAP y con la delección Δ 37-112. (C) Ensayo de arrastre de proteínas inmovilizando GST y GST-GABARAP e incubándolas con extractos de cerebro y DRG. En ambos casos se observa la interacción de TRPV1 con GABARAP. (D) Proteínas inmovilizadas como en (A) e incubadas con extracto de cerebro de rata. Tanto GABARAP como la delección Δ 37-112 interactúan con TRPV1.

Esta posible incoherencia entre los dominios de GABARAP implicados en la interacción con TRPV1 según se utilice el dominio del receptor N-terminal o la proteína completa nos sugiere que en la interacción de TRPV1 con GABARAP pueden estar involucradas otras conformaciones de los dominios citosólicos del canal, diferentes dominios citosólicos de proteínas y/o otras proteínas citosólicas presentes únicamente en células eucariotas.

7.2. Interacción *ex vivo* de TRPV1 y GABARAP

Con el objeto de determinar si existe una interacción directa *in vivo* entre ambas proteínas empleamos la técnica FRET (del inglés *Fluorescence resonance energy transfer*) *in vivo* entre la proteína fluorescente cian (CFP), que se emplearía como

7. INTERACCIÓN DE TRPV1 Y GABARAP

dador, y la proteína fluorescente amarilla (YFP), como aceptor. Para ello, preparamos varias construcciones de fusión entre TRPV1 y GABARAP y las proteínas fluorescentes. Cantidades equimolares de plásmidos que expresaban diversas combinaciones de los pares de proteína fluorescentes: CFP-TRPV1 con YFP-GABARAP, o YFP-TRPV1 con CFP-GABARAP, se transfectaron en células HEK293. Como control de FRET se utilizó como dador YFP-TRPV1 y como aceptor CFP-TRPV1, o CFP con YFP. FRET se detectó como fluorescencia de emisión de YFP ($\lambda = 535$ nm) tras excitar a la longitud de onda de CFP ($\lambda = 440$ nm). La medida registrada a 535 nm (Ff) en función de la señal medida a 480 nm (Df) usando el filtro de excitación de FRET ($\lambda = 440$ nm) se muestra en la figura 7.2A. Los datos se ajustaron a una línea cuya pendiente (Ff/Df) refleja la eficacia de FRET (Gordon y col., 1998).

Como observamos en la figura 7.2A, los datos obtenidos en células transfectadas con CFP-TRPV1/YFPGABARAP presentan unos valores de Ff/Df de 2.25 ± 0.26 (n=5), un valor significativamente superior a los obtenidos en las células control que fueron transfectadas con CFP e YFP, cuyo valor fue de 0.9 ± 0.02 (n=5) o con el control de CFP e YFP-GABARAP cuyos valores eran de 0.95 ± 0.05 , n=5). Como control positivo se transfectó CFP-TRPV1 e YFP-TRPV1 que resultaron en valores de 1.24 ± 0.05 , n=4. Nuestros resultados demuestran que las proteínas de fusión CFP-TRPV1 e YFP-GABARAP se encuentran a una distancia lo suficientemente cerca para que se produzca FRET, apoyando la posibilidad de una interacción directa entre ambas proteínas. Este ensayo fue realizado por Mari Carmen Lidón.

Mari Carmen Lidón Hernández

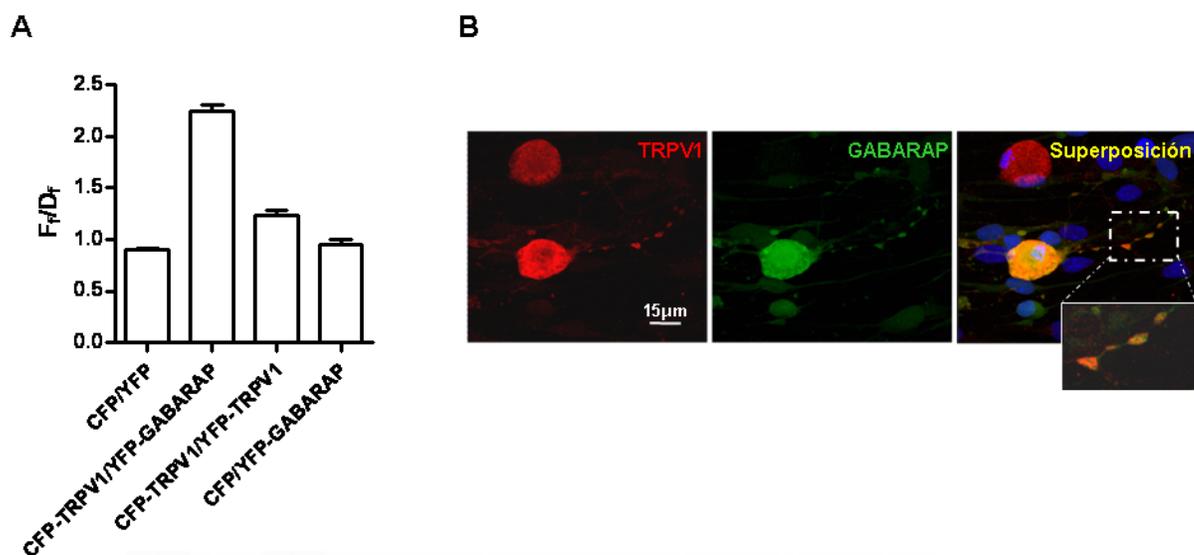


Figura 7.2: Interacción de TRPV1 y GABARAP *ex vivo*. (A) CFP-TRPV1 e YFP-GABARAP interactúan en células vivas, como se demuestra por FRET en células HEK293 transfectadas con cantidades equimolares de ambas proteínas fusionadas a los fluoróforos CFP e YFP. Los experimentos control se realizaron con diferentes pares de proteínas: CFP e YFP, CFP e YFP-GABARAP y CFP-TRPV1 e YFP-TRPV1 como control positivo. (B) Colocalización de TRPV1 y GABARAP en cultivos primarios de DRGs de ratas neonatales por inmunofluorescencia. El panel de la izquierda representa a TRPV1 marcado con el anticuerpo específico que reconoce TRPV1, en el panel central está marcado GABARAP (verde) y en la imagen de la derecha se representan ambas proteínas superpuestas. TRPV1 y GABARAP colocalizan en el cuerpo celular de las DRGs y en los procesos sinápticos (recuadro ampliado). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). La barra de escala representa 15 μm .

El siguiente paso fue el de proceder a investigar la distribución de las proteínas GABARAP y TRPV1 en cultivos primarios de DRG de rata neonatal a través de ensayos de inmunofluorescencia (figura 7.2B). Para ello, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos con anticuerpos específicos que reconocían TRPV1 y GABARAP. La inmunoreactividad de ambos anticuerpos permitió observar la distribución subcelular de las proteínas en este sistema celular. Como se aprecia en las imágenes, ambas proteínas colocalizan tanto en el cuerpo de la DRG como en los procesos sinápticos, en los que observamos unos acúmulos delimitados. Este ensayo fue realizado por Judith Estévez.

7.3. La co-expresión de TRPV1 y GABARAP altera la expresión del receptor

Está descrito que GABARAP regula la densidad de diferentes neurotransmisores en la membrana plasmática (Chen y col., 2000; Cook y col., 2008), por lo que nos propusimos investigar si la interacción entre TRPV1 y GABARAP provocaba algún efecto en la expresión del receptor en la membrana.

Para determinar si la co-expresión de GABARAP producía una alteración en la expresión de TRPV1 en la membrana plasmática, realizamos ensayos de biotilación de proteínas de membrana. Células HEK293 se transfectaron con plásmidos que codificaban TRPV1wt y GABARAP. Como se observa en la figura 7.3, la coexpresión de ambas proteínas aproximadamente duplicó la expresión de TRPV1 en la membrana plasmática comparándolo con la expresión de TRPV1 con YFP (control) (figura 7.3A). Curiosamente, la expresión de TRPV1 en fracción citosólica también aumentó casi tres veces comparado con el control. Como control de carga por pocillo se detectó beta-actina, que se utilizó para normalizar la intensidad de TRPV1. La cuantificación de proteína de un total de tres experimentos diferentes se representa en la figura 7.3B.

Adicionalmente se demostró el aumento de TRPV1 en la membrana mediante una inmunocitoquímica en células transfectadas HEK293 no permeabilizadas, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo extracelular de TRPV1. Como se ilustra en la figura 7.3C, se confirmó un aumento de fluorescencia correspondiente a TRPV1 (rojo) en la membrana plasmática en células co-transfectadas con GABARAP (verde). Curiosamente, ese aumento se traducía en un incremento de regiones de mayor fluorescencia correspondientes a TRPV1 en la membrana plasmática (regiones ampliadas de la fotografía).

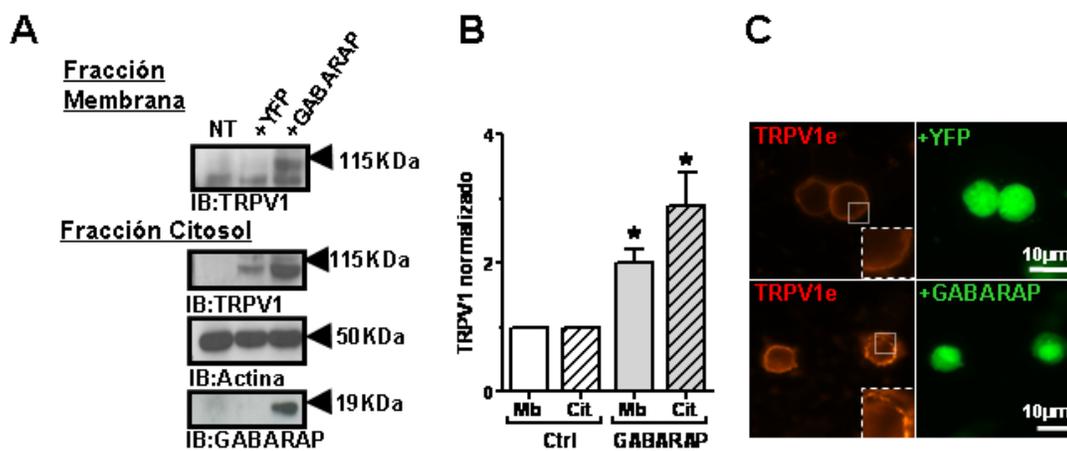


Figura 7.3: GABARAP aumenta la expresión en membrana y citosol de TRPV1. (A) *Western blot* en el que se muestra la expresión en membrana y citosol de TRPV1 cuando es coexpresado con GABARAP. NT es el control de células no transfectadas. Células HEK293 fueron transfectadas con TRPV1 más YFP o más GABARAP. Las membranas plasmáticas se marcaron con biotina y posteriormente se aisló la fracción biotinilada. (B) Cuantificación de 3 biotinilaciones independientes con resultados similares. Los datos se expresan como la media \pm S.E. * $P < 0.05$ (C) Inmunoquímica realizada en células HEK293 no permeabilizadas donde se compara el control (YFP + TRPV1) con GABARAP (TRPV1 + GABARAP), la membrana fue marcada con un anticuerpo que reconoce un epítipo extracelular de TRPV1 (TRPV1e). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia con un objetivo 40X.

7.4. Estudio de la cinética de degradación del receptor TRPV1 en células que co-expresan GABARAP

Para comprender si el aumento de la expresión del receptor TRPV1 en la membrana plasmática se producía por alteraciones en la internalización y posterior degradación del receptor en células que expresaban GABARAP, realizamos ensayos de biotinilación reversible a diferentes tiempos (figura 7.4A). Este ensayo consiste en marcar las proteínas de membrana con biotina a 4°C para evitar la endocitosis y, tras lavar el exceso de biotina, permitir el tráfico de membrana incubando las células a 37°C a diferentes tiempos (0, 60 y 90 min). Transcurrido esos tiempos, se realizó una eliminación de la biotina remanente en la superficie y se procedió a la lisis celular. En la figura 7.4A, panel superior, se presenta un *western* representativo con la fracción biotinilada. A 4°C sin eliminar la biotina de membrana se observa una cantidad elevada de TRPV1 que se corresponde al 100% de la proteína, mientras que a tiempo cero con eliminación de biotina se corresponde al 0%. En general, la cinética de internalización de TRPV1 en estas condiciones fue muy lenta. Interesantemente, a diferencia de las condiciones

7. INTERACCIÓN DE TRPV1 Y GABARAP

control en las que no se aprecia un aumento de internalización durante los 90 min analizados, la fracción de TRPV1 internalizada aumentó un 20 % aproximadamente cuando GABARAP está presente (figura 7.4B), lo que indica que existe un reciclaje ligeramente superior del receptor en presencia de GABARAP.

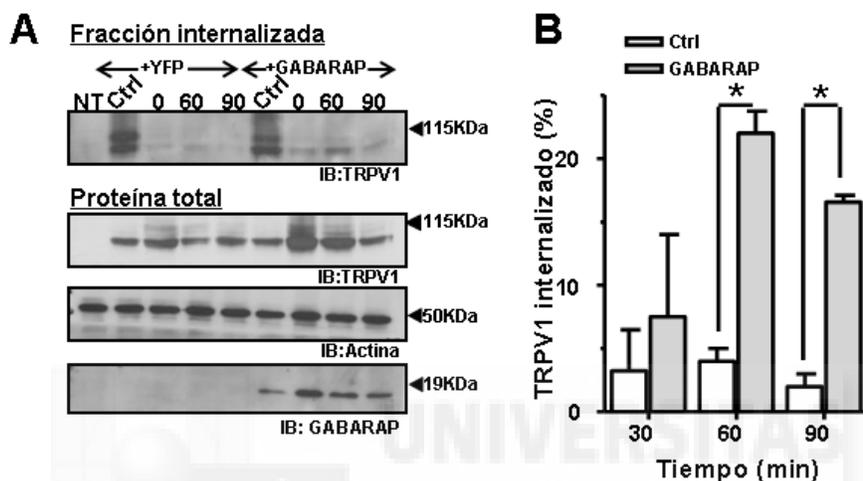


Figura 7.4: GABARAP aumenta la internalización de TRPV1. (A) Proteínas de la superficie fueron biotiniladas e incubadas a 37°C durante diferentes tiempos para permitir su internalización. La fracción no internalizada a distintos tiempos fue lavada y se procedió a la lisis celular. Los *western blots* representan la cantidad de proteína biotinilada de TRPV1 sin incubación ni eliminación de la biotina (Ctrl), la cantidad de receptor biotinilado sin incubación y justo después de eliminar biotina (0 min), y la cantidad de TRPV1 biotinilado e internalizado a diferentes periodos de tiempo (hasta 90 min). (B) Resumen de 4 experimentos independientes de internalización, los datos se representan como media \pm S.E. * $P < 0.05$.

La siguiente pregunta que nos planteamos fue si la mayor internalización de TRPV1 cuando GABARAP está presente se acompañaba por un incremento en la degradación del receptor. Para determinar la tasa o velocidad de degradación se utilizó una construcción que incluía un epítipo hemaglutinina (HA) que permitiría la posterior inmunoprecipitación del receptor TRPV1-HA radiomarcado metabólicamente. Se realizó un ensayo de pulso-caza con una mezcla de $Met^{[35S]}/Cys$ en el medio y tras su retirada, se evaluó la cantidad de TRPV1-HA marcado a diferentes tiempos (figura 7.5). Este ensayo se hizo en presencia de cicloheximida para inhibir la síntesis *de novo* de proteínas. Como se observa en la figura 7.5, la cotransfección de TRPV1-HA y GABARAP resultó en unos valores de radiomarcaje, tanto iniciales como a distintos tiempos, superiores a los obtenidos en condiciones control, consistente con el aumento de la expresión de TRPV1-HA en estas condiciones (como se mostró en el apartado 7.3). El decaimiento de marcaje de los TRPV1-HA radio-marcados, tanto coexpresados con GABARAP o en condiciones control, se pudieron ajustar a un cinética de primer orden de tipo $N = N_o * exp^{(-k*t)}$ donde N representa la cantidad de TRPV1-HA mar-

7.5. GABARAP modula la activación de TRPV1 por capsaicina

cado radioactivamente en cada tiempo t , N_o es la cantidad de TRPV1 desde la que se partió a $t=0$ y k es la constante de decaimiento característica para cada sustancia y/o condición. La constante de decaimiento k resultó tener valores similares en ausencia y presencia de GABARAP indicando que la cinética de degradación no estaba alterada en presencia de la proteína GABARAP.

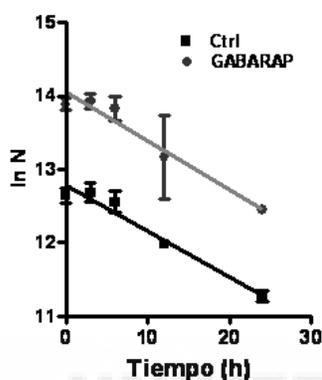


Figura 7.5: Ensayo metabólico de pulso-caza en células HEK293 que expresan el epítipo-HA fusionado a TRPV1 más GABARAP (o más YFP como control). Las células fueron marcadas con $Met^{[35S]}/Cys$ y capturadas a diferentes periodos de tiempo. El tiempo transcurrido de desaparición de los receptores marcados se ajustó a $N = N_o * exp(-k*t)$ para obtener la pendiente o constante de decaimiento k y el tiempo medio $T_{1/2} = \ln 2/k$. La pendiente calculada k fue de $-0.05 \pm 0.01 h^{-1}$ en células control comparado con $-0.06 \pm 0.02 h^{-1}$ en células que tenían GABARAP.

En conjunto, podemos concluir que GABARAP contribuye al incremento de expresión del receptor en la membrana plasmática, y modula ligeramente el reciclaje del mismo entre la membrana plasmática y compartimentos intracelulares sin alterar la tasa de degradación del receptor.

7.5. La co-expresión de GABARAP con TRPV1 en células HEK293 modula la activación del receptor por el vanilloide capsaicina

Para investigar a nivel funcional el efecto que tiene GABARAP sobre TRPV1, se realizaron ensayos de la actividad del canal mediante electrofisiología en células HEK293 que coexpresaban TRPV1 y GABARAP (o TRPV1 con YFP en muestras control). Dado que el receptor se puede activar en respuesta a estímulos de distinta naturaleza, decidimos hacer una caracterización de la respuesta a tres tipos de estímulos diferentes: a voltaje, pH ácido y vanilloides. Los ensayos de electrofisiología fueron realizados por Dr. Sergio Láñez y Dr. Pierluigi Valente.

En primer lugar se analizó la respuesta del receptor TRPV1 en función del voltaje en presencia o ausencia de GABARAP partiendo de un voltaje en reposo (Vh) de -0 mV.

7. INTERACCIÓN DE TRPV1 Y GABARAP

Se aplicó un protocolo de pulsos cuadrados de voltaje desde -120 mV hasta +160 mV con incrementos de 20 mV y una pausa de 5 s entre los diferentes pulsos (figura 7.6A). La activación de TRPV1 con este protocolo de voltaje, resultó en una respuesta de tipo rectificadora, es decir, con una baja o nula activación a voltajes negativos mientras que la respuesta aumenta de manera pronunciada a voltajes más positivos. La cinética de las corrientes de TRPV1 activadas por voltaje en condiciones control como las de células que co-expresaban GABARAP resultaron indistinguibles (ver trazas en panel A). Por otro lado, la densidad de corriente obtenida a +160 mV fue ligeramente menor para las células que contenían TRPV1 y GABARAP (0.27 ± 0.02 nA/pF, $n=34$), comparado con las células control (0.32 ± 0.02 nA/pF, $n=37$). Las corrientes observadas en el panel A muestran unas cinéticas de activación y corrientes de repolarización muy similares, por lo que calculamos a partir de esas corrientes las curvas de conductancia-voltaje (G-V) a partir del ajuste de la conductancia relativa a una ecuación de Boltzmann (figura 7.6B). La activación (G/G_{max}) máxima obtenida a +160 mV fue muy similar en ambos casos al igual que la $V_{0,5}$ y a_n , cuyos valores fueron de 107 ± 4 mV ($n=10$) y 37 ± 2 mV ($n=10$) en células control respectivamente y 129 ± 11 mV ($n=11$) y 39 ± 9 mV ($n=11$) para las células con GABARAP.

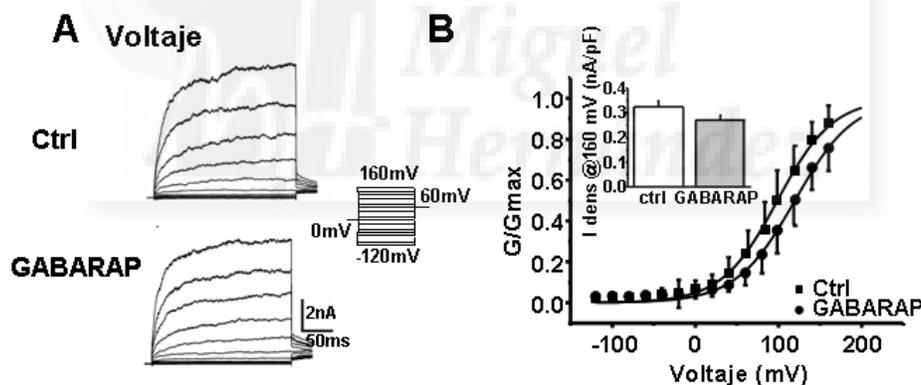


Figura 7.6: GABARAP no altera las cinéticas de apertura y las corrientes de TRPV1 tras la activación con voltaje. (A) Respuesta frente a pulsos cuadrados de voltaje en células HEK293 transfectadas con TRPV1 y TRPV1 más GABARAP. (B) Representación de la relación G-V y de conductancia de TRPV1 en presencia (gris) y ausencia (blanco) de GABARAP.

A continuación, la activación del canal en presencia y ausencia de GABARAP se comparó utilizando como estímulo pH ácido (pH=5.3), manteniendo un voltaje constante de -60 mV. Como se muestra en la figura 7.7A-B, las respuestas en magnitud y la forma de las trazas de TRPV1 activado por pH ácido no se vieron modificadas por la expresión de GABARAP. La densidad de corriente calculada fue de 470 ± 50 pA/pF ($n=15$) en condiciones control (co-transfectadas con YFP), y de 467 ± 59 ($n=13$) en células co-transfectadas con GABARAP.

Asimismo, evaluamos la amplitud y la tasa de desensibilización ante varios estímulos

7.5. GABARAP modula la activación de TRPV1 por capsaicina

cortos y consecutivos de pH ácido, que se intercalaron por períodos de lavado de 1 min. Las respuestas observadas en ambas situaciones fueron similares, lo que sugiere que GABARAP no altera la desensibilización de TRPV1 inducida por pH ácido.

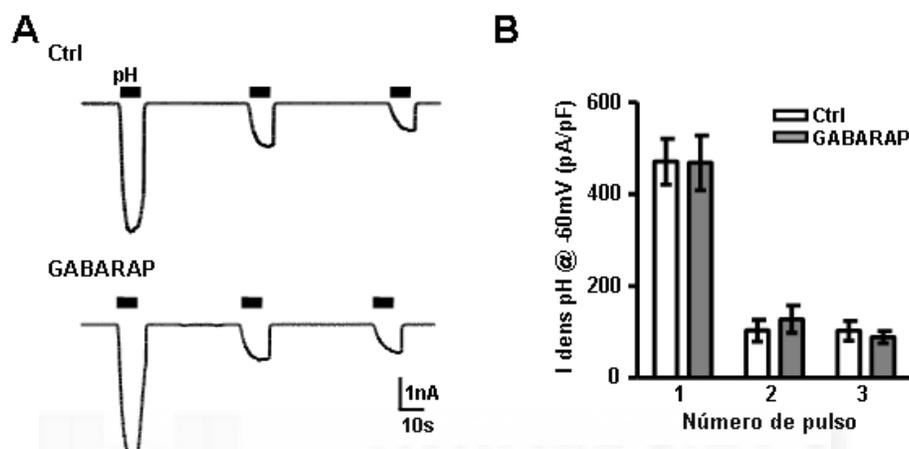


Figura 7.7: GABARAP no altera las cinéticas de apertura y las corrientes de TRPV1 tras la activación con pH ácido. (A) El estímulo de pH ácido (pH=5.3) produce unas corrientes internas similares a -60 mV después de 3 pulsos consecutivos de 10 s en células control y con GABARAP. La densidad de corriente calculada para los 3 pulsos de pH muestra una tasa de desensibilización igual para las células control y con GABARAP, $n > 13$ células fueron ensayadas para cada grupo. (B) Representación gráfica de las corrientes obtenidas en cada uno de los 3 pulsos de pH 5.3 para las células control (blanco) y con GABARAP (gris).

La respuesta al agonista capsaicina se aplicó mediante una infusión de capsaicina 1 μM durante 1 min a un voltaje constante de -60 mV. La magnitud de las corrientes obtenidas en respuesta al vanilloide en células que co-expresaban GABARAP fueron significativamente menores que las corrientes observadas en condiciones control (figura 7.8). Específicamente, el análisis cuantitativo de la densidad de corriente demostró una disminución significativa, casi la mitad de corriente, en respuesta a capsaicina en presencia de GABARAP, pasando de -0.064 ± 0.012 nA/pF ($n=25$) a -0.028 ± 0.004 nA/pF ($n=28$) en células control. Sin embargo, esta diferencia en la magnitud de la respuesta no se apreciaba cuando se aplicó una elevada concentración del agonista (10 μM).

La diferente respuesta a bajas concentraciones del vanilloide se confirmó mediante ensayos de calcio intracelular. El protocolo aplicado consistió en tres pulsos de 10 s de duración con tres concentraciones sucesivas de capsaicina (0.01, 0.1 y 1 μM) intercaladas por un período de lavado de 2 min (figura 7.9). Como se observa en el gráfico que recoge la cuantificación de las respuestas a las distintas concentraciones del vanilloide, la co-expresión de GABARAP produjo una disminución de aproximadamente el 50 % en el transiente de calcio con capsaicina 0.1 y 1 μM . A la menor concentración utilizada del agonista no se observaron significativas. Estos datos sugieren que

7. INTERACCIÓN DE TRPV1 Y GABARAP

la presencia de GABARAP modula la eficacia y/o potenciación de capsaicina sobre el receptor.

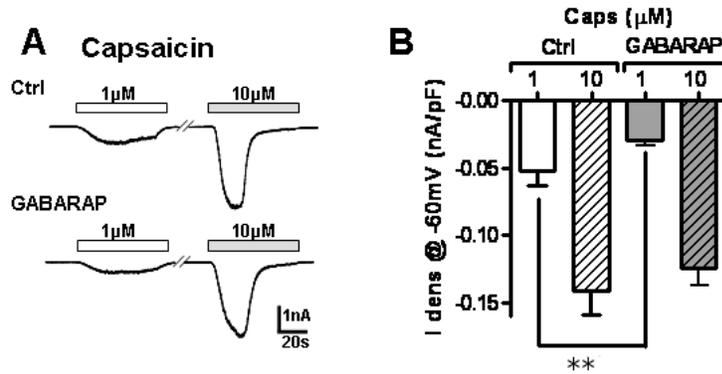


Figura 7.8: GABARAP altera las cinéticas de apertura y las corrientes de TRPV1 tras la activación con capsaicina. (A) Corrientes registradas utilizando 1 pulso de 1 μM de capsaicina, intercalado durante 20 s con un segundo pulso de 10 μM . La reducción de las corrientes inducidas por capsaicina en células transfectadas con GABARAP, se observan en el pulso de 1 μM de capsaicina, pero no a altas concentraciones del agonista. (B) Representación de los registros anteriores obtenidos. **** $P < 0.01$** .

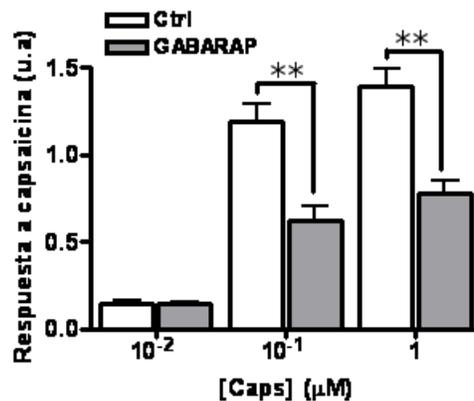


Figura 7.9: GABARAP disminuye la magnitud del transiente de Ca^{2+} de TRPV1 cuando es activado por bajas concentraciones de capsaicina (0.01 a 1 μM). Se observa una clara disminución de la amplitud de respuesta a capsaicina en las células transfectadas con GABARAP. Para cada condición se registraron al menos $n > 10$ y $N > 3$. **** $P < 0.01$** .

7.6. El silenciamiento de GABARAP modula la activación de TRPV1 por el vanilloide capsaicina en cultivos primarios de DRGs

La diferencia en la respuesta de TRPV1 a capsaicina en función de la presencia o no de GABARAP también se ensayó en cultivos primarios de DRGs que habían sido transfectadas con un RNA de interferencia (siRNA) específico para GABARAP o, como control, cultivos transfectados con una secuencia desordenada del siRNA anterior, (siRNAsc, del inglés *scrambled*). Ambos siRNA se marcaron fluorescentemente con una sonda fluorescente $C\gamma 3$ para evaluar solamente las células transfectadas. Como observamos en la figura 7.10A-B, la aplicación de dos diferentes concentraciones de capsaicina (100 nM y 1 μ M) resultó en una tendencia a registrar mayores transientes en células silenciadas con GABARAP. Los valores obtenidos con el siRNA control fueron de 0.28 ± 0.1 (n=11) y 0.36 ± 0.1 (n=8) con capsaicina 100 nM y 1 μ M, respectivamente, mientras que utilizando el siRNA de GABARAP los valores fueron de 0.35 ± 0.1 (n=13) y 0.42 ± 0.1 (n=12) con capsaicina 100 nM y 1 μ M. No obstante, dada la elevada variabilidad general de la magnitud de respuestas en estos cultivos, éstas no alcanzaron nivel de significancia.

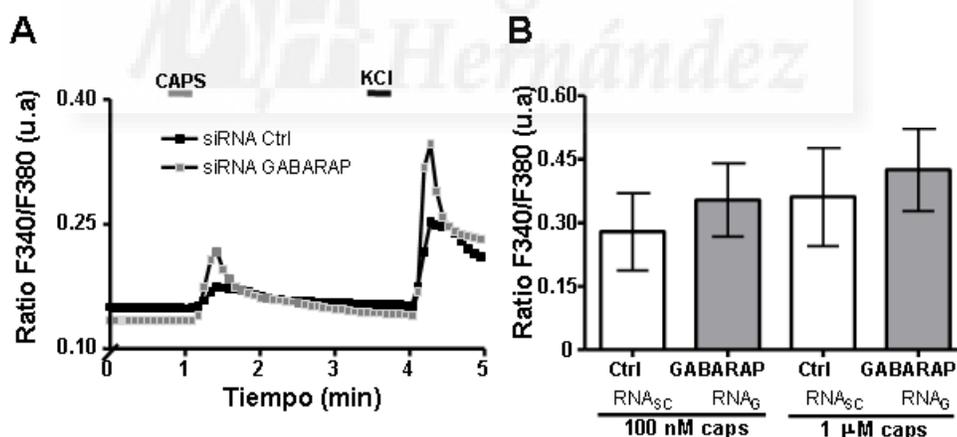


Figura 7.10: El silenciamiento de GABARAP provoca un aumento en la función de TRPV1. (A) Trazas representativas obtenidas tras la aplicación de 100 nM capsaicina (primer pulso, línea gris) y 40 mM KCl (segundo pulso, línea negra). Los registros se obtuvieron en DRGs de ratas postnatales transfectadas con los siRNA control (negro) y el RNA específico de GABARAP (RNA_G) que está marcado con una sonda fluorescente $C\gamma 3$ (rojo). Los datos se representan como la media \pm S.E. (B) La cuantificación de las respuestas tanto a 100 nM como a 1 μ M capsaicina no resultaron en diferencias significativas entre las DRGs transfectadas con el RNA control (RNA_{sc}) y el RNA_G .

7.7. Mecanismos que intervienen en la modulación de la activación de TRPV1 por GABARAP

Dado que no se detectaban cambios en la densidad de corriente cuando se activaba por voltaje o con pH ácido sino solamente con capsaicina, decidimos estudiar si la presencia de GABARAP provocaba un cambio de la sensibilidad aparente del receptor por capsaicina. Para ello, se realizaron curvas dosis-respuesta utilizando rampas de voltaje desde -100 mV hasta +120 mV a diferentes concentraciones de capsaicina y tomando el valor obtenido a +120 mV. Como se ilustra en la figura 7.11A, en células que co-expresan GABARAP los valores de la concentración efectiva media (EC_{50}) están desplazados hacia la derecha ($EC_{50}=1.4 \pm 0.12 \mu\text{M}$ y $n_H=1.8 \pm 0.1$ ($n=17$) para células positivas a GABARAP comparado con $EC_{50}=0.45 \pm 0.16 \mu\text{M}$ y $n_H=1.2 \pm 0.1$ ($n=20$) en células control). A concentraciones elevadas (10-100 μM) de capsaicina no se observaron diferencias significativas en las corrientes máximas obtenidas.

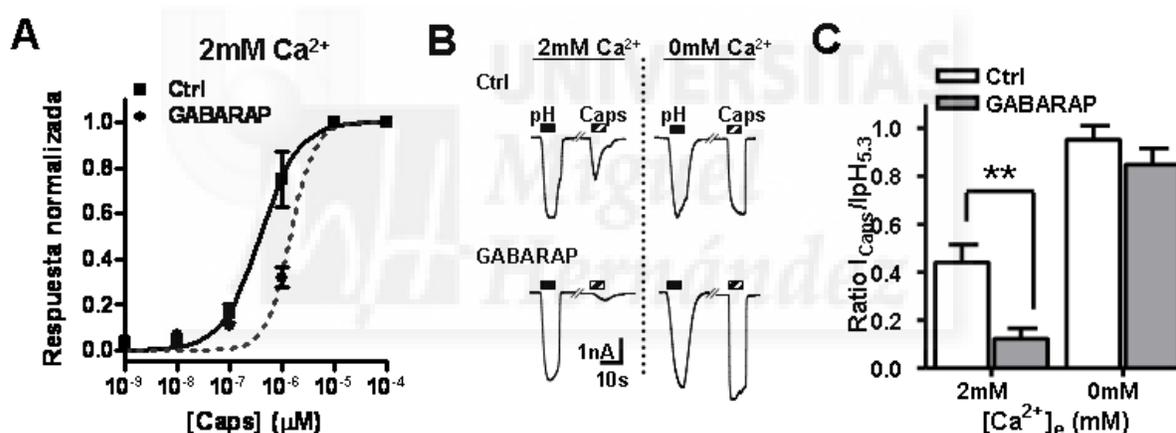


Figura 7.11: GABARAP disminuye la magnitud de las corrientes de TRPV1 cuando se activa por bajas concentraciones de capsaicina en presencia de iones Ca^{2+} . (A) Curvas dosis respuesta de la activación de TRPV1 en presencia (●) o ausencia (■) de GABARAP, y en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. Las corrientes fueron evocadas con rampas que van de -100 a +120 mV con diferentes concentraciones de capsaicina. Los datos representados se obtuvieron a +120 mV. Las corrientes se normalizaron y representan en función de la concentración de capsaicina y se ajustaron a una ecuación de Michaelis-Menten para obtener la EC_{50} y el coeficiente de Hill de activación. (B) Trazas de corriente representativas obtenidas con pH ácido y con 1 μM capsaicina en una misma célula. Los registros tuvieron lugar en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. (C) Corrientes patchnormalizadas de los datos obtenidos en la gráfica B. Para cada condición se registraron al menos $n>10$ y $N>3$. $**P < 0.01$.

Como la respuesta de TRPV1 a capsaicina depende estrechamente de la presencia de Ca^{2+} extracelular, nos preguntamos si la presencia de Ca^{2+} jugaba un pa-

pel importante en las diferencias observadas en la afinidad de capsaicina. Por ello, se registraron en la misma célula la magnitud de las respuestas a pH ácido y a $1 \mu\text{M}$ capsaicina, en presencia o ausencia de 2mM Ca^{2+} . Como se puede observar en las trazas de la figura 7.11B, se observó una menor corriente evocada por capsaicina en las células que co-expresan GABARAP en presencia de Ca^{2+} extracelular. Para cuantificar estas diferencias, la magnitud de las corrientes de capsaicina se normalizó a las corrientes evocadas por pH ácido para cada célula. Como se muestra en la figura 7.11C, la diferente respuesta a capsaicina se observó exclusivamente en presencia de Ca^{2+} extracelular ya que en su ausencia no se observó ninguna diferencia en función de la presencia o no de GABARAP.

Además, como se demuestra en la figura 7.12, la curva dosis-respuesta en ausencia de Ca^{2+} extracelular produjo valores similares de EC_{50} en respuesta a capsaicina en células control y en células transfectadas con GABARAP ($EC_{50}=0.61 \pm 0.14 \mu\text{M}$ y $n_H=1.1 \pm 0.1$ ($n=17$) en células con GABARAP, frente a $EC_{50}=0.52 \pm 0.11 \mu\text{M}$ y $n_H=1.1 \pm 0.1$ ($n=21$) en células control).

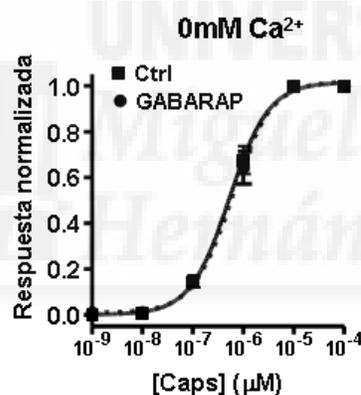


Figura 7.12: En ausencia de iones de Ca^{2+} , la presencia de GABARAP no afecta las corrientes de TRPV1. Curvas de dosis respuesta de la activación de capsaicina en células control (■) y con GABARAP (●). Para cada condición se registraron al menos $n>10$ y $N>3$.

En resumen, los resultados descritos demuestran que la coexpresión de GABARAP disminuye la respuesta de TRPV1 en presencia de Ca^{2+} extracelular, lo que sugiere que GABARAP podría también regular la desensibilización del receptor en respuesta a capsaicina.

7.8. GABARAP altera la taquiflaxia inducida por capsaicina

Puesto que GABARAP afecta la respuesta inducida por capsaicina, nos propusimos analizar el efecto de esta proteína citosólica sobre la desensibilización del canal, aplicando un protocolo de pulsos repetitivos de $1 \mu\text{M}$ capsaicina intercalados con lavados

7. INTERACCIÓN DE TRPV1 Y GABARAP

de 1 min. Las corrientes se registraron aplicando rampas de voltaje entre -80 a +80 mV. Como se muestra en la figura 7.13A y C, la aplicación sucesiva de capsaicina en las células control, produjo una disminución de la corriente máxima obtenida tras la aplicación de pulsos consecutivos del agonista. El valor máximo obtenido para cada uno de esos pulsos se ajustó a una exponencial de decaimiento de primer orden del tipo $I = I_o * exp^{-k\tau}$, donde I representa las corrientes de membrana inducidas por capsaicina para cada uno de los pulsos, I_o es la corriente de P_1 (primer pulso), k es la constante del proceso y tau (τ) representa el tiempo en el cual la aplicación del agonista produce la mitad de la corriente máxima obtenida, lo que nos da una idea de la afinidad de los receptores al agonista utilizado, y ($k\tau$) corresponde a la pendiente de la ecuación exponencial. Esa disminución fue más rápida ($\tau=88 \pm 6s$ n=5) y más pronunciada a potenciales despolarizantes que a +80 mV ($\tau=225 \pm 45$ s), posiblemente por la menor entrada de Ca^{2+} a potenciales positivos. La coexpresión de GABARAP produjo una desensibilización más lenta del receptor a -80 mV ($\tau =216 \pm 20$ s, n=8) (figura 7.13D), que fue aún más lenta a valores despolarizantes ($\tau=317 \pm 29$ s) (figura 7.13B y E).

Por lo tanto, GABARAP afectó las cinéticas de desensibilización del receptor pero no su grado de desensibilización. Como la taquifilaxia del receptor es dependiente del flujo de Ca^{2+} , estos resultados son consistentes con los datos que sugieren que la taquifilaxia producida por GABARAP se debe a la limitada entrada de Ca^{2+} , lo que a su vez concuerda con la menor respuesta a capsaicina observada en células que coexpresan GABARAP.

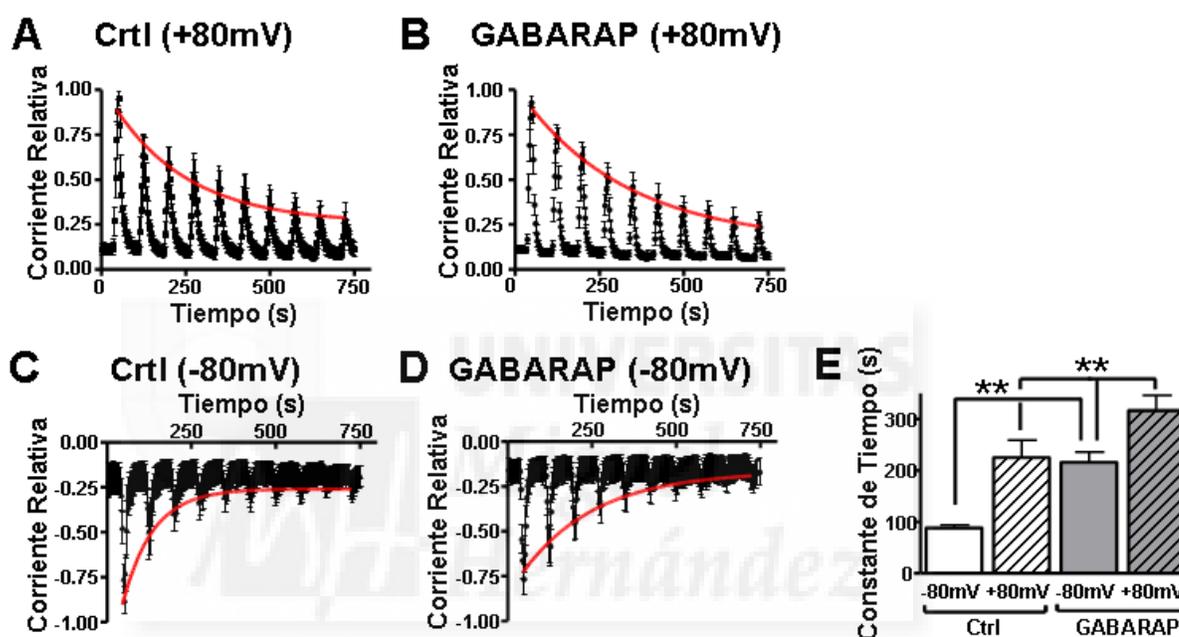


Figura 7.13: (A-B) Corrientes normalizadas evocadas por capsaicina a +80 mV en células control (TRPV1 + YFP) (A) y +GABARAP (B). Se utilizó un protocolo que consistía en la aplicación de 10 pulsos de capsaicina 1 μ M intercalados por 1 min de lavado con la solución, partiendo de un potencial de reposo $V_h=0$ mV. (C-D) Registros obtenidos a -80 mV para células control (C) y +GABARAP (D). En cada uno de los paneles, la curva fue ajustada (línea roja) a una disminución exponencial simple calculada para el máximo valor de cada pulso individual. (E) Células transfectadas con GABARAP presentan una disminución de tachyphylaxis a potenciales negativos. Los datos se han normalizado al máximo de corriente obtenido tras la aplicación del primer pulso del agonista. Los datos se representan como la media \pm S.E. El número de células utilizadas para cada registro fue: control +80 mV, n=5; -80 mV, n=5; GABARAP +80 mV, n=9; -80 mV, n=9. $**P < 0.01$



Capítulo 8

Estudio de los acúmulos de TRPV1 observados cuando co-expresa con GABARAP

8.1. Caracterización anatómica de los agregados en membrana de TRPV1 en las células que coexpresan GABARAP

La agregación de receptores puede tener un papel determinante en la función de éstos, afectando la propia cinética de apertura y/o cierre o los mecanismos de traducción de señales (Chen y col., 2000; Hanus y col., 2004; Chen y col., 2006). Consiguientemente, decidimos caracterizar más exhaustivamente la existencia de los agregados de TRPV1 en membrana en células que co-expresaban GABARAP mediante microscopía *in vivo* TIRF (Reflexión Total Interna de la Fluorescencia), utilizando un nivel de profundidad de penetración del láser de 110 nm. Estos ensayos se realizaron en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, infectada con partículas del virus adenoasociado que expresa YFP-TRPV1.

Como se observa en las imágenes de la figura 8.1A, la presencia de GABARAP aumentó la fluorescencia basal, el tamaño y la intensidad de fluorescencia de los acúmulos de membrana observados como pequeñas regiones discretas. Específicamente, la coexpresión de GABARAP provocó un aumento de la intensidad de fluorescencia de los agregados de TRPV1 cuando GABARAP estaba presente (31.3 ± 2.8 u.a, n=19) con respecto al control (células transfectadas con CFP) (21.3 ± 2 u.a, n=12) (figura 8.1B). Asimismo, como se ilustra en la figura 8.1C, en células que co-expresaban GABARAP se detectó que el porcentaje de ocupación de los agregados de receptor era significativamente mayor (2.8 ± 0.7 %, n=7) que en condiciones control (0.6 ± 0.1 %, n=9). Por último, el tamaño medio de los acúmulos resultó ser significativamente superior en presencia de GABARAP ($1.0 \pm 0.2 \mu m^2$, n=48) con respecto al control ($0.4 \pm 0.1 \mu m^2$, n=52) (panel D). La representación de la frecuencia de distribución de diámetros de los distintos acúmulos en el panel D muestra que en el rango

8. ESTUDIO DE LOS ACÚMULOS DE TRPV1 EN LA MEMBRANA

de tamaños superiores a $2 \mu\text{m}$ se detectó un mayor número de acúmulos en las células transfectadas con GABARAP. En ambas condiciones experimentales, entre $0.5\text{-}1.5 \mu\text{m}$ de diámetro se encontró con mayor frecuencia los agregados o acúmulos de TRPV1.

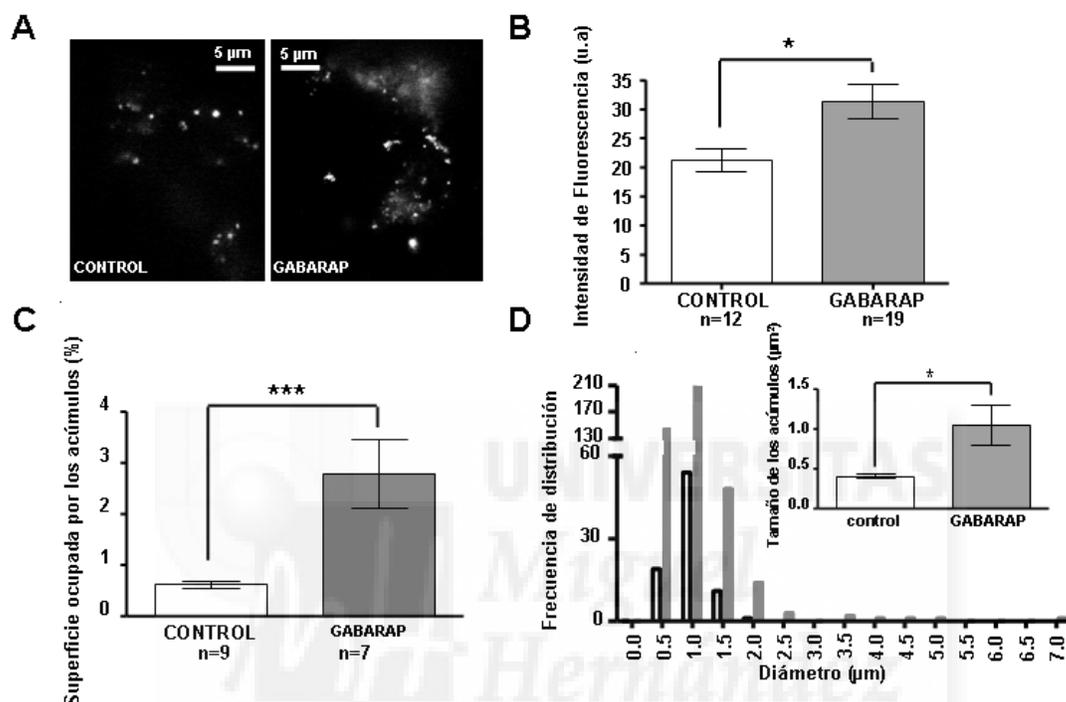


Figura 8.1: GABARAP aumenta la intensidad de fluorescencia, el tamaño medio y el área que ocupan los acúmulos de TRPV1 en la membrana plasmática. (A) Imágenes obtenidas por TIRF de una célula representativa control (izquierda) y otra transfectada con GABARAP (derecha). (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de células control y con GABARAP donde se observa un aumento significativo de la misma en presencia de GABARAP. (C) Cuantificación de la superficie que ocupan los acúmulos o vesículas de TRPV1 respecto al total de la célula (en porcentaje). (D) Estudio de la distribución de los acúmulos en función de su diámetro para células control y con GABARAP, el gráfico superior representa el tamaño medio de los mismos (μm^2). Los datos se representan como la media \pm S.E. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

8.2. Análisis de la dinámica de los acúmulos del receptor TRPV1 en la membrana utilizando recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP)

Dado que el aumento de receptor TRPV1 en la membrana plasmática en las células que co-expresan GABARAP no se correlaciona con un aumento en la densidad de

8.2. Estudio de la movilidad de TRPV1 en la membrana por FRAP

corriente a ninguno de los estímulos aplicados y TRPV1 aparece en la membrana en forma de agregados del receptor, nos planteamos si esos acúmulos proteicos podrían estar ubicados en regiones discretas de la membrana plasmática con restringida movilidad que alterase su cinética. Para poder determinar la dinámica de estos acúmulos *in vivo*, cuantificamos la difusión lateral del receptor mediante microscopía *in vivo* FRAP (del inglés *Fluorescence recovery after photobleaching*).

Para ello, tanto células SH-SY5Y como células HEK293 fueron co-transfectadas con dos plásmidos que expresan YFP-TRPV1 y CFP-GABARAP o con YFP-TRPV1 y un plásmido que expresa solamente CFP (células control) y se iniciaron los registros 48h después de ser transfectadas. Una vez seleccionada una región de interés (ROI), se ajustó el láser al 1-5% y se tomaron imágenes cada 2 segundos. Tras la adquisición de 3 imágenes en condiciones basales, se iluminó con el láser de argón al 15-20% (t6) dos veces con un intervalo de 2 para fotoblanquear la región seleccionada, y se continuó la toma de imágenes durante 2 min. En la figura 8.2, se observan una serie de imágenes representativas de un registro de células control (panel A) y de células transfectadas con CFP-GABARAP (panel B) en condiciones control (t0), justo después del fotoblanqueo (t6) y a los 18 (t18), 44 (t44) y 80 (t80) segundos desde el comienzo de los registros.

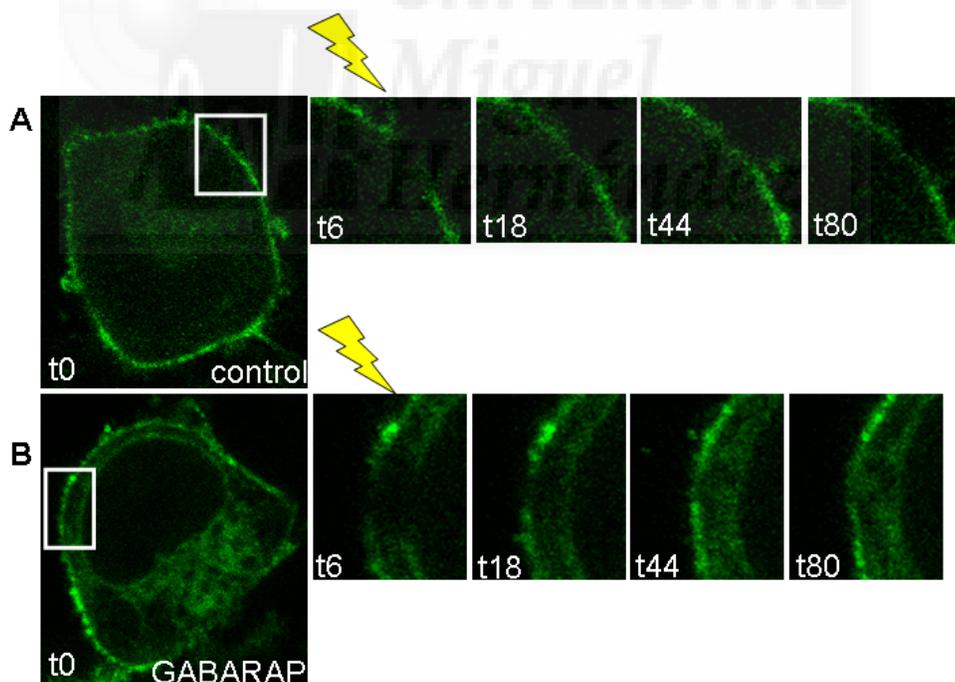


Figura 8.2: Imágenes representativas de los ensayos realizados por FRAP. Células control (A) y células transfectadas con GABARAP (B) fueron registradas cada dos segundos. A los 6 segundos de empezar el ensayo se aplicó el láser durante dos pulsos, para realizar el fotoblanqueamiento. Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 100X.

La figura 8.3 presenta trazas representativas con la fluorescencia media del ROI seleccionado antes, durante y a distintos tiempos después del fotoblanqueo en célu-

las que expresan TRPV1 con GABARAP (línea gris) frente a células control (línea negra). Como se observa, a partir de los 10 segundos de fotoblanquear el ROI se registra la recuperación de fluorescencia, alcanzando la saturación alrededor de los 60 s después. A partir de estos registros podemos obtener dos parámetros: i) el porcentaje de fracción móvil de especies difusibles y ii) el coeficiente de difusión. El porcentaje de fracción móvil o de recuperación de fluorescencia, obtenido de la diferencia entre la fluorescencia que se registra tras el fotoblanqueo y el máximo al que llega a recuperarse la fluorescencia, no presentó diferencias significativas en condiciones control ($60 \pm 3\%$) respecto a cuando GABARAP estaba presente ($66 \pm 4\%$). La curva de recuperación de fluorescencia se ajustó a la ecuación $y = a * (1 - \exp^{-t*b})$ siendo y la intensidad de fluorescencia en un determinado momento, a la amplitud, y b una constante. El tiempo necesario hasta recuperar la mitad de la fluorescencia alcanzada en el estado estacionario (calculado a partir de $1/b$), parámetro que nos proporciona una estimación de la capacidad de difusión de cada molécula, tampoco resultó significativamente diferente en ambas condiciones experimentales. En conjunto podemos concluir que no se observaron diferencias significativas en la dinámica del receptor comparando condiciones control y cuando GABARAP estaba presente.

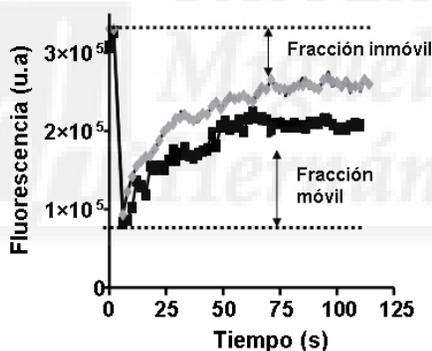


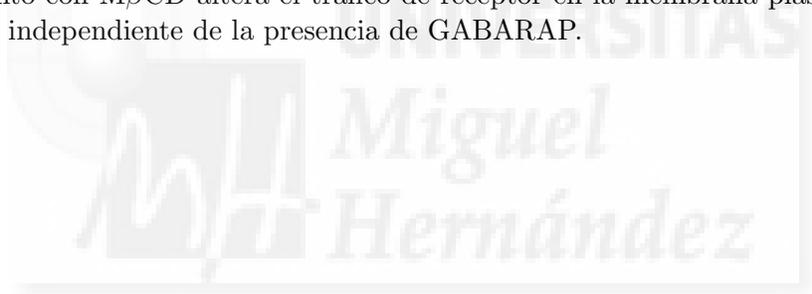
Figura 8.3: La presencia de GABARAP no altera las dinámicas de TRPV1 en la membrana plasmática. Registros correspondientes a los ensayos realizados de FRAP en células HEK293 transfectadas con YFP-TRPV1 y CFP (negro) y de YFP-TRPV1 con CFP-GABARAP (gris). Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 100X.

8.3. Análisis de la naturaleza de los microdominios donde se encuentran los agregados de membrana de TRPV1

El siguiente objetivo que nos propusimos fue el de conocer la naturaleza de los acúmulos de TRPV1 en la membrana cuando se coexpresaba GABARAP. En principio estos podrían contenerse en microdominios lipídicos en la membrana o balsas lipídicas (en los que estarían implicados los microdominios de colesterol) o microdominios determinados por proteínas del citoesqueleto o “corrales”.

8.3.1. Papel de las balsas lipídicas

Para comprobar si los acúmulos de TRPV1 estaban localizados en microdominios de colesterol en la membrana plasmática (balsas lipídicas) y la presencia en estos dominios estabilizaba la proteína en la membrana, células HEK293 co-transfectadas con plásmidos que expresan TRPV1 y GABARAP, o sustituyendo este último por YFP en células control, fueron tratadas durante 15 min a 22°C con 10 mM methyl- β -cyclodextrin (M β CD) que secuestra el colesterol de la membrana plasmática (Szöke y col., 2010). Posteriormente, se procedió a la biotilación de proteínas de membrana y su inmunodetección mediante *western blot*. Como se observa en la figura 8.4A-B, el tratamiento con M β CD provocó una disminución de la cantidad de proteína TRPV1 de aproximadamente 30 % en membrana plasmática (0.9 ± 0.2 u.a antes y 0.6 ± 0.2 u.a después del tratamiento con M β CD). Sin embargo, esta disminución fue independiente de la coexpresión con GABARAP puesto que los valores registrados fueron de 1.2 ± 0.2 u.a a 0.7 ± 0.2 u.a tras el tratamiento con el secuestrador de colesterol (N=3). Estos resultados nos permiten afirmar que la disgregación de balsas lipídicas por el tratamiento con M β CD altera el tráfico de receptor en la membrana plasmática, pero de forma independiente de la presencia de GABARAP.



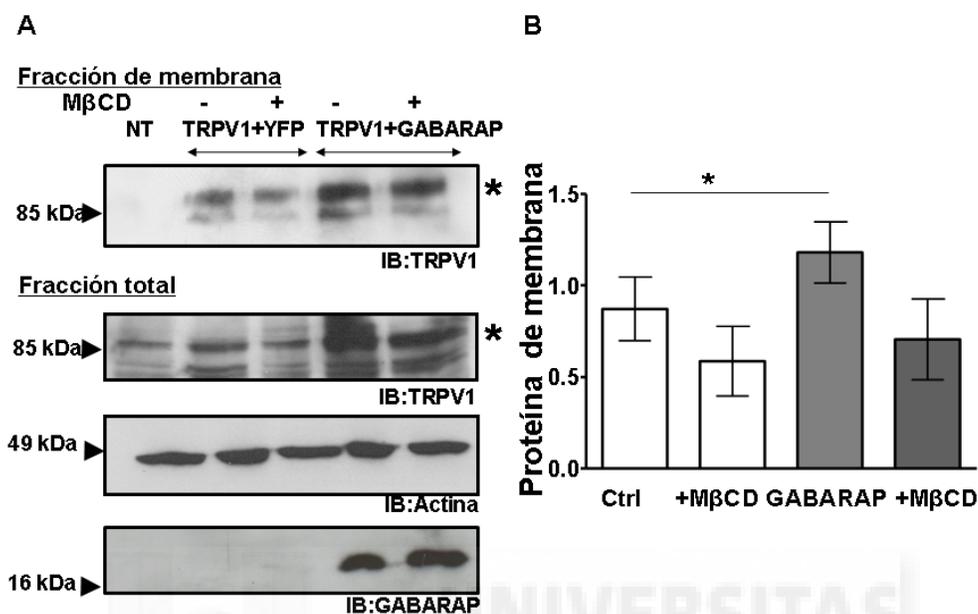


Figura 8.4: El tratamiento con M β CD disminuye la expresión de TRPV1 en membrana, independientemente de la presencia de GABARAP. (A) *Western blot* representativo de fracciones obtenidas por biotinilación de proteína de membrana realizado en células transfectadas con TRPV1 + YFP (como control) ó TRPV1 + GABARAP. Previo a la biotinilación, se realizó el tratamiento con M β CD 10 mM durante 15 min. (B) Cuantificación media de la cantidad de TRPV1 de membrana en los tres ensayos independientes realizados. Los datos se representan como la media \pm S.E. * $P < 0.05$.

El papel de las balsas lipídicas y GABARAP sobre la función de TRPV1 también se analizó funcionalmente mediante registros de Ca²⁺_i. En este caso, como el espectro de fluorescencia de YFP interfiere con el de Fura-2AM, se sustituyó YFP por DsRed que es una proteína fluorescente homóloga a YFP pero que tiene un pico de emisión a 583 nm. Para poder determinar para cada célula el efecto del agente secuestrador de colesterol, se aplicó un protocolo consistente en someter las células a un primer pulso de 1 μ M capsaicina durante 15 s seguido de 1 min lavado (en la figura 8.5 Cap1), a continuación 15 min de tratamiento con 10 mM M β CD o con el respectivo vehículo (0.02% DMSO), 4 min de lavado y un segundo pulso de 1 μ M capsaicina (en la figura 8.5 Cap2) durante 15 s. La magnitud de las dos respuestas a capsaicina se cuantificó, y normalizó la segunda frente a la primera.

En la figura 8.5, se muestran trazas representativas del ensayo de Ca²⁺_i en condiciones control (sin GABARAP) tratadas con M β CD o su respectivo vehículo (panel A) y células co-transfectadas con GABARAP con M β CD o vehículo (panel B). Como se ilustra en el panel C, se produjo una disminución significativa de la amplitud del transiente de Ca²⁺ registrado en el segundo pulso de capsaicina (Cap2) comparado con

el primero (Cap1) tras el tratamiento con $M\beta CD$, tanto en células control como con GABARAP. Mientras en células control la amplitud de la respuesta disminuyó cerca del 70% tras la depleción de colesterol (ratio de las amplitudes de las respuestas $Cap2/Cap1 = 0.79 \pm 0.15$ con vehículo ($n=30$) y 0.23 ± 0.04 ($n=16$) para $M\beta CD$, esa disminución representó para células que co-expresaban GABARAP cerca del 55% ($Cap2/Cap1 = 0.68 \pm 0.35$ ($n=14$) con vehículo frente a 0.4 ± 0.05 ($n=27$) con $M\beta CD$).

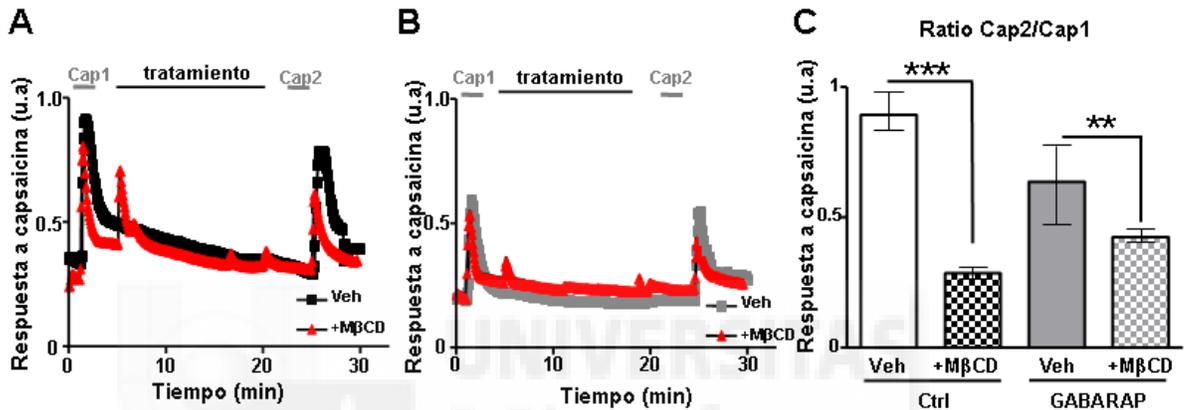


Figura 8.5: El tratamiento con $M\beta CD$ disminuye la amplitud de la corriente de Ca^{2+} de TRPV1 activado por capsaicina. Trazas representativas de los ensayos de calcio intracelular realizados a células HEK293 a las 48h post-transfección. En todos los ensayos, transcurrido 1 min se realizó un primer pulso de capsaicina $1 \mu M$ durante 15 min y el siguiente pulso se aplicó en las mismas condiciones a los 25 min. En condiciones control, se realizó un tratamiento con DM-SO al 0.02% durante 15 min, y en los registros con $M\beta CD$, se realizó el mismo protocolo pero utilizando $M\beta CD$ 10 mM. Trazas representativas de células control (A) o co-transfectadas con TRPV1 y GABARAP (B) tratadas con vehículo (negro (A) o gris (B)) y con $M\beta CD$ (rojo). (C) Cuantificación de los registros de transiente de Ca^{2+} en condiciones control o con GABARAP, en presencia o ausencia de $M\beta CD$, en los que se representa el ratio de $Cap2/Cap1$. El ensayo fue realizado N=5 ensayos independientes. Se realizó T-test para comparación de muestras no pareadas, $***P < 0.001$ y $**P < 0.01$.

Concluimos por lo tanto que la presencia de TRPV1 en los microdominios enriquecidos de colesterol de la membrana plasmática, no se ve alterada por la presencia de GABARAP.

8.3.2. Papel de los corrales de citoesqueleto

En el siguiente apartado quisimos comprobar si los acúmulos se encuentran compartimentalizados por moléculas del citoesqueleto por debajo de la membrana formando los llamados “corrales”, en cuyo caso, serían los microtúbulos o actina los elementos implicados en la aparición de éstos.

8. ESTUDIO DE LOS ACÚMULOS DE TRPV1 EN LA MEMBRANA

Como tanto GABARAP como TRPV1 interactúan con tubulina (Wang y Olsen, 2000; Goswami y col., 2004), comenzamos por evaluar si la presencia de GABARAP modulaba la habilidad de alguno o ambos dominios citosólicos de TRPV1, Nt-TRPV1 y Ct-TRPV1, de unir tubulina. Para ello, inmovilizamos separadamente ambos dominios citosólicos del receptor en forma de proteínas de fusión con GST, y se incubó con un extracto de médula espinal que contenía o no un exceso de proteína GABARAP. Como se observa en la figura 8.6A, ambos dominios de TRPV1 fueron capaces de unir tubulina. Sin embargo, mientras que Nt-TRPV1 fue capaz de unirse a tubulina independientemente de la presencia o no de GABARAP, la interacción de tubulina con Ct-TRPV1 se vio significativamente facilitada en presencia de GABARAP. Por lo tanto, la proteína de anclaje GABARAP parece facilitar la unión de la proteína TRPV1 al citoesqueleto a través del dominio Ct-TRPV1.

Para describir la especificidad de unión entre GABARAP y Ct-TRPV1, se inmovilizó GABARAP o sus dominios N-terminal ($\Delta 37-112$) o C-terminal ($\Delta 1-36$), y se incubaron con Ct-TRPV1 (figura 8.6B). Este ensayo nos permitió observar que tanto GABARAP como $\Delta 1-36$ interactuaban con Ct-TRPV1.

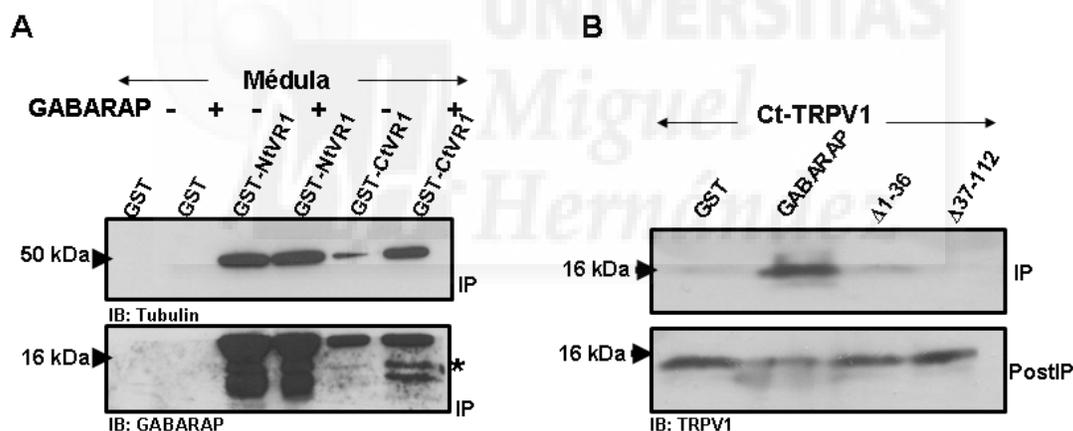


Figura 8.6: La unión de TRPV1 con tubulina está modulada por GABARAP. (A) Ensayo de arrastre de proteínas de tubulina con los dominios N-terminal y C-terminal de TRPV1 fusionados a GST en presencia y ausencia de GABARAP. Tubulina interactúa con Nt-TRPV1 independientemente de la presencia de GABARAP. Sin embargo, la unión de tubulina al Ct-TRPV1 es al menos dos veces superior cuando GABARAP está presente. El asterisco indica la banda que corresponde a GABARAP. (B) El dominio Ct-TRPV1 interactúa *in vitro* con GABARAP. Ensayo de arrastre de proteínas en el que se inmovilizaron GST, GST-GABARAP, GST- $\Delta 1-36$ y GST- $\Delta 37-112$, y se incubaron con el dominio citosólico Ct-TRPV1 expresado en *E. coli* que fue capaz de interactuar con GABARAP y ligeramente con la delección $\Delta 1-36$.

El papel de los microtúbulos sobre el tráfico de receptor TRPV1 se evaluó farmacológicamente con agentes que modulan el estado de polimerización de los microtúbulos. Para ello, se determinó la fracción de proteína TRPV1 en membrana frente a la

fracción citosólica en células HEK293 que expresaban TRPV1 en condiciones control o co-expresando GABARAP incubadas con el agente estabilizador de microtúbulos taxol, concretamente $1 \mu\text{M}$ taxol durante 1h a 37°C (Weissmann y col., 2009), o con su correspondiente vehículo. Como se ilustra en la figura 8.7A, el tratamiento con taxol produjo un aumento de la fracción de TRPV1 membrana en células control (sin GABARAP) comparado con el tratamiento con vehículo (carriles 3 y 4, respectivamente). La magnitud del incremento fue similar al observado en células que co-expresan TRPV1 con GABARAP con vehículo (carriles 3 y 5, respectivamente). Curiosamente, el tratamiento con taxol (taxol+GABARAP) no tuvo efectos aditivos (carriles 5 y 6).

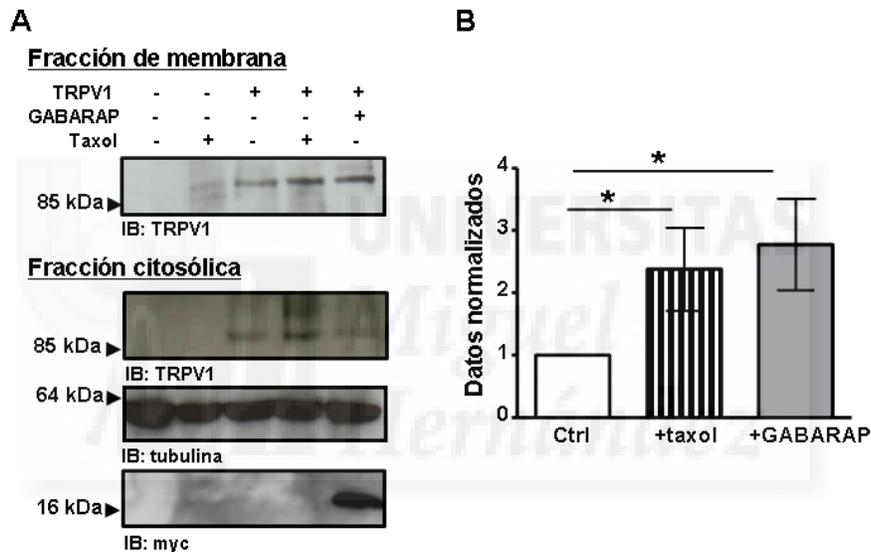


Figura 8.7: El tratamiento con taxol aumenta la cantidad de receptor en la membrana plasmática. Células HEK293 fueron transfectadas con YFP + TRPV1, TRPV1 + GABARAP o no transfectadas (NT). El tratamiento con taxol $1 \mu\text{M}$ se realizó durante 1h a 37°C . (A) *Western blot* representativo de la expresión de TRPV1 en membrana plasmática (fracción de membrana) y en el citosol (fracción citosólica). (B) Cuantificación de TRPV1 normalizado frente a la cantidad de tubulina. El tratamiento con taxol y la co-expresión del receptor con GABARAP, produce un aumento en su expresión en membrana plasmática de al menos dos veces comparado con el control. Los datos representan la media \pm S.E. Se realizó T-test para comparación de muestras no pareadas, $*P < 0.05$. Para todas las condiciones N=4 experimentos independientes.

El efecto de taxol sobre la expresión de TRPV1 en membrana se confirmó en cultivos primarios de DRGs de rata postnatales tratadas con 10 nM taxol durante 1h mediante biotinylation de proteínas de membrana así como por inmunocitoquímica de neuronas no permeabilizadas utilizando el anticuerpo que reconoce un epítipo extracelular del receptor (figura 8.8A-C). Como se observa en el panel C, después de realizar el tratamiento con taxol 10 nM, se observó un claro aumento de la expresión

8. ESTUDIO DE LOS ACÚMULOS DE TRPV1 EN LA MEMBRANA

del receptor en membrana (imagen inferior), comparado con tratamiento con vehículo (imagen superior).

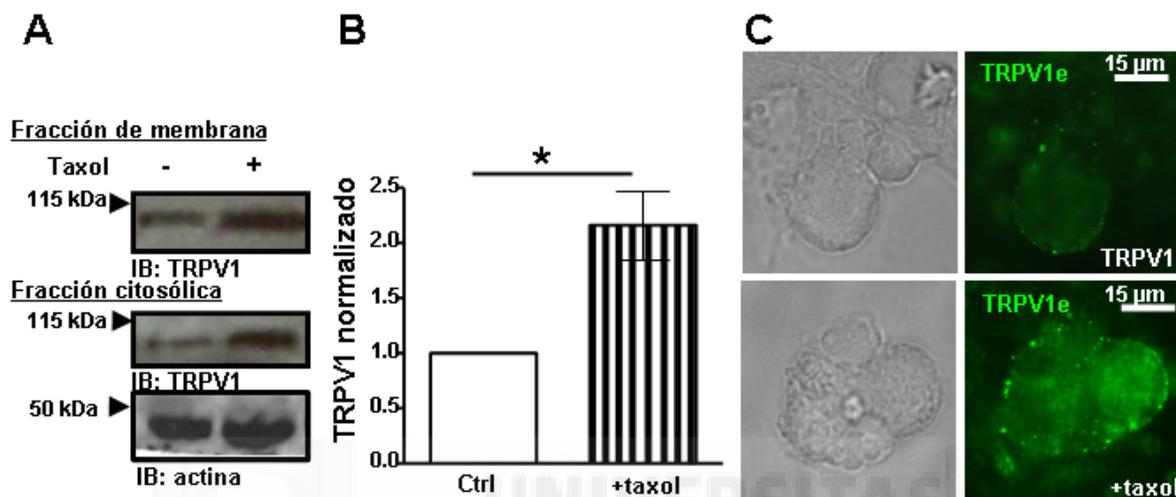


Figura 8.8: El tratamiento con taxol aumenta la cantidad de receptor en la membrana plasmática. Cultivos primarios de DRGs fueron tratados con taxol 10 nM durante 1h a 37°C. N=3 experimentos independientes. (A) *Western blot* representativo de la expresión de TRPV1 total y en la membrana plasmática. El tratamiento con taxol produjo un aumento en su expresión en membrana plasmática de al menos dos veces comparado con el control. (B) Cuantificación de la biotinylation de membrana en el que se ha realizado el ratio TRPV1/actina para cada una de las muestras. Se realizó T-test para comparación de muestras no pareadas, $*P < 0.05$. (C) Inmunocitoquímica de DRGs no permeabilizadas en condiciones control (vehículo) (imagen superior) y tras el tratamiento con taxol (imagen inferior). Las imágenes fueron adquiridas con el objetivo 40X, la barra de escala corresponde a 15 μm.

El aumento en la expresión de TRPV1 tras tratamiento con taxol también se evaluó *in vivo* mediante la técnica de microscopía TIRF en células SH-SY5Y infectadas con el adenoasociado que expresa YFP-TRPV1 (200 MOI). La figura 8.9 muestra imágenes representativas en las que se observa el aumento de la expresión de TRPV1 en la membrana tras incubación durante 1h con 1 μM taxol (panel B) y en células co-transfectadas con GABARAP (panel C) en contraste a células control (panel A). La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de los ROI en células se muestra en el panel D y refleja que las células que expresaban TRPV1 tras tratamiento con taxol fue de 85 ± 4.6 u.a (n=712, siendo n el número de pequeñas regiones discretas), valores significativamente mayores o que los obtenidos tras la co-expresión de TRPV1 con GABARAP 64 ± 2 u.a (n=751) frente a TRPV1 expresado en condiciones control 42 ± 1.4 u.a (n=689), siendo N=3 el número de experimentos independientes realizados. Por lo tanto, los resultados parecen indicar que la coexpresión de GABARAP aumenta la expresión de TRPV1 en el que podría ser un mecanismo que involucra la interacción

y estabilización de los microtúbulos.

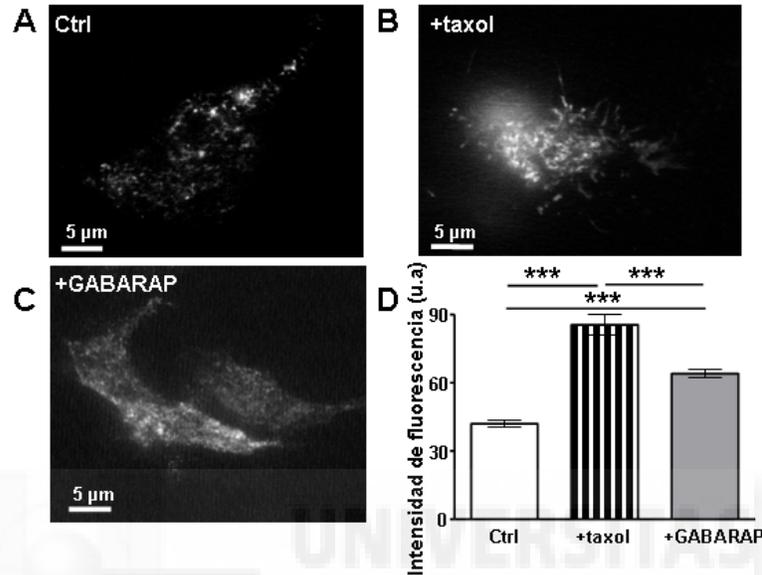


Figura 8.9: El tratamiento con taxol aumenta la expresión de TRPV1 en membrana en células SH-SY5Y. Todas las células fueron infectadas con un virus adenoasociado que expresa YFP-TRPV1, y se transfectaron con CFP (control) (A) ó con CFP-GABARAP (C). A determinadas células se les realizó un tratamiento con taxol 1 μ M durante 1h a 37°C (B). Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio TIRF utilizando una profundidad de penetración de 110 nm, y con el objetivo 100X. (D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de TRPV1 en la membrana plasmática. N=3 experimentos independientes y se registraron n=4 células cada día en cada una de las condiciones. El número total de puntos cuantificados para cada condición fueron de 689 en condiciones control, 712 en células tratadas con taxol, y 751 con GABARAP. *** $P < 0.001$ utilizando ANOVA de una vía.

Para determinar si el aumento de proteína del receptor TRPV1 residente en la membrana plasmática tras el tratamiento con taxol se traduce o no en un aumento de la actividad como canal, analizamos la magnitud de los transientes de Ca^{2+} evocados por un pulso de 1 μ M capsaicina en células HEK293 que expresaban transitoriamente TRPV1wt tras un pretratamiento con 1 μ M taxol durante 1h a 37°C. En la figura 8.10A se muestran trazas representativas de la amplitud del transiente de Ca^{2+} en respuesta al estímulo aplicado. La respuesta a capsaicina de las células que habían sido tratadas con taxol fue ligeramente inferior 0.31 ± 0.02 u.a (n=118) a aquellas tratadas con vehículo 0.38 ± 0.02 u.a (n=151), de forma similar a lo observado en células co-transfectadas con GABARAP y tratadas con vehículo 0.31 ± 0.01 u.a (n=69). No obstante, aunque la tendencia fue a observar respuestas inferiores, las diferencias fueron estadísticamente no significativas dada la gran variabilidad de las respuestas.

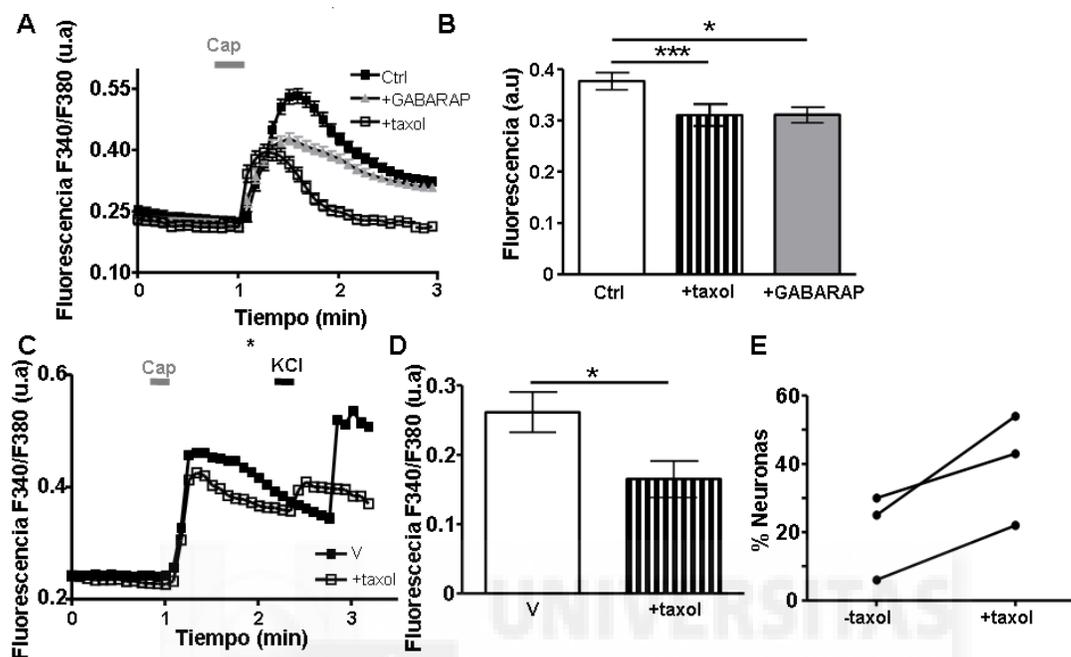


Figura 8.10: El tratamiento con taxol disminuye la amplitud del transiente de Ca^{2+} intracelular de TRPV1 activado por capsaicina. (A) Trazas representativas de células HEK293 que expresan transitoriamente YFP + TRPV1 tratadas con $1 \mu\text{M}$ taxol durante 1h a 37°C (+taxol) o vehículo (Ctrl) en respuesta a un pulso de $1 \mu\text{M}$ capsaicina durante 15 s. Se incluye la respuesta de células cotransfectadas con GABARAP (+GABARAP) con vehículo (traza gris). (B) Cuantificación de los valores medios obtenidos para cada una de las condiciones. Todos los datos son representados como la media \pm S.E, $N=4$, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, t-test para comparación de muestras no pareadas. (C) Trazas obtenidas en DRGs registradas tras tratamiento con vehículo (V) o 10 nM taxol a 37°C durante 1h (+taxol). (D) Cuantificación de la amplitud del transiente de Ca^{2+} intracelular obtenido tras el estímulo de 100 nM capsaicina (línea gris) y el segundo de 40 mM KCl (línea verde). (E) Porcentaje de neuronas que respondieron en condiciones vehículo (V) y tras el tratamiento con taxol (+taxol) respecto al total de neuronas excitables ($N=3$). Todos los datos son representados como la media \pm S.E, siendo $N=4$ el número de experimentos independientes realizados, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, t-test para comparación de muestras no pareadas.

El mismo ensayo se aplicó a DRGs postnatales utilizando una concentración de 100 nM capsaicina durante 15 s y tras un lavado de 2 min un segundo pulso de KCl 40 mM . En la figura 8.10C se ilustran trazas representativas de las DRGs analizadas y la cuantificación de los datos se muestra en el panel D. Al igual que en la expresión heteróloga de TRPV1 en células HEK293 tratadas con el citostático se observó una tendencia, no significativa, a registrar respuestas de menor magnitud en las neuronas tratadas con

taxol (0.18 ± 0.04 u.a, n=14) en comparación a las células tratadas con vehículo (0.25 ± 0.02 u.a, n=10). Curiosamente, sin embargo, observamos un mayor porcentaje de neuronas que respondieron al pulso de capsaicina tras el tratamiento con taxol, como se observa en 8.10E. Nuestros resultados indican que ambos, tanto la co-expresión con GABARAP como el tratamiento con taxol, aumentan la expresión de proteína TRPV1 en la membrana plasmática aunque funcionalmente este incremento no se correlacione con mayor función sino una ligera disminución de la respuesta a capsaicina, sugiriendo en conjunto que la formación de acúmulos de receptor restringidos a corrales tiene un efecto determinante en la actividad del receptor. Además, el aumento de neuronas capaces de responder al agonista tras tratamiento con taxol sugiere que el aumento en el tráfico de TRPV1 a la membrana plasmática, incluso en células que en condiciones normales no expresan el receptor, podría contribuir a los mecanismos de hiperalgesia inducida por citostáticos.

La especificidad del efecto de taxol en las condiciones ensayadas para neuronas que expresan TRPV1 se ensayó sobre otros termorreceptores aplicando distintos agonistas. Concretamente, tras un pretratamiento con 10 nM taxol durante 1 h a 37°C se incubaron con Fura-2AM (1h a 37°C) y posteriormente se aplicó 100 μ M mentol, agonista específico de TRPM8, o 100 μ M AITC, agonista de TRPA1 o un pulso de 100 nM capsaicina. En todos los registros se aplicó como control un pulso de KCl (40 mM). En la figura 8.11A-C se ilustran trazas representativas de las respuestas a cada agonista y se observa que, en las anteriores condiciones experimentales, el tratamiento con taxol no provocó diferencias significativas en la magnitud del transiente de Ca^{2+} evocado por ninguno de los tres agonistas. Además, el porcentaje de neuronas que responden a los distintos agonistas después del tratamiento con taxol se alteró selectivamente para las neuronas que expresaban TRPV1 (paneles inferiores). El número de neuronas capaces de responder a AITC (agonista de TRPA1) fue 30 en condiciones control y 25 tras el tratamiento con taxol, a mentol (TRPM8) fueron 20 en condiciones control y 11 tras el tratamiento con taxol, mientras que a capsaicina fueron 24 en condiciones control y 37 tras el tratamiento con taxol.

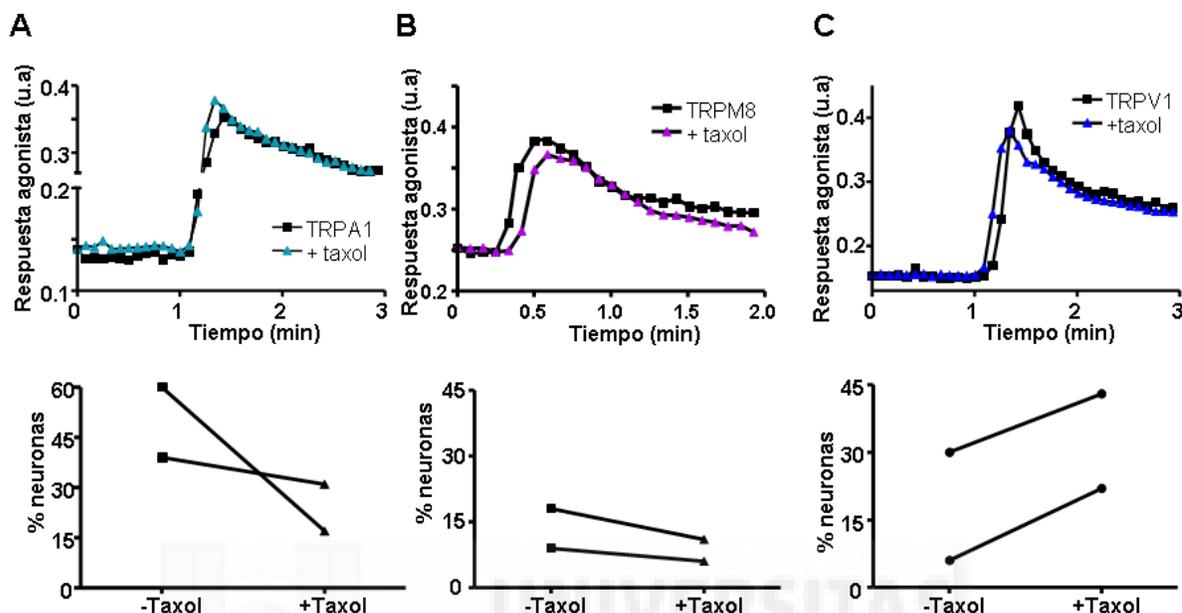


Figura 8.11: El tratamiento con taxol no altera los transientes de Ca^{2+} evocados tras la aplicación de los agonistas AITC, capsaicina y mentol, pero aumenta el número de neuronas que responden a capsaicina. (A-C, panel superior) Trazas representativas de los transientes de Ca^{2+} tras la aplicación de los agonistas de TRPA1, TRPM8 y TRPV1 respectivamente. (A-C, panel inferior) Porcentaje de neuronas que responden a los diferentes agonistas en condiciones control (-Taxol) y tras el tratamiento de taxol (+Taxol). El experimento fue realizado N=2 experimentos independientes.

Por último, investigamos el mecanismo por el cual taxol induce un aumento del tráfico de TRPV1 en la membrana en cultivos primarios de DRGs postnatales utilizando para ello 20 μM DD04107, un lipopéptido capaz de bloquear selectivamente la exocitosis regulada por Ca^{2+} , dependiente del complejo SNARE (Camprubí-Robles y col., 2009) o un lipopéptido control con la misma secuencia de aminoácidos que DD04107 pero desordenada DD04107scr. Se añadieron secuencialmente el lipopéptido y el taxol, añadiendo taxol 10 min después del péptido y posteriormente se realizó la incubación con Fura-2AM. La magnitud y número de neuronas sensibles a capsaicinas fueron analizadas en ensayos de Ca^{2+} i. Como se describió anteriormente, el tratamiento con taxol disminuyó ligera aunque no significativamente las respuestas evocadas por capsaicina. Los valores obtenidos para la magnitud de la respuesta a capsaicina fueron los siguientes: 0.30 ± 0.02 (n= 44) condiciones control y 0.29 ± 0.02 (n=30) tras el tratamiento de taxol, el uso del péptido control DD04107scr resultó en respuestas de 0.26 ± 0.01 (n=38) sin taxol y 0.22 ± 0.02 (n=22) con taxol, y en células tratadas con el péptido DD04107 fue de 0.34 ± 0.02 (n= 49) sin taxol frente a 0.29 ± 0.02 (n=28) con taxol (figura 8.12A). A diferencia de la falta de efecto del lipopéptido modulando la magnitud de la corriente a capsaicina, se detectaron diferencias significativas en el número de

neuronas que respondieron a capsaicina. Así, la presencia del lipopéptido fue capaz de disminuir el número de neuronas sensibles a capsaicina tras el tratamiento con taxol, desde un 52 % al 32 %, mientras que no produjo diferencias significativas cuando se trataron con DD04107scr (figura 8.12B).

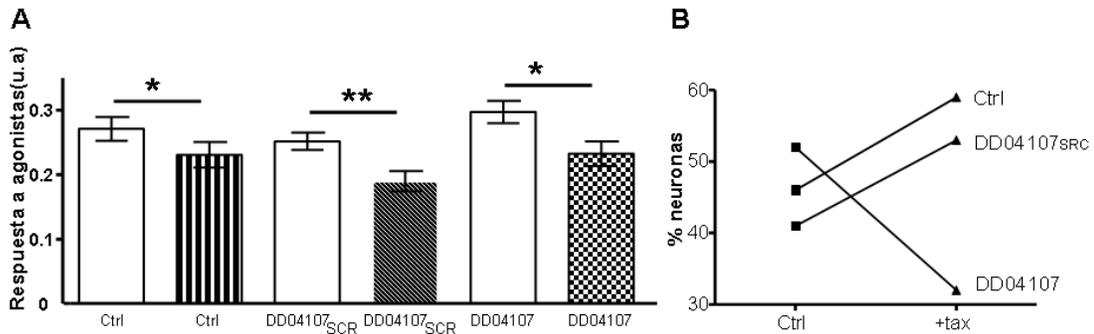


Figura 8.12: El péptido DD04107 disminuye el porcentaje del número de neuronas que responden a capsaicina tras el tratamiento con taxol. (A) Cuantificación de los registros de transiente de Ca^{2+} en condiciones control, con el péptido random o con el péptido DD04107, y tras el tratamiento con taxol. (B) Porcentaje de neuronas que responden a capsaicina en condiciones control o tras el tratamiento con taxol para cada una de las condiciones previamente descritas. El ensayo fue realizado N=3 ensayos independientes, los datos se representan como la media \pm S.E. ****P < 0.01, *P < 0.05** t-test para comparación de muestras no pareadas.



Discusión





Discusión

En este trabajo hemos descrito por primera vez la interacción entre el receptor de capsaicina TRPV1 y la proteína asociada a microtúbulos GABARAP y caracterizado las consecuencias funcionales de esta interacción sobre la actividad del receptor, a saber: su papel sobre el tráfico del receptor y sobre su desensibilización. Esta caracterización nos llevó al estudio de la naturaleza de los acúmulos de TRPV1 observados en la membrana plasmática cuando se coexpresan ambas proteínas y finalmente vislumbrar que el fenotipo observado para TRPV1 en células que co-expresan GABARAP es similar a aquel que resulta del tratamiento con un estabilizador de los microtúbulos como es el taxol. Es importante destacar que taxol es un citostático empleado en el tratamiento de cáncer de ovario, vejiga, pulmón, esófago y mama, que se asocia frecuentemente a neuropatías periféricas caracterizadas por parestesis dolorosa en las extremidades y en la que podría intervenir TRPV1. De hecho, nuestros resultados demuestran que una exposición relativamente corta a este agente provoca un aumento significativo de receptor a la membrana plasmática que en cultivos primarios de nociceptores se manifiesta como un mayor porcentaje de neuronas sensibles al agonista. Además, este incremento de receptor en la superficie parece estar mediado al menos en parte por un mecanismo de exocitosis regulada, de forma similar a la acción de algunos agentes pro-inflamatorios como ATP e IGF-I (Camprubí-Robles y col., 2009).

Para la realización de este trabajo se han utilizado tanto cultivos primarios de nociceptores obtenidos de DRGs como líneas celulares que expresaban transitoria o establemente TRPV1. La generación y utilización de estas últimas, las nuevas líneas estables, ha permitido evitar el sacrificio innecesario de animales de experimentación, particularmente en situaciones en que era importante controlar y modular la expresión de TRPV1 de una forma lo más homogénea posible.

Las líneas estables que llevan fusionada la proteína fluorescente YFP al receptor TRPV1 (YFP-TRPV1) fueron las que despertaron inicialmente mayor interés por su potencial capacidad de seguimiento del receptor mediante técnicas de microscopía *in vivo* y también para la selección de células en registros de electrofisiología. La utilización de estas líneas requirió la generación en paralelo de líneas estables expresando el receptor silvestre que permitiesen comprobar el comportamiento de ambas proteínas silvestre y de fusión, si se expresaban y activaban de idéntica manera. Concretamente, preparamos las líneas a partir de dos líneas celulares. La primera de estas fue la línea HEK293 que se emplea de forma habitual en ensayos de electrofisiología, por ser una línea robusta, que se divide con gran rapidez, y permite expresar gran cantidad de proteína en un corto período de tiempo. $H11.7^{TRPV1wt}$, nuestra línea que expresaba de forma estable

e inducible TRPV1wt, se utilizó rutinariamente como fuente de expresión de proteína TRPV1 para ensayos bioquímicos y de electrofisiología. También la línea celular F11, un híbrido celular de DRG y neuroblastoma que en principio podría esperarse que exprese proteínas específicas neuronales, necesarias para el normal funcionamiento del receptor, se preparó para que expresara estable e induciblemente TRPV1 silvestre. Esta última línea se utilizó en ensayos de electrofisiología. En contraste a los clones que expresaban el receptor silvestre, decidimos discontinuar temporalmente el uso de las líneas estables que expresaban YFP-TRPV1, puesto que la fluorescencia no aparecía delimitada a la distribución de TRPV1 sino que se observaba una fluorescencia difusa que impedía su empleo en ensayos de microscopía *in vivo*.

La interacción entre TRPV1 y GABARAP se observó inicialmente a partir del cribado de una genoteca de DRGs de rata utilizando como cebo el dominio N-terminal de TRPV1, Nt-TRPV1, mediante la técnica de doble híbrido de levadura. Una parte importante de los objetivos de este trabajo se centraron en la validación de los resultados obtenidos de este cribado mediante ensayos *in vitro* de arrastre de proteínas, expresando las proteínas diana (GST-GABARAP) o control (GST) en bacteria, inmovilizándolas y determinando la capacidad de retener las proteínas cebo (Nt-TRPV1) bien como proteínas de fusión o añadiendo extractos de la línea estable $H11.7^{TRPV1wt}$, o extractos de tejido de rata como cerebro o DRGs. En todas las combinaciones anteriores confirmamos que tanto GABARAP como sus dos dominios $\Delta 1-36$ o $\Delta 37-112$ se asociaban a TRPV1. El dominio citosólico Nt-TRPV1 se unió con mayor afinidad al dominio Ct-GABARAP ($\Delta 1-36$), que es el dominio implicado en la unión directa entre GABARAP y el receptor $GABA_A$ (Wang y col., 1999) y entre GABARAP y el transportador de angiotensina AT_1R (Alam y col., 2010).

Se ha descrito que GABARAP actúa como proteína de transporte de los receptores $GABA_A$ (Chen y col., 2000). Es de destacar que, en este caso, GABARAP no actuaría en solitario sino que actuaría como proteína intermediaria entre GABARAP y los receptores $GABA_A$ (Kennedy, 2000; Hanus y col., 2004; Tretter y col., 2012). En el caso de AT_1R , GABARAP también aumenta su expresión (Cook y col., 2008) y su tráfico a la membrana plasmática (Vitko y col., 2011) aunque no se han descrito intermediarios entre ambas proteínas hasta la fecha. Nosotros decidimos dilucidar si GABARAP alteraba el tráfico de TRPV1. Descubrimos que esta proteína citosólica aumenta la expresión en membrana de TRPV1 cuando se coexpresa en las mismas células. Dado que este aumento puede ser debido a una disminución en los procesos de reciclaje, se evaluó la velocidad de endocitosis (por biotinylación reversible) y de degradación (por ensayos de pulso-caza) y comprobamos que en nuestro sistema experimental, aunque existe un ligero aumento en la velocidad de internalización, la tasa de degradación de TRPV1 fue idéntica en presencia o ausencia de la proteína citosólica. En conjunto, por exclusión, este aumento en el receptor superficial inducido por GABARAP parece ser consecuencia de un aumento en la velocidad de biosíntesis del receptor. En este sentido, posteriores ensayos en los que se diferenciaron la expresión superficial (o de membrana) de TRPV1 de la fracción intracelular se observó que, además de un aumento de TRPV1 de al menos dos veces en la fracción superficial, también aumentaba la fracción citosólica de TRPV1 cuando GABARAP estaba presente.

Entre los aspectos descritos de la interacción de GABARAP con el receptor $GABA_A$ se incluye, además del aumento de expresión del receptor en membrana (Wang y col., 1999), la propensión a promover el agrupamiento del receptor $GABA_A$ en superficie celular y de modular sus cinéticas de inactivación (Chen y col., 2000). Esta misma tendencia se hizo evidente mediante inmunocitoquímica en células no permeabilizadas utilizando un anticuerpo que reconoce un epítipo extracelular del receptor (Klionsky y col., 2006) que permitió detectar acúmulos de TRPV1 en la membrana plasmática cuando GABARAP estaba presente. Dichas observaciones se caracterizaron mejor utilizando la microscopía *in vivo* TIRF donde advertimos que tanto la intensidad de la fluorescencia como el diámetro de los acúmulos y el porcentaje de área que ocupan los acúmulos era siempre mayor cuando GABARAP se coexpresaba con el receptor.

Teniendo en cuenta el aumento de receptor TRPV1 en superficie inducido por GABARAP, cabría esperar ser capaces de registrar corrientes de mayor magnitud cuando se hacen registros de *patch clamp* en célula completa. Sin embargo, la aplicación de estímulos tanto de voltaje como de pH ácido no rindió diferencias significativas en la magnitud ni en la cinética entre los grupos de células control y las células que coexpresaban GABARAP. Curiosamente, la aplicación de capsaicina resultó en una reducción de la magnitud de las corrientes de ~50% cuando GABARAP estaba presente. Esta discrepancia entre la cantidad de receptor en la membrana y la actividad registrada podría explicarse bien por cambios en la afinidad del receptor por el vanilloide o por alteraciones intrínsecas de la actividad del receptor. En este sentido, observamos que la diferente respuesta a capsaicina se disipaba en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Hay que destacar que la activación de TRPV1 provoca una entrada de cationes, predominantemente Ca^{2+} al interior celular y este mismo catión divalente es responsable de la desensibilización del receptor (Cholewinski y col., 1993; Koplas y col., 1997; Lishko y col., 2007). Para discernir el origen de la menor corriente activada por capsaicina cuando GABARAP estaba presente, registramos la magnitud de las respuestas a diferentes concentraciones de capsaicina, en presencia y en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Las corrientes se normalizaron frente a las obtenidas a concentraciones supramáximas del vanilloide para determinar las consiguientes EC_{50} para capsaicina. La diferencia calculada para la EC_{50} para capsaicina fue tres veces superior en células que expresaban GABARAP frente a células control solamente en presencia del catión divalente sugiriendo que el origen de la diferente magnitud de las corrientes por capsaicina era la desensibilización del receptor. Un comportamiento similar se ha descrito para el papel de GABARAP en la alteración de la desensibilización de los receptores $GABA_A$ (Chen y col., 2000) y de serotonina 5-HT₃ (Sun y col., 2008).

El mecanismo generalmente aceptado actualmente para explicar la desensibilización de TRPV1 por iones Ca^{2+} contempla la unión de éstos a calmodulina (CaM) y de este complejo Ca^{2+} -CaM a los dominios N-terminal y C-terminal del receptor, favoreciendo con esta unión que TRPV1 adquiera la conformación inactiva (Lishko y col., 2007). El siguiente objetivo que nos planteamos, se centró en la realización de ensayos de desensibilización del receptor aplicando el agonista capsaicina repetitivamente para examinar posibles diferencias en la taquifilaxia. En los resultados obtenidos, observamos a potenciales negativos una desensibilización más lenta del receptor cuando GABARAP está presente. Esta desensibilización no es tan clara a potenciales positivos, debido a

la menor entrada de Ca^{2+} a este potencial. La desensibilización más lenta del receptor en presencia de GABARAP podría explicarse entre otras cosas por: i) que GABARAP pudiera impedir que se forme el complejo de Ca^{2+} -CaM y así evitar/enlentecer que el receptor pase a estado inactivo y/o ii) que GABARAP se una a los dominios N-terminal y C-terminal del receptor compitiendo por los sitios de unión del complejo.

A diferencia de lo que ocurría cuando utilizábamos los dominios citosólicos del receptor producidos en procariotas, cuando los ensayos de arrastre de proteínas incluyeron el receptor TRPV1 completo endógeno o producido en líneas celulares, el dominio Nt-GABARAP ($\Delta 37-112$) resultó tener mayor afinidad por el receptor. Dada la singular interacción observada de los dominios de GABARAP o de la propia proteína con TRPV1, nos planteamos que la participación de otras proteínas intracelulares pudiese determinar esta diferente interacción. En este sentido, el grupo de Olsen y colaboradores describió la interacción de GABARAP con tubulina (Wang y Olsen, 2000). Posteriormente, por otro lado, el grupo de Hucho y colaboradores publicó que TRPV1 también interacciona con esta proteína del citoesqueleto, a través del dominio C-terminal de TRPV1 (Ct-TRPV1) (Goswami y col., 2004). Nuestros resultados ahora demuestran que tubulina no solamente se asocia a Ct-TRPV1, sino que también lo hace al dominio N-terminal de TRPV1. Además, mientras que la unión de tubulina al dominio Nt-TRPV1 es independiente de la presencia de GABARAP, la unión al Ct-TRPV1 aumenta significativamente en presencia de la proteína citosólica sugiriendo que GABARAP favorece la formación del complejo TRPV1-GABARAP-tubulina.

El complejo tubulina-GABARAP podría estar implicado, no sólo en el transporte del receptor TRPV1, sino también en la estabilización de éste en la membrana plasmática y en la formación de los acúmulos de receptor tan prevalentes cuando GABARAP está presente. La presencia de estos acúmulos donde existiría un mayor empaquetamiento, y movimiento restringido, de las subunidades del receptor podría ser responsable de las diferencias en la cinética de activación/deactivación del receptor. Alternativamente, el complejo TRPV1-GABARAP-tubulina podría disminuir la afinidad aparente de capsaicina (Jung y col., 2002) e impedir que proteínas como PKC tengan acceso a sus lugares de fosforilación. En este sentido, el grupo del Dr. Hucho demostró que la fosforilación de TRPV1 en su residuo S800 disminuye la unión de tubulina al receptor (Goswami y col., 2011).

Se sabe que los agrupamientos en los que se encuentran los receptores en la membrana plasmática pueden tener naturaleza de balsas lipídicas o bien de “corrales”, en cuyo caso el citoesqueleto estaría implicado en su formación. En principio, no podemos descartar la existencia de ambos tipos de microdominios conteniendo el receptor TRPV1. Por un lado, se ha descrito la existencia de TRPV1 en los microdominios de colesterol (Liu y col., 2006), también la interacción de TRPV1 con tubulina (Goswami y col., 2004, 2007) y también la interacción de balsas lipídicas y citoesqueleto entre sí (Allen y col., 2006). Sin embargo, nuestros datos no parecen apoyar que GABARAP influya en la localización de TRPV1 en balsas lipídicas sino, por el contrario, en corrales. Así, estudios farmacológicos empleando el agente estabilizador de microtúbulos taxol en cultivos de nociceptores y líneas celulares sugiere que el patrón de expresión y el fenotipo funcional mostrado por la asociación de GABARAP a TRPV1 (a saber, un aumento de expresión del receptor en la membrana y transientes de Ca^{2+} ligeramente

inferiores) se debe al efecto estabilizador de la primera proteína sobre el receptor con el citoesqueleto.

En los últimos años se ha vinculado el uso de taxol en pacientes que reciben quimioterapia con efectos no deseados como la aparición de una neuropatía periférica cuyos síntomas están relacionados con el desarrollo de parestesia e hiperalgesias térmica y mecánica. El principal problema de estos síntomas es que normalmente son resistentes al tratamiento con analgésicos convencionales (Hara y col., 2013). Estudios recientes han comenzado a relacionar directamente estos síntomas con alteraciones en determinados miembros de la familia de los TRPs (Alessandri-Haber y col., 2004; Lee y Swain, 2006; Chen y col., 2011; Ponsati y col., 2012; Xiao y col., 2012; Hara y col., 2013). Numerosos ejemplos ha intentado implicar TRPV1 con los efectos secundarios observados en los tratamientos con taxol. Nosotros hemos mostrado por primera vez el aumento específico de TRPV1 en la membrana plasmática tras un tratamiento relativamente breve (1-2 h) con este citostático, tanto en sistemas de expresión heteróloga como en cultivos primarios de nociceptores. La respuesta rápida al citostático parece ser resultado de una rápida translocación de receptores desde un reservorio vesicular cercano a la membrana hasta la superficie celular siguiendo una exocitosis regulada dependiente de Ca^{2+} como demuestra el bloqueo por el lipopéptido DD04107, semejante a la acción provocada por diversos agentes proinflamatorios como ATP e IGF-I.

Recientemente se ha descrito que el tratamiento sistémico prolongado con taxol en ratas adultas mostró un aumento transcripcional y traduccional de TRPV1. Específicamente, a nivel de mRNA este aumento se hizo significativamente evidente a los 7 días y a nivel de proteína a partir de los diez días aunque estos últimos retornaron a niveles normales a los 21 días de tratamiento (Hara y col., 2013). Además, el análisis de la población de neuronas afectadas por inmunohistoquímica de DRGs a los 14 días de tratamiento sistémico con taxol demostró un aumento de expresión de TRPV1 en neuronas de pequeño y medio diámetro (Hara y col., 2013). Análogamente, nosotros hemos detectado alteraciones en los tratamientos agudos con el citostático que conllevan un aumento del porcentaje de neuronas sensibles a capsaicina. Este aumento de la población sensible al vanilloide también se pudo bloquear con el bloqueador específico de la exocitosis DD04107. Es importante mencionar que la administración sistémica de DD04107 en ratas redujo la hipersensibilidad mecánica desarrollada por animales tratados con taxol (Ponsati y col., 2012). En resumen, podemos concluir que los tratamientos agudos con taxol inducen un aumento de la expresión de TRPV1 en la membrana plasmática y un aumento de la población de nociceptores que responden a capsaicina mediado, al menos en parte, por una movilización de canales nuevos a la superficie celular de manera que neuronas que previamente eran insensibles al agonista, sean sensibles después de realizar el tratamiento.

En conjunto, los resultados que se presentan en este trabajo demuestran que la interacción entre TRPV1 y GABARAP produce un aumento en la biosíntesis y expresión del receptor en la membrana. Funcionalmente, la disminución en la afinidad aparente a capsaicina de TRPV1 observada cuando GABARAP está presente resulta de alteraciones en la desensibilización de TRPV1 en presencia de Ca^{2+} . El tratamiento con taxol sobre el receptor produce un efecto similar al observado con GABARAP, ésto junto con el

DISCUSIÓN

aumento de la cantidad de tubulina capaz de unirse al receptor cuando GABARAP está presente, nos permite proponer que GABARAP estabiliza la unión de TRPV1-tubulina. Interesantemente, tratamientos relativamente cortos con taxol producen un aumento en la biosíntesis del receptor, un mayor transporte de TRPV1 a la membrana plasmática, así un incremento en el número de neuronas que responden a capsaicina. Estos dos últimos efectos son posiblemente consecuencia de la translocación de un reservorio subcelular del receptor a la superficie celular por exocitosis regulada dependiente de Ca^{2+} . Los resultados obtenidos demuestran que TRPV1 y su transporte constituyen una posible diana terapéutica importante para los pacientes que reciben tratamientos de quimioterapia con taxol, que merece ser explorada.



Conclusiones





Conclusiones

- La interacción entre TRPV1 y GABARAP produce un aumento en la expresión de TRPV1 y promueve el agrupamiento del receptor en la membrana plasmática
- La co-expresión de TRPV1 y GABARAP aumenta la internalización del receptor pero no altera su tasa de degradación
- La presencia de GABARAP modula la eficacia y/o potenciación de capsaicina sobre el receptor mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} extracelular
- La desensibilización y la taquiflaxia de TRPV1 es menor cuando GABARAP está presente
- La presencia de GABARAP produce un aumento de la cantidad de tubulina que se une con TRPV1
- La expresión y la actividad de TRPV1 en los microdominios enriquecidos de colesterol de la membrana plasmática no se ve alterada por la presencia de GABARAP
- La estabilización de los microtúbulos por taxol aumenta la expresión de TRPV1 tanto en membrana como en el citosol
- El tratamiento de taxol aumenta el número de neuronas TRPV1 positivas promovido mediante un mecanismo de exocitosis regulada, ya que dicho efecto se ha revertido mediante el empleo del lipopéptido DD04107



Bibliografía

- C. Abbadie, S. Bhangoo, Y. De Koninck, M. Malcangio, S. Melik-Parsadaniantz, y F. A. White. Chemokines and pain mechanisms. *Brain research reviews*, 60(1):125–134, 2009.
- F. M. Adamski, M-Y. Zhu, F. Bahiraei, y B-H Shieh. Interaction of Eye Protein Kinase C and INAD in *Drosophila*. Localization of binding domains and electrophysiological characterization of a loss of association in transgenic flies. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28):17713–17719, 1998.
- J.J. Adcock. TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. *Pulmonary pharmacology and therapeutics*, 22(2):65–70, 2009.
- J. Aguilera-Muñoz, E. Arizaga-Cueta, A. Carpio-Rodas, J. Crump, F. Díaz-Heredia, CF Fernández, J.M. Griego, D. Guerrero, M. Hincapié, y MX León. Guías de práctica clínica del dolor neuropático (II). *Rev Neurol*, 40:303–16, 2005.
- A.N. Akopian, N.B. Ruparel, N.A. Jeske, y K.M. Hargreaves. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *The Journal of physiology*, 583(1):175–193, 2007.
- J. Alam, D. Deharo, K. M. Redding, R.N. Re, y J.L. Cook. C-terminal processing of GABARAP is not required for trafficking of the angiotensin II type 1A receptor. *Regulatory peptides*, 159(1-3):78–86, 2010.
- N. Alessandri-Haber, O. A. Dina, J.J. Yeh, C. A. Parada, D. B. Reichling, y J D Levine. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *The Journal of neuroscience*, 24(18):4444–4452, 2004.
- N. Alessandri-Haber, E. Joseph, O. A. Dina, W. Liedtke, y J D Levine. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain*, 118(1):70–79, 2005.
- J.A. Allen, R.A. Halverson-Tamboli, y M.M. Rasenick. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2):128–140, 2006.
- R. Amann y C A Maggi. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. *Life sciences*, 49(12):849–856, 1991.

BIBLIOGRAFÍA

- G. Appendino, S. Harrison, L. De Petrocellis, N. Daddario, F. Bianchi, A. Schiano Moriello, M. Trevisani, F. Benvenuti, P. Geppetti, y V. Di Marzo. Halogenation of a capsaicin analogue leads to novel vanilloid TRPV1 receptor antagonists. *British journal of pharmacology*, 139(8):1417–1424, 2003.
- J. L. Banko, L. Hou, y E. Klann. NMDA receptor activation results in PKA-and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1. *Journal of neurochemistry*, 91(2):462–470, 2004.
- A. I. Basbaum y T. M. Jessell. The perception of pain. *Principles of neural science*, 4: 472–491, 2000.
- A. I. Basbaum, D. M. Bautista, G. Scherrer, y D. Julius. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2):267–284, 2009.
- D. M. Bautista, S-E. Jordt, T. Nikai, P. R. Tsuruda, A. J. Read, J. Poblete, E. N. Yamoah, A. I. Basbaum, y D Julius. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 124(6):1269–1282, 2006.
- D. M. Bautista, J. Siemens, J. M. Glazer, P. R. Tsuruda, A. I. Basbaum, C. L. Stucky, S-E. Jordt, y D. Julius. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448(7150):204–208, 2007.
- V.N. Bavro, M. Sola, A. Bracher, M. Kneussel, H. Betz, y W. Weissenhorn. Crystal structure of the GABAA-receptor-associated protein, GABARAP. *EMBO reports*, 3 (2):183–189, 2002.
- C. Belmonte, F. Viana, y col. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol. Pain*, 4:14, 2008.
- C. D. Benham, M. J. Gunthorpe, y J B Davis. TRPV channels as temperature sensors. *Cell calcium*, 33(5):479–487, 2003.
- M. Beresewicz. Scaffold proteins (MAGUK, Shank and Homer) in postsynaptic density in the central nervous system. *Postepy biochemii*, 53(2):188–197, 2006.
- D. E. Berman, S. Hazvi, V. Neduva, y Y. Dudai. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1–2 and formation of a memory trace. *The Journal of Neuroscience*, 20(18):7017–7023, 2000.
- B. F. Bessac, M. Sivula, C.A. von Hehn, J. Escalera, L. Cohn, y S-E. Jordt. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *The Journal of clinical investigation*, 118(5):1899, 2008.
- S. Bevan, S. Hothi, G. Hughes, I.F. James, H.P. Rang, K. Shah, C.S.J. Walpole, y J.C. Yeats. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British journal of pharmacology*, 107(2):544–552, 1992.

- J.L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, y L.S. Freedman. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research*, 38 (11 Part 1):3751, 1978.
- S. Brauchi, G. Orta, M. Salazar, E. Rosenmann, y R. Latorre. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *The Journal of neuroscience*, 26(18):4835–4840, 2006.
- H. Breivik, B. Collett, V. Ventafridda, R. Cohen, y D. Gallacher. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European journal of pain*, 10(4):287–287, 2006.
- J. N. Campbell, S.N. Raja, R. A. Meyer, y S. E. Mackinnon. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain*, 32(1):89–94, 1988.
- M. Camprubí-Robles, R. Planells-Cases, y A. Ferrer-Montiel. Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *The FASEB journal*, 23(11):3722–3733, 2009.
- J.P. Cata, H-R. Weng, J-H. Chen, y P.M. Dougherty. Altered discharges of spinal wide dynamic range neurons and down-regulation of glutamate transporter expression in rats with paclitaxel-induced hyperalgesia. *Neuroscience*, 138(1):329–338, 2006.
- M.J. Caterina. Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. *Pain*, 105 (1-2):5–9, 2003.
- M.J. Caterina y D. Julius. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual review of neuroscience*, 24(1):487–517, 2001.
- M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, y D. Julius. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653):816–824, 1997.
- M.J. Caterina, T.A. Rosen, M. Tominaga, A.J. Brake, y D. Julius. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398(6726):436–441, 1999.
- M.J. Caterina, A. Leffler, A.B. Malmberg, W.J. Martin, J. Trafton, K.R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A.I. Basbaum, y D. Julius. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 288 (5464):306–313, 2000.
- F. Cervero y J. Laird. Visceral pain. *The Lancet*, 353(9170):2145–2148, 1999.
- C. Chen, J-G. G. Li, Y. Chen, P. Huang, Y. Wang, y L-Y. Y. Liu-Chen. GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *The Journal of biological chemistry*, 281(12):7983–7993, 2006.
- L. Chen, H. Wang, S. Vicini, y R.W. Olsen. The γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (21):11557–11562, 2000.

BIBLIOGRAFÍA

- Y. Chen, C. Yang, y Z. J. Wang. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience*, 193:440–451, October 2011.
- A. Cholewinski, G.M. Burgess, y S. Bevan. The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 55(4): 1015–1023, 1993.
- H. Chuang, E.D. Prescott, H. Kong, S. Shields, S.E. Jordt, A.I. Basbaum, M.V. Chao, y D. Julius. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4, 5) P₂-mediated inhibition. *Nature*, 411(6840):957–961, 2001.
- H. Chuang, W.M. Neuhauser, y D. Julius. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron*, 43(6):859, 2004.
- D.E. Clapham. TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966):517–524, 2003.
- D.E. Clapham, L.W. Runnels, y C. Strubing. The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6):387–396, 2001.
- J.D. Clark y B.L. Tempel. Hyperalgesia in mice lacking the Kv1. 1 potassium channel gene. *Neuroscience letters*, 251(2):121–124, 1998.
- K.D. Cliffer, J.A. Siuciak, S.R. Carson, H.E. Radley, J.S. Park, D.R. Lewis, E. Zlotchenko, T. Nguyen, K. Garcia, J.R. Tonra, y col. Physiological characterization of taxol-induced large-fiber sensory neuropathy in the rat. *Annals of neurology*, 43(1):46–55, 1998.
- R.W. Colburn, M.L. Lubin, D.J. Stone Jr, Y. Wang, D. Lawrence, M.R. D’Andrea, M.R. Brandt, Y. Liu, C.M. Flores, y N. Qin. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*, 54(3):379–386, 2007.
- J.L. Cook, R.N. Re, D.L.deHaro, J.M. Abadie, M. Peters, y J. Alam. The trafficking protein GABARAP binds to and enhances plasma membrane expression and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation research*, 102(12):1539–1547, 2008.
- D.J. Cosens y A. Manning. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216):285–287, 1969.
- M. Costigan, K. Befort, L. Karchewski, R.S. Griffin, D. D’Urso, A. Allchorne, J. Sitarski, J.W. Mannion, R.E. Pratt, y C.J. Woolf. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC neuroscience*, 3(1):16, 2002.
- M. Costigan, J. Scholz, y C.J. Woolf. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience*, 32:1, 2009.

- J.E. Coyle y D.B. Nikolov. GABARAP: lessons for synaptogenesis. *The Neuroscientist*, 9(3):205–216, 2003.
- J.E. Coyle, S. Qamar, K.R. Rajashankar, y D.B. Nikolov. Structure of GABARAP in two conformations: Implications for GABAA receptor localization and tubulin binding. *Neuron*, 33(1):63–74, 2002.
- R. Cregg, A. Momin, F. Rugiero, J.N. Wood, y J. Zhao. Pain channelopathies. *The Journal of physiology*, 588(11):1897–1904, 2010.
- F. Cruz, M. Guimaraes, C. Silva, M.E. Rio, A. Coimbra, y M. Reis. Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin has long lasting clinical and urodynamic effects in patients with hyperactive or hypersensitive bladder dysfunction. *The Journal of urology*, 157(2):585–589, 1997.
- P.C. Cuthbert, L.E. Stanford, M.P. Coba, J.A. Ainge, A.E. Fink, P. Opazo, J.Y. Delgado, N.H. Komiyama, T.J. O’Dell, y S.G.N. Grant. Synapse-associated protein 102/dlgh3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies. *The Journal of neuroscience*, 27(10):2673–2682, 2007.
- A.J. Davis y M.N. Perkins. Substance P and capsaicin-induced mechanical hyperalgesia in the rat knee joint; the involvement of bradykinin B1 and B2 receptors. *British journal of pharmacology*, 118(8):2206–2212, 1996.
- J.B. Davis, J. Gray, M.J. Gunthorpe, J.P. Hatcher, P.T. Davey, P. Overend, M.H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, y K. Atkinson. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405(6783):183–187, 2000.
- M.C. Davis, A.J. Zautra, y B.W. Smith. Chronic pain, stress, and the dynamics of affective differentiation. *Journal of Personality*, 72(6):1133–1160, 2004.
- E. de la Peña, A. Mälkiä, H. Cabedo, C. Belmonte, y F. Viana. The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *The Journal of physiology*, 567(2):415–426, 2005.
- J.P. de Rivero Vaccari, D. Bastien, G. Yurcisin, I. Pineau, W.D. Dietrich, Y. De Koninck, R.W. Keane, y S. Lacroix. P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, 32(9):3058–3066, 2012.
- P. Delmas y D.A. Brown. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11):850–862, 2005.
- B.N. Desai y D.E. Clapham. TRP channels and mice deficient in TRP channels. *Pflügers Archiv*, 451(1):11–18, 2005.
- A. Dhaka, V. Viswanath, y A. Patapoutian. TRP ion channels and temperature sensation. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1):135–161, 2006.
- A. Dhaka, A.N. Murray, J. Mathur, T.J. Earley, M.J. Petrus, y A. Patapoutian. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*, 54(3):371–378, 2007.

BIBLIOGRAFÍA

- M. Dichgans, T. Freilinger, G. Eckstein, E. Babini, B. Lorenz-Depiereux, S. Biskup, M.D. Ferrari, J. Herzog, A.MJM van den Maagdenberg, M. Pusch, y col. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *The Lancet*, 366(9483):371–377, 2005.
- H. Doya, S. Ohtori, M. Fujitani, T. Saito, K. Hata, H. Ino, K. Takahashi, H. Moriya, y T. Yamashita. c-Jun N-terminal kinase activation in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity. *Biochemical and biophysical research communications*, 335(1):132–138, 2005.
- A. Dray y M. Perkins. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in neurosciences*, 16(3):99–104, 1993.
- S. Earley. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by transient receptor potential and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57(2):148, 2011.
- R. Efendiev, A. Bavencoffe, H. Hu, M.X. Zhu, y C.W. Dessauer. Scaffolding by A-Kinase Anchoring Protein Enhances Functional Coupling between Adenylyl Cyclase and TRPV1 Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 288(6):3929–3937, 2013.
- J.A. Esteban, S-H. Shi, C. Wilson, M. Nuriya, R.L. Huganir, y R. Malinow. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nature neuroscience*, 6(2):136–143, 2003.
- P. Facer, M.A. Casula, G.D. Smith, C.D. Benham, I.P. Chessell, C. Bountra, M. Sinisi, R. Birch, y P. Anand. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. *BMC neurology*, 7(1):11, 2007.
- S. F. Fan, K. F. Shen, M. A. Scheideler, y S. M. Crain. F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells express inhibitory mu- and delta-opioid receptors which increase voltage-dependent K⁺ currents upon activation. *Brain research*, 590(1-2):329–333, 1992.
- A. Ferrer-Montiel. 2. los canales de comunicación sensorial trps como dianas farmacológicas. *Real Academia Nacional de Farmacia*, pages 49–70, 2009.
- C.R. Fertleman, M.D. Baker, K.A. Parker, S. Moffatt, F.V. Elmslie, B. Abrahamsen, J. Ostman, N. Klugbauer, J.N. Wood, R.M. Gardiner, y col. Scn9a mutations in paroxysmal extreme pain disorder: Allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron*, 52(5):767–774, 2006.
- M.L. Franco y A. Seoane de Lucas. Características del dolor crónico en el anciano: tratamiento. *Rev Soc Esp Dolor*, 8:29–38, 2001.
- J. Frederick, M.E. Buck, D.J. Matson, y D.N. Cortright. Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. *Biochemical and biophysical research communications*, 358(4):1058–1064, 2007.

- F. Fujita, K. Uchida, M. Takaishi, T. Sokabe, y M. Tominaga. Ambient Temperature Affects the Temperature Threshold for TRPM8 Activation through Interaction of Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate. *The Journal of Neuroscience*, 33(14):6154–6159, 2013.
- C. García-Martínez, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J.M. Merino, y A. Ferrer-Montiel. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42):32552–32558, 2000.
- C. García-Martínez, A. Fernández-Carvajal, B. Valenzuela, A. Gomis, W. Van Den Nest, S. Ferroni, C. Carreño, C. Belmonte, y A. Ferrer-Montiel. Design and characterization of a noncompetitive antagonist of the transient receptor potential vanilloid subunit 1 channel with *in vivo* analgesic and anti-inflammatory activity. *The journal of pain*, 7(10):735–746, October 2006.
- N. García-Sanz, A. Fernández-Carvajal, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, E. Fajardo-Sánchez, G. Fernández-Ballester, y A. Ferrer-Montiel. Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *The Journal of neuroscience*, 24(23):5307–5314, 2004.
- F. Gardoni, A. Caputi, M. Cimino, L. Pastorino, F. Cattabeni, y M. Di Luca. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Is Associated with NR2A/B Subunits of NMDA Receptor in Postsynaptic Densities. *Journal of neurochemistry*, 71(4):1733–1741, 1998.
- R. Gaudet. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Molecular BioSystems*, 4(5):372–379, 2008.
- N.R. Gavva, L. Klionsky, Y. Qu, L. Shi, R. Tamir, S. Edenson, TJ Zhang, V.N. Viswanadhan, A. Toth, y L.V. Pearce. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19):20283–20295, 2004.
- R. Gómez-Villafuertes, A. del Puerto, M. Díaz-Hernández, D. Bustillo, J.I. Díaz-Hernández, P.G. Huerta, A.R. Artalejo, J.J. Garrido, y M.T. Miras-Portugal. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritegenesis in neuroblastoma cells. *The FEBS journal*, 276(18):5307–5325, 2009.
- G.W. Gordon, G. Berry, X.H. Liang, B. Levine, y B. Herman. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 74(5):2702–2713, 1998.
- C. Goswami y T. Hucho. TRPV1 expression-dependent initiation and regulation of filopodia. *Journal of neurochemistry*, 103(4):1319–1333, 2007.
- C. Goswami, M. Dreger, R. Jahnel, O. Bogen, C. Gillen, y F. Hucho. Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *Journal of neurochemistry*, 91(5):1092–1103, 2004.

BIBLIOGRAFÍA

- C. Goswami, M. Dreger, H. Otto, B. Schwappach, y F. Hucho. Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *Journal of neurochemistry*, 96(1):254–266, 2006.
- C. Goswami, Tim B. Hucho, y F. Hucho. Identification and characterisation of novel tubulin-binding motifs located within the C-terminus of TRPV1. *Journal of neurochemistry*, 101(1):250–262, 2007.
- C. Goswami, J. Kuhn, O.A. Dina, G. Fernández-Ballester, J.D. Levine, A. Ferrer-Montiel, y T. Hucho. Estrogen destabilizes microtubules through an ion-conductivity-independent TRPV1 pathway. *Journal of neurochemistry*, 117(6):995–1008, 2011.
- M.S Grace, E. Dubuis, M.A. Birrell, y M.G. Belvisi. TRP channel antagonists as potential antitussives. *Lung*, 190(1):11–15, 2012.
- F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, y R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36(1):59–74, 1977.
- S. Grond, L. Radbruch, T. Meuser, R. Sabatowski, G. Loick, y K.A. Lehmann. Assessment and treatment of neuropathic cancer pain following WHO guidelines. *Pain*, 79(1):15–20, 1999.
- Y. Guan, W. Guo, S-P. Zou, R. Dubner, y K. Ren. Inflammation-induced upregulation of ampa receptor subunit expression in brain stem pain modulatory circuitry. *Pain*, 104(1):401–413, 2003.
- O. Gureje, M. Von Korff, G.E. Simon, y R. Gater. Persistent pain and well-being. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 280(2):147–151, 1998.
- C. Hanus, C. Vannier, y A. Triller. Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *The Journal of neuroscience*, 24(5):1119–1128, 2004.
- T. Hara, T. Chiba, K. Abe, A. Makabe, S. Ikeno, K. Kawakami, I. Utsunomiya, T. Hama, y K. Taguchi. Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. *Pain*, 2013.
- R.C. Hardie y B. Minke. The trp gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 8(4):643–651, 1992.
- N. Hellwig, N. Albrecht, C. Harteneck, G. Schultz, y M. Schaefer. Homo-and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *Journal of cell science*, 118(5):917–928, 2005.
- B. Hille. Ion channels of excitable membranes. *Sunderland, MA, Sinauer*, 2001.
- M. Hilliges, C. Weidner, M. Schmelz, R. Schmidt, K. Ørstavik, E. Torebjörk, y H. Handwerker. ATP responses in human C nociceptors. *Pain*, 98(1):59–68, 2002.

- N. Hirokawa y R. Takemura. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3):201–214, 2005.
- H-Z. Hu, Q. Gu, C. Wang, C.K. Colton, J. Tang, M. Kinoshita-Kawada, L-Y. Lee, J.D. Wood, y M.X. Zhu. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34):35741–35748, 2004.
- X-Y. Hua, P. Chen, J h. Hwang, y T.L. Yaksh. Antinociception induced by civamide, an orally active capsaicin analogue. *Pain*, 71(3):313–322, 1997.
- J. Huang, X. Zhang, y P. A. McNaughton. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Current neuropharmacology*, 4(3):197–206, 2006a.
- J. Huang, X. Zhang, y P.A. McNaughton. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. In *Seminars in cell & developmental biology*, volume 17, pages 638–645. Elsevier, 2006b.
- S.M. Huang, T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, J.D. Miller, S.N. Davies, P. Geppetti, J. M. Walker, y V. Di Marzo. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12):8400–8405, 2002.
- T. Hucho, O.A. Dina, y J.D. Levine. Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4 (+) neuron-specific mechanism. *The Journal of neuroscience*, 25(26):6119–6126, 2005.
- H. Husi, M.A. Ward, J.S. Choudhary, W.P. Blackstock, y S.GN Grant. Proteomic analysis of NMDA receptor–adhesion protein signaling complexes. *Nature neuroscience*, 3(7):661–669, 2000.
- K. Inoue y col. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacology & therapeutics*, 109(1-2):210, 2006.
- M.F. Jarvis, C.T. Wismer, E. Schweitzer, H. Yu, T. Van Biesen, K.J. Lynch, E.C. Burgard, y E.A. Kowaluk. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X3 allosteric modulator, cibacron blue. *British journal of pharmacology*, 132(1): 259–269, 2001.
- R-R. Ji, T.A. Samad, S-X. Jin, R. Schmoll, y C.J. Woolf. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36(1):57–68, 2002.
- R-R. Ji, T. Kohno, K.A. Moore, y C.J. Woolf. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in neurosciences*, 26(12):696–705, 2003.

BIBLIOGRAFÍA

- X. Jin y R.W. Gereau. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *The Journal of neuroscience*, 26(1):246–255, 2006.
- M.A. Jordan, R. J. Toso, D. Thrower, y L. Wilson. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20):9552–9556, 1993.
- S.E. Jordt y D. Julius. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*, 108(3):421–430, 2002.
- D. Julius y A.I. Basbaum. Molecular mechanisms of nociception. *Nature-London*, pages 203–210, 2001.
- J. Jun, J.S. Shin, S.Y. Lee, Sun Wook Hwang, J. Koo, H. Cho, y U. Oh. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8):7048–54, 2003.
- J. Jung, S-Y. Lee, S.W. Hwang, H. Cho, J. Shin, Y-S. Kang, S. Kim, y U. Oh. Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46):44448–44454, 2002.
- E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell, A. Aparicio, y A.H. Saudan. *Principios de neurociencia*. McGraw-Hill Interamericana de España, 4^a edición, 2001.
- T. Kanematsu, I.S. Jang, T. Yamaguchi, H. Nagahama, K. Yoshimura, K. Hidaka, M. Matsuda, H. Takeuchi, Y. Misumi, y K. Nakayama. Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABAA receptor function. *The EMBO journal*, 21(5):1004–1011, 2002.
- Y. Karashima, K. Talavera, W. Everaerts, A. Janssens, K.Y. Kwan, R. Vennekens, B. Nilius, y T. Voets. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4):1273–1278, 2009.
- H. Katsura, K. Obata, T. Mizushima, H. Yamanaka, K. Kobayashi, Y. Dai, T. Fukuoka, A. Tokunaga, M. Sakagami, y K. Noguchi. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Experimental neurology*, 200(1):112–123, 2006.
- M.B. Kennedy. Sticking together. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21):11135–11136, 2000.
- N.CH Kerr, F.E. Holmes, y D. Wynick. Novel isoforms of the sodium channels Nav1.8 and Nav1.5 are produced by a conserved mechanism in mouse and rat. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23):24826–24833, 2004.
- E. Kim, S. Naisbitt, Y-P. Hsueh, A. Rao, A. Rothschild, A.M. Craig, y M. Sheng. GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *The Journal of cell biology*, 136(3):669–678, 1997.

- Y.H.H. Kim, C-K.K. Park, S.K.K. Back, C.J. Lee, S.J.J. Hwang, Y.C.C. Bae, H.S.S. Na, J.S.S. Kim, S. J.J. Jung, y S.B.B. Oh. Membrane-delimited coupling of TRPV1 and mGluR5 on presynaptic terminals of nociceptive neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(32):10000–10009, 2009.
- J.T. Kittler, P. Rostaing, G. Schiavo, J.M. Fritschy, R. Olsen, A. Triller, y S.J. Moss. The subcellular distribution of GABARAP and its ability to Interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 18(1):13–25, 2001.
- L. Klionsky, R. Tamir, B. Holzinger, X. Bi, J. Talvenheimo, H. Kim, F. Martin, J-C. Louis, J.JS Treanor, y N.R. Gavva. A polyclonal antibody to the prepore loop of transient receptor potential vanilloid type 1 blocks channel activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1):192–198, 2006.
- M. Kneussel, S. Haverkamp, J.C. Fuhrmann, H. Wang, H. Wässle, R.W. Olsen, y H. Betz. The γ -aminobutyric acid type A receptor (GABAAR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15):8594–8599, 2000.
- K. Kobayashi, T. Fukuoka, H. Yamanaka, Y. Dai, K. Obata, A. Tokunaga, y K. Noguchi. Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 481(4):377–390, 2005.
- P.A. Koplas, R.L. Rosenberg, y G.S. Oxford. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience*, 17(10):3525–3537, 1997.
- J. Kwak, M.H. Wang, S.W. Hwang, T-Y. Kim, S-Y. Lee, y U. Oh. Intracellular atp increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *Science Signaling*, 20(22):8298, 2000.
- J.Y. Kwak, J.Y. Jung, S.W. Hwang, W.T. Lee, y U. Oh. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. *Neuroscience*, 86(2):619–626, 1998.
- K.Y. Kwan, A.J. Allchorne, M.A. Vollrath, A.P. Christensen, D-S. Zhang, C.J. Woolf, y D.P. Corey. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*, 50(2):277–289, 2006.
- S. Laínez, P. Valente, **I. Ontoria-Oviedo**, J. Estévez-Herrera, M. Camprubí-Robles, A. Ferrer-Montiel, y R. Planells-Cases. GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *The FASEB Journal*, 24(6):1958, 2010.

BIBLIOGRAFÍA

- G. Landouré, A.A. Zdebik, T.L. Martinez, B.G. Burnett, H.C. Stanescu, H. Inada, Y. Shi, A.A. Taye, L. Kong, C.H. Munns, y col. Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nature genetics*, 42(2):170–174, 2009.
- C.G. Lau y R.S. Zukin. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6):413–426, 2007.
- J. Lee, J.L. Saloman, G. Weiland, Q. Auh, M-K. Chung, J.Y. Ro, y col. Functional interactions between NMDA receptors and TRPV1 in trigeminal sensory neurons mediate mechanical hyperalgesia in the rat masseter muscle. *Pain*, 2012.
- J.J. Lee y S.M. Swain. Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. *Journal of Clinical Oncology*, 24(10):1633–1642, 2006.
- A. Legesse-Miller, Y. Sagiv, A. Porat, y Z. Elazar. Isolation and characterization of a novel low molecular weight protein involved in intra-golgi traffic. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5):3105–3109, 1998.
- D. Levy, V. Kainz, R. Burstein, y A.M. Strassman. Mast cell degranulation distinctly activates trigemino-cervical and lumbosacral pain pathways and elicits widespread tactile pain hypersensitivity. *Brain, behavior, and immunity*, 26(2):311–317, 2012.
- H-S. Li y C. Montell. TRP and the PDZ protein, INAD, form the core complex required for retention of the signalplex in Drosophila photoreceptor cells. *The Journal of cell biology*, 150(6):1411–1422, 2000.
- Y. Lin, T. Jover-Mengual, J. Wong, M.VL Bennett, y R.S. Zukin. PSD-95 and PKC converge in regulating NMDA receptor trafficking and gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52):19902–19907, 2006.
- P.V. Lishko, E. Procko, X. Jin, C.B. Phelps, y R. Gaudet. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*, 54(6):905–918, 2007.
- J.T. Littleton y B. Ganetzky. Ion channels and synaptic viewpoint organization: Analysis of the drosophila genome. *Neuron*, 26:35–43, 2000.
- M. Liu, W. Huang, D. Wu, y J.V. Priestley. TRPV1, but not P2X, requires cholesterol for its function and membrane expression in rat nociceptors. *The European journal of neuroscience*, 24(1):1–6, 2006.
- M.V. Lo y W.L. Pak. Light-induced pigment granule migration in the reticular cells of Drosophila melanogaster. Comparison of wild type with ERG-defective mutants. *The Journal of general physiology*, 77(2):155–175, 1981.
- L.F. Lopez-Santiago, M. Pertin, X. Morisod, C. Chen, S. Hong, J. Wiley, I. Decosterd, y L.L. Isom. Sodium channel $\beta 2$ subunits regulate tetrodotoxin-sensitive sodium channels in small dorsal root ganglion neurons and modulate the response to pain. *The Journal of neuroscience*, 26(30):7984–7994, 2006.

- M. Malik-Hall, O.A. Dina, y J.D. Levine. Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia. *European Journal of Neuroscience*, 21(12):3387–3394, 2005.
- S.A. Malin, B.M. Davis, H.R. Koerber, I.J. Reynolds, K.M. Albers, y D.C. Molliver. Thermal nociception and TRPV1 function are attenuated in mice lacking the nucleotide receptor P2Y2. *Pain*, 138(3):484–496, 2008.
- S. Mandadi y B.D. Roufogalis. ThermoTRP channels in nociceptors: taking a lead from capsaicin receptor TRPV1. *Current neuropharmacology*, 6(1):21–38, 2008.
- S. Mandadi, T. Sokabe, K. Shibasaki, K. Katanosaka, A. Mizuno, A. Moqrich, A. Patapoutian, T. Fukumi-Tominaga, K. Mizumura, y M. Tominaga. TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 458(6):1093–1102, 2009.
- V. Mansuy, W. Boireau, A. Fraichard, J-L.L. Schlick, M. Jouvenot, y R. Delage-Mourroux. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 325(2): 639–648, 2004.
- C.L. Marker, M. Stoffel, y K. Wickman. Spinal G-protein-gated K⁺ channels formed by GIRK1 and GIRK2 subunits modulate thermal nociception and contribute to morphine analgesia. *The Journal of neuroscience*, 24(11):2806–2812, 2004.
- K. C. Marsden, J. B. Beattie, J. Friedenthal, y R. C. Carroll. NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABA(A) receptors. *J Neurosci*, 27(52):14326–14337, 2007.
- M. Mazzuca, C. Heurteaux, A. Alloui, S. Diochot, A. Baron, N. Voilley, N. Blondeau, P. Escoubas, A. Gélot, A. Cupo, y col. A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nature neuroscience*, 10(8):943–945, 2007.
- D.D. McKemy. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Molecular pain*, 1(1):16, 2005.
- D.D. McKemy, W.M. Neuhausser, y D. Julius. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876):52–58, 2002.
- A. Meir, S. Ginsburg, A. Butkevich, S.G. Kachalsky, I. Kaiserman, R. Ahdut, S. Demirgoren, y R. Rahamimoff. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiological reviews*, 79(3):1019–1088, 1999.
- A. Messeguer, R. Planells-Cases, y A. Ferrer-Montiel. Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Current neuropharmacology*, 4(1):1–15, 2006.
- M.T. Miras-Portugal y J. Gualix. Neurotransmisión mediada por nucleótidos: perspectivas terapéuticas en neurodegeneración y neuroprotección. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2009.

BIBLIOGRAFÍA

- T. Mizushima, K. Obata, H. Katsura, J. Sakurai, K. Kobayashi, H. Yamanaka, Y. Dai, T. Fukuoka, T. Mashimo, y K. Noguchi. Intensity-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 in sensory neurons contributes to pain hypersensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(1):28–34, 2007.
- D.P. Mohapatra y C. Nau. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50):50080–50090, 2003.
- C. Montell. Physiology, Phylogeny, and Functions of the TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. STKE*, 2001(90), 2001.
- C. Montell. The TRP superfamily of cation channels. *Science Signalling*, 2005(272):re3, 2005a.
- C. Montell. TRP channels in Drosophila photoreceptor cells. *The Journal of physiology*, 567(1):45–51, 2005b.
- K.A. Moore, T. Kohno, L.A. Karchewski, J. Scholz, H. Baba, y C.J. Woolf. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *The Journal of neuroscience*, 22(15):6724–6731, 2002.
- A. Moqrich, S.W. Hwang, T.J. Earley, M.J. Petrus, A.N. Murray, K.SR Spencer, M. Andahazy, G.M. Story, y A. Patapoutian. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science Signaling*, 307(5714):1468, 2005.
- C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, N. García-Sanz, y A. Ferrer-Montiel. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem*, 279(24):25665–25672, 2004.
- C. Morenilla-Palao, M. Pertusa, V. Meseguer, H. Cabedo, y F. Viana. Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *The Journal of biological chemistry*, 284(14):9215–9224, 2009.
- C. Moreno y D.M. Prada. Fisiopatología del dolor clínico 2. *Asociación colombiana de neurología*, pages 9–21, 2004.
- K. Muraki, Y. Iwata, Y. Katanosaka, T. Ito, S. Ohya, M. Shigekawa, y Y. Imaizumi. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circulation research*, 93(9):829–838, 2003.
- J.I. Nagy, L.L. Iversen, M. Goedert, D. Chapman, y S.P. Hunt. Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *The Journal of Neuroscience*, 3(2):399–406, 1983.

- S. Naisbitt, E. Kim, J.C. Tu, B. Xiao, C. Sala, J. Valtchanoff, R.J. Weinberg, P.F. Worley, y M. Sheng. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, 23(3): 569–582, 1999.
- T. Nakagawa, K. Wakamatsu, N. Zhang, S. Maeda, M. Minami, M. Satoh, S. Kaneko, y col. Intrathecal administration of ATP produces long-lasting allodynia in rats: differential mechanisms in the phase of the induction and maintenance. *Neuroscience*, 147(2):445–455, 2007.
- M.A. Nassar, L.C. Stirling, G. Forlani, M.D. Baker, E.A. Matthews, A.H. Dickenson, y J.N. Wood. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34):12706–12711, 2004.
- M. Niethammer, E. Kim, y M. Sheng. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *The Journal of neuroscience*, 16(7):2157–2163, 1996.
- F.R. Nieto, J.M. Entrena, C.M. Cendán, E. del Pozo, J.M. Vela, y J.M. Baeyens. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. *Pain*, 137(3):520–531, 2008.
- B. Nilius, K. Talavera, G. Owsianik, J. Prenen, G. Droogmans, y T. Voets. Gating of TRP channels: a voltage connection? *The Journal of physiology*, 567(1):35–44, 2005.
- E. Nogales, S.G. Wolf, y K.H. Downing. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391(6663):199–203, 1998.
- M. Nolano, D.A. Simone, G. Wendelschafer-Crabb, T. Johnson, E. Hazen, y W.R. Kennedy. Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain*, 81(1):135–145, 1999.
- M. Numazaki, T. Tominaga, K. Takeuchi, N. Murayama, H. Toyooka, y M. Tominaga. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13):8002–8006, 2003.
- J. Nymann-Andersen, H. Wang, L. Chen, J.T. Kittler, S.J. Moss, y R.W. Olsen. Subunit specificity and interaction domain between GABAA receptor-associated protein (GABARAP) and GABAA receptors. *Journal of neurochemistry*, 80(5):815–823, 2002.
- K. Obata, K. Noguchi, y col. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life sciences*, 74(21):2643–2654, 2004.
- K. Obata, Hi. Katsura, T. Mizushima, H. Yamanaka, K. Kobayashi, Y. Dai, T. Fukuoka, A. Tokunaga, M. Tominaga, K. Noguchi, y col. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *Journal of Clinical Investigation*, 115(9):2393–2401, 2005.

- H. Ohshiro, S. Ogawa, y K. Shinjo. Visualizing sensory transmission between dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in co-culture with calcium imaging. *Journal of neuroscience methods*, 165(1):49–54, 2007.
- OMS. *Neurological disorders: public health challenges*. World Health Organization, 2006.
- R.A. Ophoff, G.M. Terwindt, M.N. Vergouwe, R. van Eijk, P.J. Oefner, S.M.G. Hoffman, J.E. Lamerdin, H.W. Mohrenweiser, D.E. Bulman, M. Ferrari, y col. Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia Type-2 Are Caused by Mutations in the Ca^{2+} Channel Gene CACNL1A4. *Cell*, 87(3):543–552, 1996.
- J. Ortiz-Cardona y A.A. Bendo. Perioperative pain management in the neurosurgical patient. *Anesthesiology Clinics*, 25(3):655–674, 2007.
- A.M. Peier, A. Moqrich, A.C. Hergarden, A.J. Reeve, D.A. Andersson, G.M. Story, T.J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, y col. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108(5):705–715, 2002.
- A. Penna, V. Juvin, J. Chemin, V. Compan, M. Monet, y F.A. Rassendren. PI3-kinase promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane. *Cell calcium*, 39(6):495–507, 2006.
- R.S. Petralia, Y-X. Wang, E. Mayat, y R.J. Wenthold. Glutamate receptor subunit 2-selective antibody shows a differential distribution of calcium-impermeable AMPA receptors among populations of neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 385(3):456–476, 1997.
- S.C. Pingle, J.A. Matta, y G.P. Ahern. Capsaicin receptor: Trpv1 a promiscuous trp channel. In *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, pages 155–171. Springer, 2007.
- R. Planells-Cases y A. Ferrer-Montiel. TRP channel trafficking. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. London, UK: CRC Taylor and Francis, 2007.
- R. Planells-Cases, N. García-Sanz, C. Morenilla-Palao, y A. Ferrer-Montiel. Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch*, 451(1):151–159, 2005.
- B. Ponsati, C. Carreño, V. Curto-Reyes, B. Valenzuela, M.J. Duarte, W. Van Den Nest, O. Cauli, B. Beltran, J. Fernandez, F. Borsini, y col. An inhibitor of neuronal exocytosis (DD04107) displays long-lasting in vivo activity against chronic inflammatory and neuropathic pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(3):634–645, 2012.
- E.D. Por, S.M. Bierbower, K.A. Berg, R. Gomez, A.N. Akopian, W.C. Wetsel, y N.A. Jeske. Arrestin-2 desensitizes the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel β . *Journal of Biological Chemistry*, 287(44):37552–37563, 2012.

- E.D. Prescott y D. Julius. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science Signalling*, 300(5623):1284, 2003.
- B.T. Priest, B.A. Murphy, J.A. Lindia, C. Diaz, C. Abbadie, A.M. Ritter, P. Liberator, L.M. Iyer, S.F. Kash, M.G. Kohler, y col. Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26):9382–9387, 2005.
- C.J. Proudfoot, E.M. Garry, D.F. Cottrell, R. Rosie, H. Anderson, D.C. Robertson, S.M. Fleetwood-Walker, y R. Mitchell. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Current biology*, 16(16):1591–1605, 2006.
- N. Qin, M.P. Neepser, Y. Liu, T.L. Hutchinson, M.L. Lubin, y C.M. Flores. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(24):6231–6238, 2008.
- R. Raouf, K. Quick, y J.N. Wood. Pain as a channelopathy. *The Journal of clinical investigation*, 120(11):3745, 2010.
- E.A.J. Reits y J.J. Neefjes. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature cell biology*, 3(6):E145–E147, 2001.
- M. Renganathan, T.R. Cummins, y S.G. Waxman. Contribution of Nav1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *Journal of neurophysiology*, 86(2):629–640, 2001.
- J.D. Richardson y M.R. Vasko. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3):839–845, 2002.
- C. Rivera, H. Li, J. Thomas-Crusells, H. Lahtinen, T. Viitanen, A. Nanobashvili, Z. Kokaia, M.S. Airaksinen, J. Voipio, K. Kaila, y col. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *The Journal of cell biology*, 159(5):747–752, 2002.
- K.W. Roche, S. Standley, J. McCallum, C.D. Ly, M.D. Ehlers, y R.J. Wenthold. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature neuroscience*, 4(8):794–802, 2001.
- T. Rohács, C.M.B. Lopes, I. Michailidis, y D.E. Logothetis. PI (4, 5) P2 regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nature neuroscience*, 8(5):626–634, 2005.
- R. Roy, S. Hohng, y T. Ha. A practical guide to single-molecule FRET. *Nature methods*, 5(6):507–516, 2008.
- V. Ruiz-Velasco y S.R. Ikeda. Functional expression and FRET analysis of green fluorescent proteins fused to G-protein subunits in rat sympathetic neurons. *The Journal of physiology*, 537(3):679–692, 2001.

BIBLIOGRAFÍA

- H. Saegusa, T. Kurihara, S. Zong, A. Kazuno, Y. Matsuda, T. Nonaka, We. Han, H. Toriyama, y T. Tanabe. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *The EMBO journal*, 20(10):2349–2356, 2001.
- Y.A. Saito, P.R. Strege, D.J. Tester, G.R. Locke, N.J. Talley, C.E. Bernard, J.L. Rae, J.C. Makielski, M.J. Ackerman, y Gianrico Farrugia. Sodium channel mutation in irritable bowel syndrome: evidence for an ion channelopathy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(2):G211–G218, 2009.
- J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, y col. *Molecular cloning*, volume 2. Cold spring harbor laboratory press New York, 1989.
- J. Sandkühler. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological reviews*, 89(2):707–758, 2009.
- L. Sanz-Salvador, A. Andrés-Borderia, A. Ferrer-Montiel, y R. Planells-Cases. Agonist- and Ca²⁺-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23):19462–19471, 2012.
- P. Sardar, A. Kumar, A. Bhandari, y Chandan Goswami. Conservation of Tubulin-Binding Sequences in TRPV1 throughout Evolution. *PLoS One*, 7(4):e31448, 2012.
- R. Sattler, Z. Xiong, W-Y. Lu, M. Hafner, J.F. MacDonald, y M. Tymianski. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 284(5421):1845–1848, 1999.
- J. Sawynok. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacological reviews*, 55(1):1–20, 2003.
- R. Schindl, C. Romanin, y col. Assembly domains in TRP channels. *Biochemical Society Transactions*, 35(1):84, 2007.
- J. Scholz y C.J. Woolf. Can we conquer pain? *Nature neuroscience*, 5:1062–1067, 2002.
- J. Scholz, D.C. Broom, D-H. Youn, C.D. Mills, T. Kohno, M.R. Suter, K.A. Moore, I. Decosterd, R.E. Coggeshall, y C.J. Woolf. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *The Journal of neuroscience*, 25(32):7317–7323, 2005.
- M. Schwarten, J. Mohrlüder, P. Ma, M. Stoldt, Y. Thielmann, T. Stangler, N. Hersch, B. Hoffmann, R. Merkel, y D. Willbold. Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 5(5):690–698, 2009.
- S.G. Sedgwick y S.J. Smerdon. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in biochemical sciences*, 24(8):311–316, 1999.

- J. Sörbo, A. Jakobsson, y K. Norrby. Mast-cell histamine is angiogenic through receptors for histamine1 and histamine2. *International journal of experimental pathology*, 75(1):43, 1994.
- M.D. Southall, T. Li, L.S. Gharibova, Y. Pei, G.D. Nicol, y J.B. Travers. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1):217–222, 2003.
- D. Stanchev, M. Blosa, D. Milius, Z. Gerevich, P. Rubini, G. Schmalzing, K. Eschrich, M. Schaefer, K. Wirkner, y P. Illes. Cross-inhibition between native and recombinant TRPV1 and P2X3 receptors. *Pain*, 143(1):26–36, 2009.
- G.M. Story, A.M. Peier, A.J. Reeve, S.R. Eid, J. Mosbacher, T.R. Hricik, T.J. Earley, A.C. Hergarden, D.A. Andersson, S.W. Hwang, y col. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112(6):819–830, 2003.
- H. Sun, X-Q. Hu, M.B. Emerit, J.C. Schoenebeck, C.E. Kimmel, R.W. Peoples, A. Miko, y L. Zhang. Modulation of 5-HT3 receptor desensitization by the light chain of microtubule-associated protein 1B expressed in HEK 293 cells. *The Journal of Physiology*, 586(3):751–762, 2008.
- R-Q. Sun, Y-J. Tu, N.B. Lawand, J-Y. Yan, Q. Lin, y W.D. Willis. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA-and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *Journal of neurophysiology*, 92(5):2859–2866, 2004.
- M. Suzuki, A. Mizuno, K. Kodaira, y M. Imai. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25):22664–22668, 2003.
- R. Suzuki, S. Morcuende, M. Webber, S.P. Hunt, y A.H. Dickenson. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nature neuroscience*, 5(12):1319–1326, 2002.
- E. Szöke, L. Seress, y J Szolcsanyi. Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience*, 113(4):925–937, 2002.
- E. Szöke, R. Börzsei, D.M.M. Tóth, O. Lengl, Z. Helyes, Z. Sándor, y J. Szolcsányi. Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line. *European journal of pharmacology*, 628(1-3):67–74, 2010.
- I. Tanida, M. Komatsu, T. Ueno, y E. Kominami. GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochemical and biophysical research communications*, 300(3):637–644, 2003.

BIBLIOGRAFÍA

- J. Thuret-Carnahan, J-L. Bossu, A. Feltz, K. Langley, y D. Aunis. Effect of taxol on secretory cells: functional, morphological, and electrophysiological correlates. *The Journal of cell biology*, 100(6):1863–1874, 1985.
- S.M. Todorovic y V. Jevtovic-Todorovic. Regulation of T-type calcium channels in the peripheral pain pathway. *Channels*, 1(4):238–245, 2007.
- M. Tominaga y T. Tominaga. Structure and function of TRPV1. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 451(1):143–150, 2005.
- M. Tominaga, M.J. Caterina, A.B. Malmberg, T.A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B.E. Raumann, A.I. Basbaum, y D. Julius. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3):531–543, 1998.
- A. Trache y G. A. Meininger. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Current protocols in microbiology*, Chapter 2, 2005.
- R-D. Treede, T.S. Jensen, J.N. Campbell, G. Cruccu, J.O. Dostrovsky, J.W. Griffin, P. Hansson, R. Hughes, T. Nurmikko, y J. Serra. Neuropathic pain redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, 70(18):1630–1635, 2008.
- V. Tretter, J. Mukherjee, H.M. Maric, H. Schindelin, W. Sieghart, y S.J. Moss. Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6, 2012.
- S. Tsunoda, J. Sierralta, Y. Sun, R. Bodner, E. Suzuki, A. Becker, M. Socolich, y C.S. Zuker. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature*, 388(6639):243–243, 1997.
- A. Varga, K. Bölcskei, E. Szöke, R. Almasi, G. Czeh, J. Szolcsanyi, y G Pethö. Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience*, 140(2):645–657, 2006.
- L. Vay, C. Gu, y P.A. McNaughton. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *British journal of pharmacology*, 165(4):787–801, 2012.
- K. Venkatachalam y C. Montell. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 76:387–417, 2007.
- M.A. Vidal, E. Calderón, E. Martínez, A. González, y L.M. Torres. Dolor en neonatos. *Revista de la sociedad española del dolor*, 12(2):98–111, 2005.
- J.R. Vitko, R.N. Re, J. Alam, y J.L. Cook. Cell-penetrating peptides corresponding to the angiotensin II type 1 receptor reduce receptor accumulation and cell surface expression and signaling. *American journal of hypertension*, 2011.

- T. Voets, G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi, y B. Nilius. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*, 430(7001):748–754, 2004.
- P. Wahl, C. Foged, S. Tullin, y C. Thomsen. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Molecular pharmacology*, 59(1):9–15, 2001.
- H. Wang y R. W. Olsen. Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *Journal of neurochemistry*, 75(2):644–655, 2000.
- H. Wang, F.K. Bedford, N.J. Brandon, S.J. Moss, y R.W. Olsen. GABAA-receptor-associated protein links GABAA receptors and the cytoskeleton. *Nature*, 397(6714):69–72, 1999.
- Y. Wang, J. Wu, Z. Wu, Q. Lin, Y. Yue, y L. Fang. Regulation of ampa receptors in spinal nociception. *Molecular pain*, 6(1):5, 2010.
- C. Weissmann, H.J. Reyher, A. Gauthier, H.J. Steinhoff, W. Junge, y R. Brandt. Microtubule binding and trapping at the tip of neurites regulate tau motion in living neurons. *Traffic*, 10(11):1655–1668, 2009.
- P.D. Wes, X-Z.S. Xu, H.-S. Li, F. Chien, S.K. Doberstein, y C. Montell. Termination of phototransduction requires binding of the NINAC myosin III and the PDZ protein INAD. *Nature neuroscience*, 2(5):447–453, 1999.
- M. Williams, E. A. Kowaluk, y S. P. Arneric. Emerging molecular approaches to pain therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 42(9):1481–1500, 1999.
- J.N. Wood. Recent advances in understanding molecular mechanisms of primary afferent activation. *Gut*, 53(suppl 2):ii9–ii12, 2004.
- C.J. Woolf. Somatic pain–pathogenesis and prevention. *British journal of anaesthesia*, 75(2):169–176, 1995.
- C.J. Woolf. What is this thing called pain? *The Journal of clinical investigation*, 120(11):3742, 2010.
- C.J. Woolf y M. Costigan. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14):7723–7730, 1999.
- C.J. Woolf y Q. Ma. Nociceptors–noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55(3):353, 2007.
- C.J. Woolf y M.W. Salter. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288(5472):1765–1768, 2000.
- W.H. Xiao, H. Zheng, y G.J. Bennett. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. *Neuroscience*, 203:194–206, 2012.

BIBLIOGRAFÍA

- H. Xing, M. Chen, J. Ling, W. Tan, y J.G. Gu. TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. *The Journal of Neuroscience*, 27(50):13680–13690, 2007.
- H. Xu, I.S. Ramsey, S.A. Kotecha, M.M. Moran, J.A. Chong, D. Lawson, P. Ge, J. Lilly, I. Silos-Santiago, Y. Xie, y col. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*, 418(6894):181–186, 2002.
- H. Xu, M. Delling, J.C. Jun, y D.E. Clapham. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature neuroscience*, 9(5):628–635, 2006.
- W. Yamamoto, A. Sugiura, E. Nakazato-Imasato, y Y. Kita. Characterization of primary sensory neurons mediating static and dynamic allodynia in rat chronic constriction injury model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(6):717–722, 2008.
- L. Yue, J.B. Peng, M.A. Hediger, y D.E. Clapham. CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*, 410(6829):705–709, 2001.
- X. Zhang, J. Huang, y P.A. McNaughton. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO journal*, 24(24):4211–4223, 2005.
- X. Zhang, L. Li, y P.A. McNaughton. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron*, 59(3):450–461, 2008.
- X-F. Zhang, P. Han, T.R. Neelands, S. McGaraughty, P. Honore, C.S. Surowy, y D. Zhang. Coexpression and activation of TRPV1 suppress the activity of the KCNQ2/3 channel. *The Journal of General Physiology*, 138(3):341–352, 2011.
- M.X. Zhu. Understanding the role of voltage gating of polymodal TRP channels. *The Journal of Physiology*, 585(2):321–322, 2007.

Anexo

.1. Proteínas que interaccionan con TRPV1

Tabla .1: Lista de proteínas descritas hasta el momento que interaccionan con TRPV1. Datos obtenidos de la página web: <http://www.trpchannel.org/> actualizados el 14 de noviembre de 1012.

Nombre	Validación		Caracterización	Consecuencia funcional
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>		
80K-H		✓		
AKAP-5	✓	✓	✓	✓
Akt		✓		
AMPK α 2		✓		
Calmodulina	✓	✓	✓	✓
CaMKII		✓		
Caterina α 2				
Caterina δ 2				
CB1		✓		✓
Cb1	✓			
CDK12				
CDK5				✓
CHERP				
Contactina-1				
DAP-150				
DAZAP2				
E-caderina		✓		
Eferina	✓	✓	✓	
EGFR	✓	✓		
eNOS		✓		
FAF1	✓	✓	✓	✓
GABARAP	✓	✓	✓	✓
GCN5				
HAX-1				
ITM2C				

ANEXO

Tabla .2: Lista de proteínas descritas hasta el momento que interaccionan con TRPV1. Datos obtenidos de la página web: <http://www.trpchannel.org/> actualizados el 14 de noviembre de 1012.

Nombre	Validación		Caracterización	Consecuencia funcional
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>		
JMJD2C				
KCNQ2		✓	✓	
KCNQ3		✓		
KIF2A				
KIF3B				
KPN β 1				
Neuronatina				
NKX2.2				
NMDAR1		✓		
NMDAR2B		✓		
NOMO1				
OS-9		✓		
P2RX3		✓		
PEX10				
PI3K-p85 α	✓		✓	
PI3K-p85 β		✓		
PIRT		✓	✓	✓
PKA			✓	
PKARII α		✓		
PKC	✓			✓
PKC ϵ				✓
PLAGL1				
PLC γ 1	✓		✓	
POLR2G				
POLR3D				
PKC μ	✓	✓	✓	✓
RAB26				
RANBP9				
RPL12				
RyR1				
SGT				
SMA3				
SNAPIN	✓	✓		
Src		✓	✓	✓
Syt I	✓	✓		
Syt IV	✓	✓	✓	
TAK1		✓		
TGS1				
THBS3				

.1. Proteínas que interaccionan con TRPV1

Tabla .3: Lista de proteínas descritas hasta el momento que interaccionan con TRPV1. Datos obtenidos de la página web: <http://www.trpchannel.org/> actualizados el 14 de noviembre de 1012.

Nombre	Validación		Caracterización	Consecuencia funcional
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>		
TAK1		✓		
TGS1				
THBS3				
TMEM 115				
TrkA		✓		✓
TRPA1		✓		
TRPV2		✓		
TRPV3		✓		
UBP5				
ZBTB17				
α -tubulin1A	✓			
α -tubulina1B		✓		
β -arrestina2		✓		✓
β -catenina		✓		
β -tubulina3	✓		✓	
β -tubulina5	✓	✓		

.2. Publicaciones

- S. Laínez, P. Valente, **I. Ontoria-Oviedo**, J. Estévez-Herrera, M. Camprubí-Robles, A. Ferrer-Montiel, y R. Planells-Cases. GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *The FASEB Journal*, 24(6):1958, 2010.

