

**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**UNIVERSITAS**  
*Miguel*  
**Hernández**



# **INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS**

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

**Universidad Miguel Hernández**

**Instituto de Neurociencias**

## **Modulación de la Actividad del Canal Iónico TRPV1 por el Hialuronato Sódico**

Tesis para optar al grado de Doctor en Neurociencias de la  
Universidad Miguel Hernández, presentada por:

**Rebeca Caires Mugarra**

Directores:

Prof. Elvira De la Peña García

Prof. Carlos Belmonte Martínez

San Juan de Alicante - España, 2015





**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS**

A QUIEN CORRESPONDA,

Prof. Juan Lerma Gómez, director del Instituto de Neurociencias, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y la Agencia Estatal de Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

CERTIFICA,

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: "Modulación de la actividad del canal iónico TRPV1 por Hialuronato sódico" ha sido realizada por Dña. Rebeca Caires Mugarra, bajo la dirección de los Dres. Dña. Elvira de la Peña García y D. Carlos Belmonte Martínez y da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expide y firma el presente Certificado en San Juan de Alicante, 1 de Octubre de 2015


Fdo. Juan Lerma Gómez  
Director







## INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

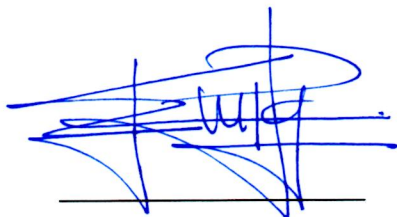
A QUIEN CORRESPONDA,

Elvira de la Peña García, Profesora Titular de la Universidad Miguel Hernández de Elche y  
Carlos Belmonte Martínez, Profesor Emérito de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

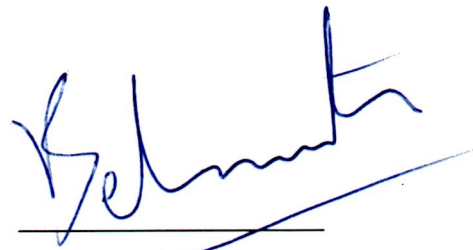
CERTIFICAN,

Que la Tesis Doctoral que lleva por título: "Modulación de la actividad del canal iónico TRPV1 por Hialuronato sódico" ha sido realizada por Dña. Rebeca Caires Mugarra. Que han revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo, y dan su conformidad para que se presente la Tesis a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, expide y firman el presente Certificado en San Juan de Alicante, 1 de Octubre de 2015



Fdo. Elvira de la Peña



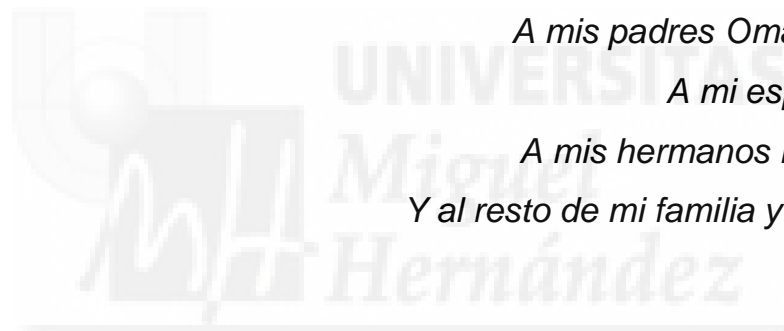
Fdo. Carlos Belmonte Martínez



Universidad Miguel Hernández. Campus de San Juan  
Apartado 18. 03550 San Juan de Alicante. España



*A Dios,  
A mis padres Omar y Rebeca,  
A mi esposo Carlos,  
A mis hermanos Mafe y José,  
Y al resto de mi familia y mis amigos.*





# Índice

<b>Abreviaturas .....</b>	<b><i>i</i></b>
<b>Resumen .....</b>	<b><i>iii</i></b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La matriz extracelular .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 El ácido hialurónico.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Estructura del hialuronato sódico .....	4
1.2.2 Distribución del hialuronato sódico .....	5
1.2.3 Síntesis y degradación del hialuronato sódico.....	6
1.2.4 Propiedades reológicas del hialuronato sódico.....	7
1.2.5 Funciones fisiológicas del hialuronato sódico .....	8
1.2.6 Interacciones químicas del Hialuronato .....	9
<b>1.3 Familia de canales iónicos TRP .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Origen de los canales iónicos TRP.....	11
1.3.2 Nomenclatura y distribución filogenética de los TRP .....	12
1.3.3 Estructura general de los TRP.....	14
1.3.4 Permeabilidad iónica y mecanismo de apertura. ....	16
1.3.5 Expresión y función de los canales TRP .....	16
1.3.6 Canales TRP y la termosensación .....	17
<b>1.4 Canal iónico TRPV1 .....</b>	<b>19</b>
1.4.1. Topología y estructura de TRPV1 .....	20
1.4.2. Distribución tisular de TRPV1.....	21
1.4.3 Permeabilidad iónica.....	22
1.4.4 Agonistas y antagonistas de TRPV1 .....	22
1.4.5 Modulación de TRPV1 .....	24
1.4.6 Activación de TRPV1 por temperatura .....	27
1.4.7 Activación de TRPV1 por capsaicina.....	27
1.4.8 Patologías asociadas a TRPV1 .....	28
<b>1.5 Canal iónico TRPA1 .....</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Canal iónico TRPM8 .....</b>	<b>29</b>

<b>1.7 Nocicepción y canales TRP</b> .....	<b>30</b>
1.7.1 Sensibilización de los nociceptores .....	33
<b>1.8 La osteoartritis (OA)</b> .....	<b>35</b>
<b>1.9 Osteoartritis, dolor y HA</b> .....	<b>37</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>40</b>
<b>2.1. Objetivo General</b> .....	<b>40</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>40</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 Cultivos celulares</b> .....	<b>42</b>
3.1.1 Línea celular SH-SY5Y TRPV1 .....	42
3.1.2 Línea celular SH-SY5Y.....	42
3.1.3 Línea celular CHO-TRPA1 .....	43
3.1.4 Células HEK293-mTRPM8-YFP .....	43
3.1.5 Línea celular HEK293 .....	44
<b>3.2 Transfección transitoria de células HEK293</b> .....	<b>44</b>
3.2.1 Protocolo de transfección: .....	44
3.2.2 Plásmidos utilizados.....	45
<b>3.3 Cultivo primario de neuronas sensoriales</b> .....	<b>47</b>
3.3.1 Cultivo de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) .....	47
3.3.2 Cultivo de neuronas sensoriales primarias de ganglio nodoso .....	49
<b>3.4 Soluciones extracelulares e intracelulares</b> .....	<b>49</b>
<b>3.5 Resumen de los compuestos químicos empleados</b> .....	<b>50</b>
<b>3.6 Sistemas de Registro</b> .....	<b>52</b>
3.6.1 Medida de cambios en la concentración de calcio intracelular.....	52
3.6.2 Registros electrofisiológicos .....	58
<b>3.7 Respuesta nocifensiva</b> .....	<b>59</b>
3.7.1 Test de la placa caliente o “Hot plate” .....	60
3.7.2 Test de capsaicina .....	60
3.7.3 Análisis de los datos.....	61
<b>3.8 Análisis Estadístico de los datos</b> .....	<b>61</b>
<b>4. Resultados</b> .....	<b>62</b>
<b>4.1 Efecto del HA sobre TRPV1 activado por calor.</b> .....	<b>62</b>

4.1.1 Efecto del HA sobre el canal TRPV1 expresado en la línea celular estable SH-SY5Y-TRPV1 .....	62
4.1.2 Efecto del HA sobre el canal TRPV1 expresado en neuronas sensoriales de ganglio raquídeo .....	69
<b>4.2 Efecto del HA sobre el canal TRPV1 expresado en células HEK293.....</b>	<b>76</b>
4.2.1 Duración del efecto del HA sobre la respuesta a calor de TRPV1 en células HEK293 .....	78
<b>4.3 Efecto del HA sobre los cambios en la concentración de calcio intracelular (<math>[Ca^{2+}]_i</math>) producidos en respuesta a la activación de TRPV1 por capsaicina. ....</b>	<b>80</b>
4.3.1 Efecto del HA-HMW sobre la respuesta a capsaicina del canal TRPV1-EYFP expresado en células HEK293 .....	80
4.3.2 Efecto del HA-HMW sobre la respuesta a capsaicina del canal TRPV1 expresado en neuronas sensoriales en cultivo. ....	81
<b>4.4 Efecto del HA sobre los cambios en la concentración de calcio intracelular (<math>[Ca^{2+}]_i</math>) producidos en respuesta a la activación de TRPV1 por pH ácido.....</b>	<b>82</b>
<b>4.5 Efecto del HA sobre la amplitud de las corrientes macroscópicas inducidas por capsaicina mediadas por el canal TRPV1 expresado en células HEK293. ....</b>	<b>84</b>
4.5.1 Efecto del HA-HMW 400 $\mu$ g/ml sobre las corrientes macroscópicas del TRPV1 evocadas por capsaicina.....	84
4.5.2 Efecto del HA-LMW 400 $\mu$ g/ml sobre las corrientes macroscópicas del TRPV1 evocadas por capsaicina.....	86
<b>4.6 La inhibición producida por el HA sobre TRPV1 no se ve afectada por la N-glicosilación del canal.....</b>	<b>88</b>
<b>4.7 Interacción del HA con el canal TRPV1. ....</b>	<b>90</b>
<b>4.8 Efecto del HA sobre la sensibilización del TRPV1 por la bradiquinina en neuronas sensoriales primarias cultivadas. ....</b>	<b>92</b>
<b>4.9 Efecto de la inyección de HA sobre la latencia de la respuesta nocifensiva a calor y a capsaicina en ratones despiertos. ....</b>	<b>96</b>
<b>4.10 Efecto del HA sobre el canal TRPA1 en sistemas de expresión heterólogos y en neuronas sensoriales primarias. ....</b>	<b>100</b>
<b>4.11 Efecto del HA sobre el canal TRPM8 activado por frío y por mentol, en sistemas de expresión heterólogos y neuronas sensoriales primarias. ...</b>	<b>106</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>109</b>



5.1 Efecto Inhibitorio del HA sobre TRPV1 .....	111
5.2 Mecanismo de acción del HA sobre TRPV1 .....	114
5.3 Interacción del HA y TRPV1 .....	116
5.4 Comparación del efecto producido por el HA-LMW y el HA-HMW sobre TRPV1 .....	119
5.5 Significado funcional del efecto del HA sobre TRPV1 .....	120
6. Conclusiones.....	123
7. Bibliografía .....	125
8. Anexo .....	139



# Abreviaturas

AITC: Alilil-isotiocianato

AKAP: Proteína anclada a la quinasa A

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenisina trifosfato

BK: Bradiquinina

CA: Cinemaldehido

CaM: Calmodulina

CaMKII: Proteína quinasa II dependiente de Calcio/Calmodulina

CAP: Capsaicina

Cch: Carbacol

CHO-TRPA1: Línea celular derivada de células de ovario de hámster chino con expresión estable de TRPA1

CNS: Sistema nervioso central

CSPG: Condroitin sulfato

DAG: Diacilglicerol

DMSO: Dimetil sulfóxido

DRG: Ganglio raquídeo

EC<sub>50</sub>: Concentración necesaria de un compuesto para alcanzar el 50 % de activación

ECM: Matriz extracelular

EGTA: Ácido etilenglicol-bis (2 aminoetiléter)-N, N, N', N'-tetra-acético

EYFP(+): Células que expresan proteína fluorescente amarilla intensificada

EYFP: Proteína fluorescente amarilla intensificada

FBS: Suero fetal bovino

GAG: Glicosaminoglicano

GFP: Proteína fluorescente verde

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

HA: Hialuronato sódico

HBSS: Solución salina Hank balanceada

HEK293: Línea celular derivada de células embrionarias de riñón humano 293  
HEPES: Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N´-(4-butasulfónico)  
I.p.: Intra-plantar  
IC<sub>50</sub>: Concentración necesaria de un compuesto para alcanzar el 50 % de inhibición  
I-V: Relación corriente-voltaje  
NGF: Factor de crecimiento nervioso  
NIF: Nifedipina  
OA: Osteoartritis  
PEG<sub>2</sub>: Prostaglandinas  
PG: Proteoglicano  
PI<sub>3</sub>: Inositol 3 fosfato  
PIP<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol 4.5 bifosfato  
PKA: Proteína quinasa A  
PKC: Proteína quinasa C  
PLC: Fosfolipasa C  
PNNs: Redes perineuronales  
PNS: Sistema nervioso periférico  
S.E.M: Error estándar de la media  
SH-SY5Y: Línea celular derivada de neuroblastoma humano  
SH-SY5Y-TRPV1: Línea celular derivada de neuroblastoma humano con expresión estable de TRPV1  
TG: Ganglio del trigémino  
TRP: Receptor de Potencial Transitorio  
TRPA1: Receptor de Potencial Transitorio Anquirina tipo 1  
TRPM8: Receptor de Potencial Transitorio Melastina tipo 8  
TRPV1<sup>-/-</sup>: Genotipo carente del canal TRPV1  
TRPV1: Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide tipo 1  
Vm: Potencial de membrana  
YFP: Proteína fluorescente amarilla

# Resumen

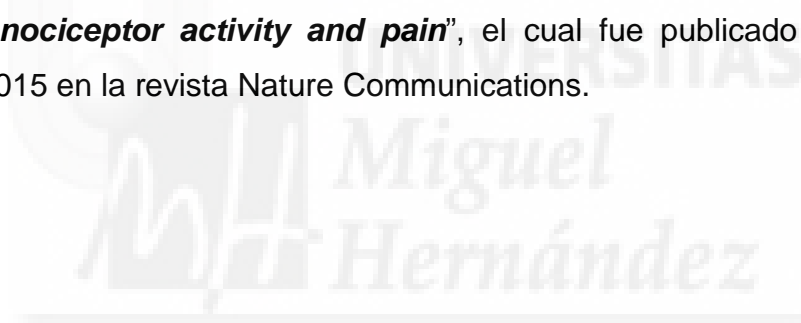
El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano (GAG), polisacárido de alto peso molecular, constituyente muy importante de la matriz extracelular (ECM) en los vertebrados. Se encuentra principalmente en forma de sal asociado al ion sodio, hialuronato sódico (HA). En las articulaciones el HA está presente a alta concentración en el líquido sinovial. Se ha sugerido que en la articulación actúa como un filtro visco-elástico, amortiguando la transmisión de las fuerzas mecánicas ejercidas hacia los nociceptores de las terminaciones nerviosas de la cápsula sinovial. En articulaciones que presentan dolor e inflamación a causa de patologías como la osteoartritis (OA), se ha determinado que tanto el peso molecular como la concentración del HA presente en el líquido sinovial, están disminuidos, modificando las propiedades visco-elásticas de éste y afectando el líquido sinovial. En los casos de OA, se utiliza con frecuencia como tratamiento la inyección intra-articular de HA, lo que se conoce como visco-suplementación, y es capaz de restaurar las propiedades del líquido sinovial, contribuyendo a la disminución del dolor.

Por otra parte el canal iónico TRPV1, canal iónico polimodal nociceptivo, implicado en la transducción de estímulos dolorosos (calor, capsaicina, pH ácido), se encuentra distribuido en diversos tejidos en el organismo. Entre otros, el canal TRPV1 se expresa en las terminales nerviosas de las aferentes que inervan la articulación de la rodilla. La actividad de TRPV1 se ve potenciada por mediadores pro-inflamatorios, contribuyendo de esta manera al dolor intenso percibido en patologías articulares como la OA o la artritis. En el presente trabajo se explora la hipótesis de que el HA module los canales iónicos de dolor TRPV1 presentes en los nociceptores que inervan la articulación, disminuyendo la actividad del canal y por ende contribuyendo a la reducción de la transducción de los estímulos dolorosos. En este trabajo se demuestra que el HA es capaz de reducir las respuestas evocadas por estímulos nociceptivos de calor intenso o por capsaicina a través de TRPV1, tanto cuando es expresado en líneas celulares como cuando se estudia en las neuronas sensoriales primarias que lo expresan de forma nativa,

abordado mediante registros de imagen que miden cambios en la concentración de calcio intracelular, registros electrofisiológicos *in vitro* y aproximaciones conductuales.

En el presente estudio se concluye que el HA modula de forma específica al canal iónico TRPV1, reduciendo su actividad, mientras que no se observa efecto sobre otros canales iónicos de la misma familia TRP como son TRPA1 y TRPM8, también implicados en nocicepción. De este estudio se concluye que el HA inhibe TRPV1, disminuyendo al actividad eléctrica de las neuronas sensoriales primarias y fibras nociceptivas, y que este efecto es debido a una reducción en la probabilidad de apertura del canal, actuando el HA de manera directa en una zona específica en el *loop* extracelular S5-P-S6 del canal TRPV1.

Los resultados que se muestran en la presente Tesis Doctoral forman parte del artículo titulado "***Hyaluronan modulates TRPV1 channel opening, reducing peripheral nociceptor activity and pain***", el cual fue publicado el día 27 de agosto de 2015 en la revista Nature Communications.



# 1.Introducción

## 1.1 La matriz extracelular

La matriz extracelular (ECM) es una estructura dinámica y compleja, compuesta por una variedad de macromoléculas que se organizan formando una compleja red tridimensional alrededor de las células de los diferentes tejidos (Figura 1.1).

La ECM es de vital importancia tanto para la estructura como para la función de las células. Participa en diversas funciones celulares tales como la adhesión, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Daley et al 2008). Los componentes de la ECM son numerosos, e incluyen proteínas fibrosas como el colágeno y la elastina, así como macromoléculas como los glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas.

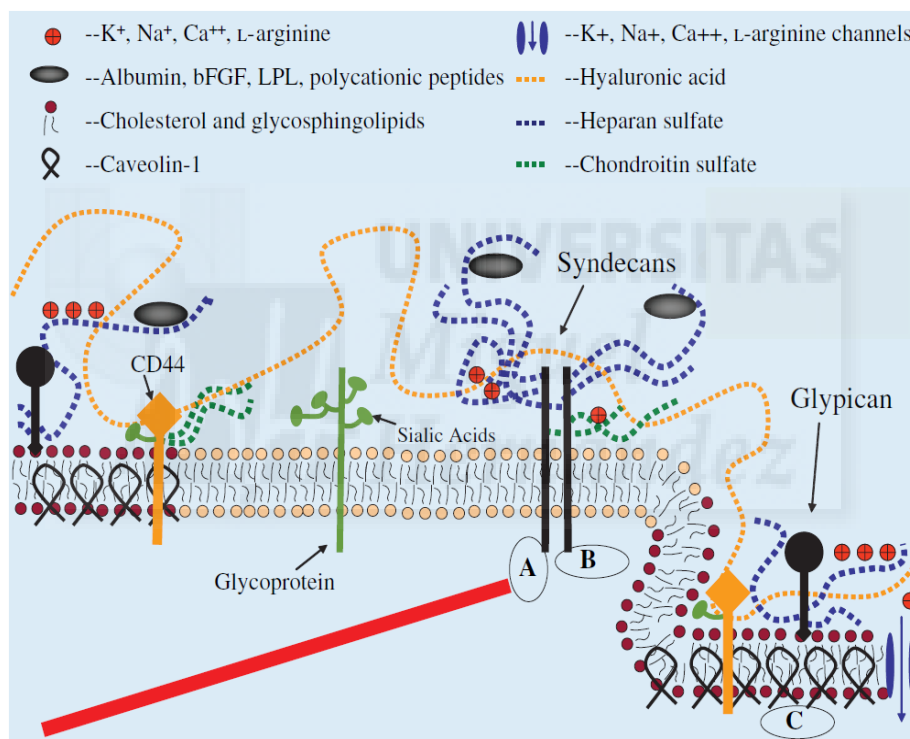
**Glicosaminoglicanos (GAGs):** son moléculas compuestas por cadenas largas de polisacáridos que pueden contener grupos sulfatados. Los GAGs incluyen al heparan sulfato, condroitin sulfato, queratan sulfato y al ácido hialurónico. El ácido hialurónico es un componente fundamental de la ECM, responsable de conferirle varias de sus propiedades funcionales, ya que está relacionado con la hidratación de la ECM, por su capacidad para retener moléculas de agua y está involucrado en el tráfico de moléculas y en la interacción con receptores de membrana como glicoproteínas e incluso canales iónicos (Kochlamazashvili et al 2010). Los GAGs, a excepción del ácido hialurónico que se halla libre en la ECM, se encuentran unidos covalentemente a una proteína nuclear (Hascall & Esko 2009), formando complejos denominados proteoglicanos (PGs).

**Proteoglicanos (PGs):** son complejos exclusivos de las células animales (Wilson 2004) formados por una proteína nuclear y cadenas de GAGs. Los PGs son indispensable en procesos de comunicación de la célula con el medio que la rodea (Esko et al 2009, Varki & Lowe 2009). Así mismo, pueden interactuar con diferentes sustancias como citoquinas, selectinas, factores de crecimiento y con

moléculas específicas de la ECM, actuando como receptores de ligandos en distintos procesos celulares (Fuki et al 1997, Miao et al 1995). Existen diversos tipos de PGs, unos anclados a la membrana celular y otros intersticiales.

- PGs de membrana: Se destaca la familia de los sindecanos y los glicoproteínas, así como la glicoproteína CD44 (Schmidt et al 1995).

- PGs intersticiales: Forman parte del tejido conjuntivo y se clasifican en 2 familias, los lecticanos (o familia del agregano) que incluyen proteínas como agregano, versicano, brevicano y neurocano, y los SLRPG, una familia de 9 miembros caracterizados por la repetición de leucina.

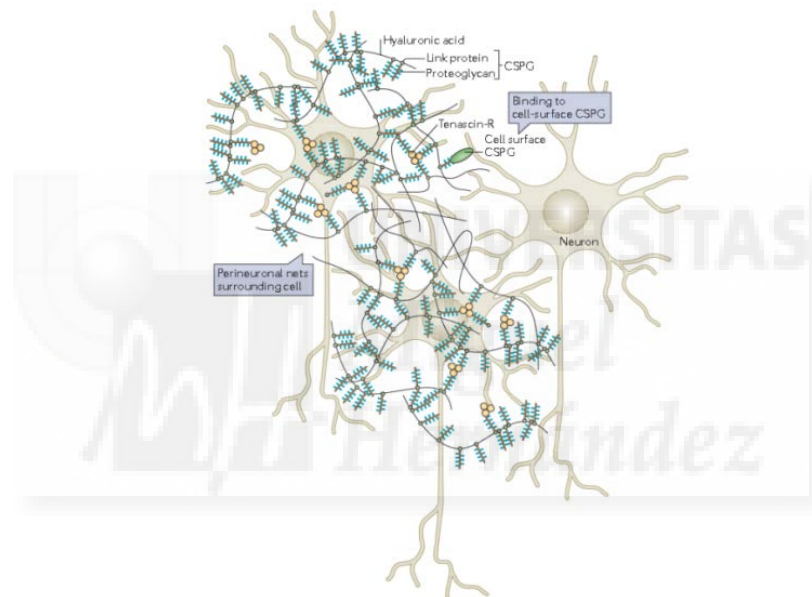


**Figura 1.1. Representación de proteoglicanos y glicoproteínas en la superficie celular.** Muestra la interacción de éstos con cadenas de heparán sulfato (línea azul punteada) y HA. Se representan también los sindecanos, unidos a cadenas de condritín sulfato (línea verde punteada). El HA es un GAG largo (línea naranja punteada) que se une al CD44, el cual, a su vez, puede tener anclados condritín sulfato, heparán sulfato y otros oligosacáridos. El esquema evidencia que tanto las proteínas plasmáticas (óvalos grises) como los cationes y aminoácidos catiónicos, se asocian con los GAGs. Figura extraída de Tarbell and Pahakis (2006).

**Glicoproteínas:** son moléculas de adhesión conformadas por la unión de una proteína con cadenas de oligosacáridos, incluyen por ejemplo a las

fibronectinas, laminina, tenacina e integrinas, que tienen funciones estructurales y de reconocimiento celular.

En el sistema nervioso central (CNS) se encuentran estructuras reticulares que rodean los cuerpos celulares de varias neuronas y se extienden a lo largo de sus dendritas. Estas estructuras conocidas como redes perineuronales (PNNs), son consideradas una ECM especializada en el CNS (Figura 1.2). Los componentes principales de las PNNs son el ácido hialurónico, los proteoglicanos como el coindritin sulfato (CSPGs), heparán sulfato y glicoproteínas como la tenacina (Tn-R) (Carulli et al 2007, Koppe et al 1997, Kwok et al 2010).



**Figura 1.2. Redes Perineuronales (PNNs).** Representación de la estructura básica de una Red Perineuronal alrededor de células del cerebro. Las PNNs son redes de ácido hialurónico, proteoglicanos y moléculas de tenacina. Las cadenas de ácido hialurónico recubiertas con proteoglicanos, unidos por moléculas de tenacina R forman una estructura organizada alrededor de las neuronas. Figura extraída de (Mouw et al 2014).

Diversos estudios han demostrado que las PNNs están involucradas en el control de la plasticidad neuronal del CNS (Kwok et al 2011), así como en el control de la difusión de ciertos iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), facilitando un microambiente adecuado alrededor de ciertas neuronas para mantener su actividad (Hartig et al 1999, Hartig et al 2001).



## 1.2 El ácido hialurónico

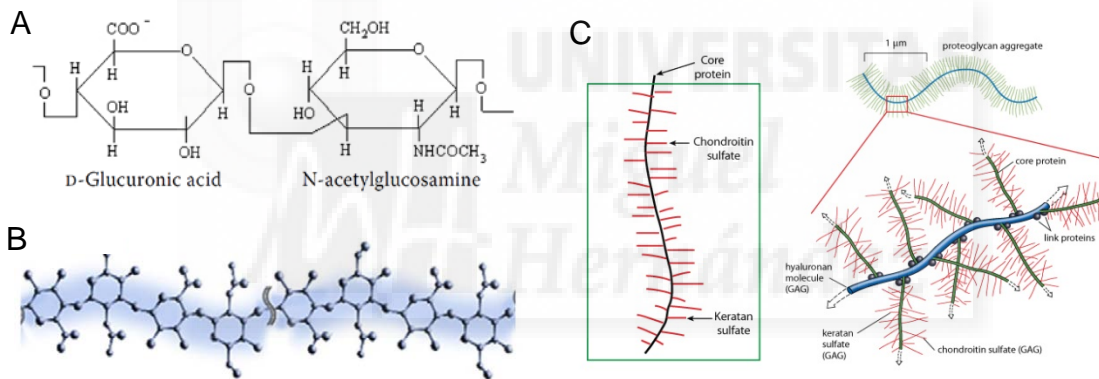
El ácido hialurónico es un polisacárido ampliamente expresado en la matriz extracelular (ECM) de muchos tejidos de los mamíferos. Es una molécula de gran volumen, por lo que está involucrada en dar estructura a la ECM, además de hacer de ésta un ambiente apropiado para el movimiento y proliferación celular. Se purificó por primera vez en 1934 por Karl Meyer y John Palmer, a partir de humor vítreo proveniente de ojos de bovinos (Palmer 1934), sustancia química que para entonces era desconocida. Meyer y Palmer describieron un ácido polisacárido de alto peso molecular que aparentemente se encontraba combinado en forma de sal en el humor vítreo. Concluyeron que la sustancia extraída estaba formada por ácido urónico, una amino-glicosa, además de una posible pentosa. Posteriormente, y a partir del nombre de éste polisacárido, se derivó el de ácido hialurónico, combinando ácido urónico con la palabra “*hyalos*” (vidrioso en griego) (Palmer 1934).

En los años siguientes, Karl Mayer y sus colaboradores, aislaron ácido hialurónico de otros tejidos tales como el fluido sinovial en la articulación, la piel, el cordón umbilical y la cresta de gallo. También se encontró ácido hialurónico en la cápsula de los estreptococos (Kendall et al 1937). En los años 50, Endre A. Balazs, comenzó a utilizar una fracción no inflamatoria del HA como sustituto o reemplazo del cuerpo vítreo a nivel clínico en humanos, durante la cirugía de cataratas (Balazs et al 1972), ampliándose posteriormente su uso en humanos para diversas aplicaciones terapéuticas como la visco-suplementación que se emplea en el tratamiento de patologías articulares como la osteoartritis (OA).

### 1.2.1 Estructura del hialuronato sódico

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano (GAG) lineal no ramificado, aniónico, no sulfatado, presente en los organismos vivos. Su estructura química fue resuelta por Karl Meyer y asociados en 1950. El ácido hialurónico es una molécula lineal larga compuesta por repeticiones de disacáridos conformados por ácido glucurónico (GlcA) y por N-acetil glucosamina (GlcNAc), unidos entre ellos mediante enlaces glicosídicos en las posiciones  $\beta$ 1-4 y  $\beta$ 1-3, de la siguiente

manera: [(1-3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1-4)- $\beta$ -D-GlcA] (Figura 1.3). La estructura del ácido hialurónico está conservada en todos los mamíferos, lo que sugiere que dicho polisacárido es una molécula de importancia considerable (Chen & Abatangelo 1999). En los organismos vivos, el ácido hialurónico se encuentra en forma de sal (hialuronato), frecuentemente unido al catión sodio, formando hialuronato sódico (HA). Las unidades de disacáridos unidas entre sí, pueden llegar a formar un polímero muy largo y de una gran masa molecular, ya que el peso molecular del ácido hialurónico es dependiente del número de disacáridos que componen la cadena que lo forma (Figura 1.3.B). Adicionalmente, a la molécula de HA se unen otros GAG como coindritin sulfato, heparán sulfato y agrecanos (Figura 1.3.C). Estas uniones se dan a través de proteínas de unión específicas para el HA, de las cuales se comenta más adelante.



**Figura 1.3 Estructura química del HA.** **A.** Estructura del disacárido que compone el ácido hialurónico [(1-3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1-4)- $\beta$ -D-GlcA]. **B.** Representación molecular de una cadena de ácido hialurónico (repeticiones del disacárido mostrado en A. Extraído de Necas J et al, 2008 (A), Ki Su Kim, et al, 2012 (B)). **C.** Agregados de PG entorno a la molécula de HA.

### 1.2.2 Distribución del hialuronato sódico

El HA está presente en lo largo de todos los organismos vertebrados. En los mamíferos el HA, que se encuentra principalmente como hialuronato sódico, HA, se encuentra ampliamente distribuido en una variedad de tejidos tales como epitelios, cartílago, cordón umbilical, ECM, cartílago nasal, cerebro y humor vítreo, así como en algunos fluidos como el líquido sinovial y el suero sanguíneo (Laurent et al 1996, Yasuhara et al 1994). En el líquido sinovial de las articulaciones sanas

este GAG suele ser de alto peso molecular (4-6 MDa) y está presente a altas concentraciones (alrededor de 2-20 mg/ml). La concentración del ácido hialurónico es de especial importancia para su función, y se ha detectado en fluidos como la orina o el líquido amniótico. Durante años se han desarrollado técnicas simples que permiten identificar la presencia del ácido hialurónico para su empleo como un marcador patológico, lo que ha contribuido al diagnóstico de diversas enfermedades como la artritis, la psoriasis, la cirrosis, y también para evaluar el éxito de los trasplantes de hígado (Engstrom-Laurent 1989).

Adicionalmente, se ha demostrado que el HA también está presente en la cápsula de algunos patógenos microbianos, como el estreptococo (*Streptococcus pyogenes*, *equi* y *uberis*) (Faber & Rosendal 1954, Kendall et al 1937), los cuales usan el hialuronato sódico para encapsularse con fines defensivos, facilitando también la adhesión y la colonización.

### **1.2.3 Síntesis y degradación del hialuronato sódico**

Las moléculas de ácido hialurónico son sintetizadas por un tipo de proteínas de membrana denominadas hialuronico sintasas (HAS), las cuales están altamente conservadas en los vertebrados. Existen tres tipos de HA sintasas o HASs, y son la HAS1, HAS2 y HAS3. Las HASs son proteínas glicosiltransferasas encargadas de polimerizar coordinadamente una cadena de ácido hialurónico, uniendo ácido glucurónico y ácido-N-acetilglucosamina a partir de nucleótidos de azúcares activados como sustratos (UDP = ácido glucurónico y UDP-N = acetilglucosamina), translocando posteriormente el ácido hialurónico fuera de la célula hacia la ECM. La unión de disacáridos va formando una molécula con una estructura similar a una red, pudiendo alcanzar distintos tamaños de acuerdo al número de disacáridos que contenga la molécula. En diversos tipos de ratones genéticamente nulos para cada una de estas tres proteínas, se ha demostrado que el HA regula el volumen del espacio extracelular en el cerebro y que está relacionado con la excitabilidad neuronal en el hipocampo (Arranz et al 2014).

En las articulaciones, el ácido hialurónico es producido principalmente por los sinoviocitos de tipo B que conforman la capsula sinovial. La presencia de ácido

hialurónico en bacterias (Kendall et al 1937) promovió el estudio de la síntesis de este polisacárido en dichos organismos, concluyendo que varias cepas de *Streptococcus* durante su fase de crecimiento producen complejos de ácido hialurónico de alto peso molecular. Actualmente, el HA para usos biomédicos se extrae principalmente de dos fuentes: 1) de tejidos animales, obteniendo HA a partir de la cresta de gallo, el cordón umbilical, el líquido sinovial o el humor vítreo de ganado, y 2) de la fermentación bacteriana, ya que se ha identificado el operon *has*, mencionado anteriormente, el cual codifica para los genes involucrados en la síntesis del polisacárido.

Por otra parte, la degradación del HA en mamíferos es llevada a cabo principalmente por la acción de tres enzimas que se encuentran tanto intracelular como extracelularmente. Estas enzimas son: hialuronidasa (Hya), b-D-glucuronidasa y  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa. El mecanismo por el cual estas enzimas degradan el HA es diferente en cada caso. La hialuronidasa corta la molécula de HA de alto peso molecular produciendo pequeños fragmentos de oligosacáridos, disminuyendo así la viscosidad de la solución. Las otras dos enzimas, b-D-glucuronidasa y  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidasa, reducen los oligosacáridos, eliminando sus azúcares terminales (Leach & Schmidt 2004).

#### **1.2.4 Propiedades reológicas del hialuronato sódico**

La reología comprende el estudio de la deformación y fluidez de la materia. Desde esa perspectiva, el estudio de las propiedades reológicas del ácido hialurónico han sido de gran interés. El ácido hialurónico en solución forma una molécula compleja y flexible, entrelazada con ella misma y con moléculas de agua. Este carácter hidrofílico del HA promueve la hidratación de los tejidos o fluidos donde se encuentra, tal como ocurre en el humor vítreo o el líquido sinovial de las articulaciones, proporcionándoles una estructura compleja de red.

Otra de las propiedades reológicas que caracteriza a éste polímero es la *viscosidad*, que es la medida de la resistencia de un fluido a la deformación, depende de la concentración y del peso molecular del HA, y es sensible a la degradación del polímero. A altas concentraciones de hialuronato sódico, las

moléculas se entrelazan entre ellas mediante puentes de hidrógeno, formando una red continua de cadenas de HA (Ogston & Stainer 1953). La *elasticidad*, otra de las propiedades características de este polímero, está relacionada con un comportamiento pseudoplástico, lo que le permite a la molécula deformarse y comportarse como un fluido.

De esta manera, la **visco-elasticidad**, es la propiedad reológica conjunta que mejor caracteriza al ácido hialurónico. Esta propiedad le permite actuar como gel gracias a sus propiedades de viscosidad, o como fluido por sus características elásticas. En las articulaciones esta propiedad es de gran importancia, ya que además de lubricar (Laurent et al 1996), el ácido hialurónico del líquido sinovial actúa como un filtro amortiguador de las fuerzas que impactan las articulaciones con el movimiento, lo que le permite deformarse (Balazs & Sundblad 1959). Sin embargo, en patologías como la osteoartritis (OA), este GAG se degrada y su viscosidad-elasticidad decae dramáticamente, perdiendo gran parte de sus propiedades reológicas.

### **1.2.5 Funciones fisiológicas del hialuronato sódico**

Desde su identificación hace más de 70 años, se ha visto que el hialurónico está involucrado en un número importante de funciones celulares, que incluyen:

- Mantenimiento de la visco-elasticidad en los tejidos conectivos, debido a que el ácido hialurónico forma cadenas de gran tamaño (rol estructural), y también actúa como lubricante. Estas propiedades son de importancia en el líquido sinovial, ya que en patologías como la osteoartritis (OA), el ácido hialurónico presente en el líquido sinovial se degrada, perdiendo las propiedades visco-elásticas, lo que se ha relacionado con algunos síntomas de esta patología.
- Debido a su carácter higroscópico, este polisacárido es fundamental en la modulación de la hidratación en los tejidos, así como en el balance osmótico (Comper & Laurent 1978).
- Tiene un papel importante en la organización, modificación y ensamblaje molecular de la ECM, debido a la interacción con diferentes proteínas, y promueve la migración celular, jugando un papel importante en el desarrollo embriológico.

- Actúa como molécula de señalización intracelular de diversos procesos celulares como adhesión, crecimiento y diferenciación, a través de la interacción con receptores de la membrana plasmática. Se sugiere que los receptores CD44 y RHAMM están involucrados en los procesos de metástasis (Toole 2002).
- Está involucrado en la proliferación celular, ya que se ha demostrado que este polisacárido se encuentra en mayor cantidad durante procesos de mitosis (Brecht et al 1986). Por otra parte, también se ha demostrado que el ácido hialurónico inhibe la diferenciación de los osteoclastos, lo que podría ser un beneficio a nivel clínico para el uso en huesos erosionados a causa de problemas artríticos (Chang et al 2007).

### **1.2.6 Interacciones químicas del Hialuronato**

El HA es un GAG cargado negativamente, lo que le confiere la capacidad de establecer uniones de tipo electrostático, como ocurre con el agua y con ciertos iones de carga positiva como el  $\text{Na}^+$ . También es capaz de establecer asociaciones intermoleculares, mediante uniones covalentes, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals, llegando a formar una malla o red de gran tamaño. Existen también interacciones intramoleculares, dentro de las propias moléculas de HA mediante puentes de hidrógeno.

Entre las moléculas de la ECM con las que interactúa el HA, se incluyen los proteoglicanos, mencionados anteriormente, tales como los agreganos, versicanos, brevicanos, neurocanos, entre otros, los cuales se asocian a moléculas de HA a través de dominios específicos de unión al polímero, formando agregados multimoleculares (Morgelin et al 1994). Estos tienen un importante rol en la formación y estabilidad de la ECM, así como en la regulación del comportamiento celular durante procesos como el desarrollo, tumorigénesis e inflamación.

Se ha demostrado que el HA emplea diferentes dominios para su interacción con proteínas o receptores de membrana, entre los que destacan el *Link module* y el *B(X<sub>7</sub>)B*.

El *Link Module* es un dominio proteico de alrededor de 100 amino ácidos, caracterizado por una secuencia consenso de cuatro cisteínas unidas por enlaces disulfuro, (Bork et al 1996). Diversas moléculas como el receptor CD44, los agrecanos, el TSG-6 o la proteína de unión del cartílago, entre otros, contienen este dominio. El CD44 es una glicoproteína de membrana ampliamente expresada en muchos tipos celulares, incluyendo algunas células neuronales y condrocitos (Haynes et al 1989). Actúa como receptor del HA, y está involucrado en diferentes funciones celulares; por ejemplo, en las neuronas participa en su migración, mientras que en los condrocitos y queratinocitos, está involucrado en el ensamblaje y probablemente también la degradación de la ECM (Haynes et al 1989). Por otra parte, está la proteína TGS-6, que es inducida en procesos inflamatorios y su expresión ha sido demostrada en fibroblastos, condrocitos y células sinoviales, así como también en líquido sinovial de pacientes artríticos pero no en pacientes sanos (Wisniewski et al 1993).

El otro dominio que emplea el HA para unirse a proteínas de membrana, es un motivo cargado positivamente, conocido como B(X<sub>7</sub>)B, donde B representa un residuo de arginina o lisina, mientras que X<sub>7</sub> hace referencia a 7 residuos de amino ácidos no ácidos, donde al menos uno es básico y la mayoría de los residuos son hidrofóbicos (Yang et al 1994). El receptor RHAMM es uno de los que interactúa con el HA mediante este dominio, y el complejo HA:RHAMM está involucrado en la regulación de la movilidad y proliferación celular (Turley et al 1993). El receptor CD44, la proteína TSG-6 y los agrecanos contienen este motivo B(X<sub>7</sub>)B dentro del Link Module (Kohda et al 1996).

Otros dominios permiten la unión del HA a diferentes proteínas, como la Ial (inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina), que ha sido encontrado a altas concentraciones en el líquido sinovial de pacientes con patologías artríticas (Yingsung et al 2003), habiéndose sugerido que jugaría un rol en la respuesta inflamatoria, a través de la regulación de la adhesión de los leucocitos (Zhuo et al 2004). La interacción del HA con receptores como HAHARE, RHAMM y el receptor TLR2, puede modular distintos procesos como migración celular, apoptosis, tumorigénesis e inflamación (Day & Mascarenhas 2004, Scheibner et al 2006).



Se ha demostrado también que el HA tiene un efecto directo sobre ciertos canales, como es el caso de los canales activados por estiramiento, en los que se observó que el HA reduce su activación por el estímulo mecánico (De la Peña et al 2002). El HA interactúa de forma directa a través del dominio I<sub>1</sub> (inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina) y modula los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo L (L-VDCCs) en el hipocampo, aumentando las corrientes de calcio y regulando así la plasticidad sináptica (Kochlamazashvili et al 2010).

### 1.3 Familia de canales iónicos TRP

Los canales TRP constituyen una familia de canales iónicos no selectivos. Han sido identificados más de 100 genes de la familia de canales TRP en diferentes especies animales (Tabla 1.1), cada uno con diferentes propiedades funcionales y participación diversa en múltiples procesos fisiológicos. En muchos tipos celulares, estos canales actúan como sensores, detectando cambios en el entorno celular (Damann et al 2008).

	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> <sup>b</sup>	<i>Ciona intestinalis</i> <sup>b</sup>	<i>Fugu rubripes</i>	<i>Danio rerio</i> <sup>b</sup>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>
TRPC	3	3	8	8	8	7	6
TRPV	3	5	2	4	4	6	6
TRPM	1	4	2	6	6	8	8
TRPA	4	2	4	1	2	1	1
TRPN	1	1	1	-	1	-	-
TRPML	4	1	9	2	2	3	3
TRPP	1	1	1	4	4	3	3
Total	17	17	27	25	27	28	27

**Tabla 1.1 Canales TRP de la mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*), del gusano (*Caenorhabditis elegans*), ascidia (*Ciona intestinalis*), del pez globo (Seifuku, *Fugu rubripes*), pez cebra (*Danio rerio*), del ratón y el humano.** Los números corresponden a las proteínas con distintas propiedades del canal en cada subfamilia. Extraído de Nilius y Owsianik, 2011

#### 1.3.1 Origen de los canales iónicos TRP

El origen del estudio de los canales TRP comenzó en 1969 con el hallazgo de Cosens y Manning (Cosens & Manning 1969) en la mosca *Drosophila melanogaster*, mostrando que ésta presentaba una anomalía funcional a nivel de la retina que correspondía a una mutación espontánea en el gen *trp*. El registro



del potencial receptor global en fotorreceptores del ojo de la mosca, evocado por estímulo luminoso (electrorretinograma), reveló que las moscas mutantes en el gen *trp* tenían un potencial receptor transitorio que rápidamente retornaba a la línea basal durante la iluminación, mientras que en las moscas silvestres (WT) el potencial receptor mantenía una meseta.

Debido al carácter transitorio de la respuesta en estos canales iónicos, se denominó a la familia, canales TRP (Transient Receptor Potential, en inglés) (Minke et al 1975). Años después, en 1989, se clonó y obtuvo la secuencia de aminoácidos del gen *trp* de *Drosophila*, y se mostró que el gen *trp* codificaba proteínas transmembrana necesarias para la fototransducción (Montell & Rubin 1989). La evidencia directa de que esta proteína TRP era un canal iónico activado por la luz vino tras la introducción de la técnica de “*patch-clamp*”, con la que se pudo registrar directamente la actividad de los canales en los fotorreceptores de *Drosophila*, llegándose a demostrar que se trataba de canales iónicos altamente permeables a  $Ca^{2+}$  (Hardie & Minke 1992).

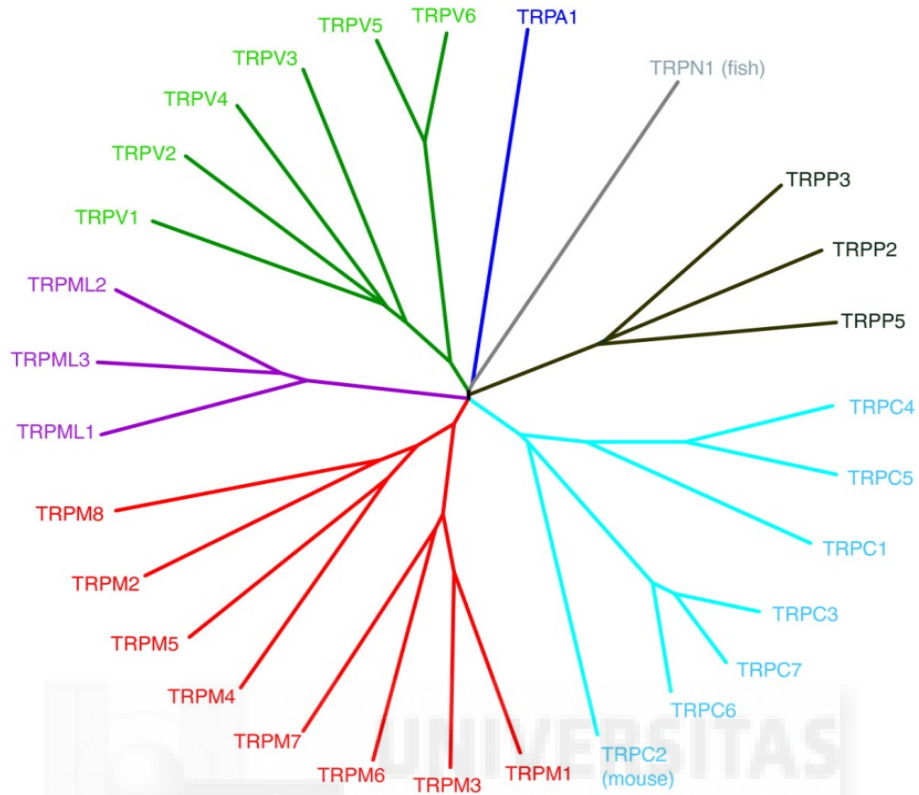
### 1.3.2 Nomenclatura y distribución filogenética de los TRP

En los organismos multicelulares, en los reinos Animalia y Fungi, se encuentra expresada una amplia variedad de canales TRP con funciones diferentes. Los canales TRP se clasifican de acuerdo a la similitud de su secuencia primaria de aminoácidos.

En mamíferos, la familia de canales TRP se origina por 28 genes que codifican para los respectivos canales iónicos TRP, y se divide en 6 sub-familias denominadas TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPML, TRPP y TRPN (Clapham 2003, Montell et al 2002) (Figura 1.4).

- Sub-familia TRPC (C, canónico), es la que mayor homología presenta con el canal descrito en *Drosophila*. Este grupo cuenta con 7 miembros (C1-C7), de los que se identificó el TRPC2 en humanos, siendo no funcional (Wes et al 1995).

- Subfamilia TRPV (**V**, vaniloide), identificado por su respuesta a los compuestos vaniloides como la capsaicina (Caterina et al 1997) y de ahí su nombre. Esta sub-familia está compuesta por 6 miembros (V1-V6).
- Subfamilia TRPM (**M**, melastatina), la conforman 8 miembros (M1-M8). Denominado de esta manera por el primer miembro identificado, TRPM1, que fue inicialmente denominado melastatina, ya que su mutación está asociada con una mutación autosomal recesiva que causa ceguera nocturna (Duncan et al 1998).
- Subfamilia TRPA (**A**, anquirina), identificado como el receptor de anquirina por sus numerosas repeticiones de anquirina en el N-terminal, consiste en un único miembro expresado en mamíferos (TRPA1).
- Subfamilia TRPML (**ML**, mucolipin), relacionada con la proteína MCOLIN, involucrada en un desorden lisosomal neurodegenerativo, mucopolidosis tipo IV (Sun et al 2000). Esta subfamilia está conformada por 3 miembros (ML1-ML3).
- Subfamilia TRPP (**P**, policistina), formada por tres miembros, TRPP2, TRPP3, TRPP5. Su nombre se debe a que contiene la proteína PKD, que en su forma mutante es responsable de la patología de riñón poliquístico (Wu et al 1998).
- Subfamilia TRPN (**N**, NOMP-C), denominado de esta manera por el canal NO mecánico, descrito en *Caenorhabditis elegans*. Esta familia está presente en el pez cebra (*Danio rerio*) y en la rana (*Xenopus laevis*) (Shin et al 2005, Sidi et al 2003), sin embargo está ausente en mamíferos.



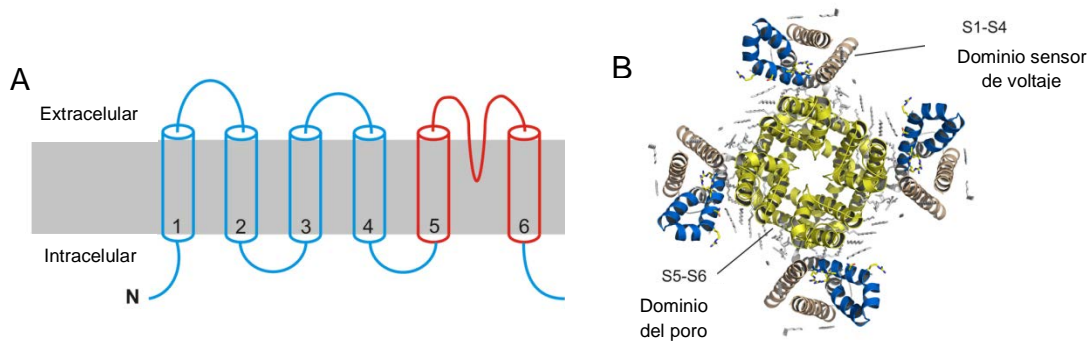
**Figura 1.4** Árbol filogenético de los canales iónicos TRP expresados en humanos. La secuencia de los análisis de homología muestra las 7 subfamilias que compone la amplia familia de canales TRP, cada una de ellas representada en color diferente. TRPC (canónico), TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPA (anquirina), TRPP (pilicistina), and TRPML (mucopolina). A pesar de que el TRPN no se expresa en humanos y el TRPC1 no es funcional, han sido incluidos para mostrar las relaciones entre ellos. Extraído de Nilius and Owsianik (2011).

### 1.3.3 Estructura general de los TRP

Los canales TRP han sido un importante foco de investigación desde que fue clonado el primer miembro en 1989. A pesar de estos esfuerzos, las bases estructurales y los mecanismos que sustentan la función de los canales TRP continúan siendo comprendidos de manera incompleta. Esto se debe en parte a la limitada información estructural de alta resolución con la que se cuenta.

La mayor parte de la información disponible sobre la estructura de los TRP proviene de la investigación realizada *in silico* y de su similitud en cuanto a función y propiedades farmacológicas de los canales voltaje dependientes de potasio, Kv, una familia de canales iónicos de los que se conoce muy bien su biofísica, farmacología y estructura (Kalia & Swartz 2013). A continuación se

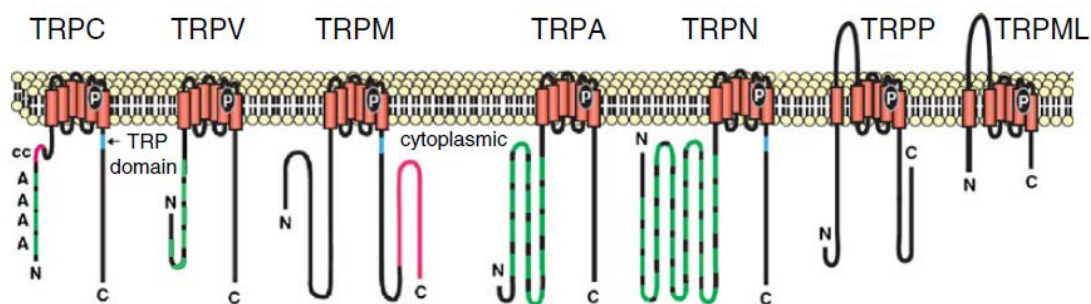
muestra un esquema general de la estructura básica que comparten los canales Kv y los de la familia TRP (figura 1.5).



**Figura 1.5 Representación esquemática de los canales Kv y TRP. A.** Representación de la topología transmembrana de las subunidades de los canales conteniendo seis segmentos transmembrana con la región del poro formada por los segmentos S5 y S6 (rojo). **B.** Estructura cristalina de un tetrámero ensamblado con la quimera Kv1.2 y Kv2.1 vista desde el lado extracelular. En azul se muestran los motivos de las aletas S3b-S4. Extraído de Kalia and Swartz (2013)

Las proteínas TRP están formadas por 4 sub-unidades ensambladas cada una por 6 dominios transmembrana  $\alpha$ -hélice (S1-S6). Estas 4 sub-unidades se ensamblan simétricamente en una arquitectura tetramérica alrededor de un poro central, formado por los dominios S5 y S6, que penetran en la membrana plasmática formando el *loop* entre S5-S6 del lado extracelular. Este *loop* actúa como un filtro de selectividad iónica. A los extremos de los dominios S1 y S6 se encuentran unidos los extremos citoplasmáticos N y C-terminal, respectivamente (Figura 1.5A). Se piensa que la mayoría de canales TRP funcionan como homotetrámeros aunque se ha demostrado la formación de heteromultímeros entre miembros de la misma subfamilia.

En el extremo C-terminal de las familias TRPC, TRPM y TRPN se encuentra una región de 23-25 aminoácidos altamente conservada, denominado “caja TRP”. En el extremo N-terminal de algunos canales TRP como los de las familias TRPP, TRPML, TRPA y TRPV, se encuentra un pequeño motivo de múltiples repeticiones de anquirina. Estas repeticiones de anquirina han sido implicadas en la formación de la estructura tetramérica del canal, participando en la interacción proteína – proteína y sirven además como sitio de unión para diversos ligandos (Clapham 2003, Clapham et al 2005) (Figura 1.6).



**Figura 1.6 Familia de los canales iónicos TRP.** Se muestra un esquema de un monómero de cada subfamilia: TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPN, TRPP y TRPML. Se observan los 6 dominios transmembrana, los extremos N y C-terminal, las **repeticiones de anquirina (A)** en el N-terminal, la región del poro (P) y la “caja TRP” (Montell 2011).

### 1.3.4 Permeabilidad iónica y mecanismo de apertura.

La mayoría de los canales TRP funcionales son canales catiónicos no selectivos, variando entre ellos la permeabilidad relativa a los cationes. Por ejemplo, la permeabilidad relativa al  $\text{Ca}^{2+}$  oscila entre una situación extrema como la de TRPM4 y TRPM5 que no son permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y sí a cationes monovalentes, o la de TRPV5 y TRPV6, que muestran una gran permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  comparada con la permeabilidad a  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$ ) (revisado en Gees et al (2010).

Hay una gran variabilidad en los mecanismos que activan los canales TRP. Algunos se abren con la unión a un ligando, mientras otros lo hacen por cambios de voltaje, de temperatura o por un estímulo mecánico (Caterina et al 1997, Julius 2013, Voets et al 2004). Muchos de ellos son polimodales, es decir, son capaces de responder a distintos tipos de estímulos.

### 1.3.5 Expresión y función de los canales TRP

En los mamíferos, los canales iónicos TRP se encuentran ampliamente expresados en todo el organismo, tanto en las células excitables como en las no excitables, y su función depende del lugar donde se encuentran. Su disfunción da lugar a una gran variedad de enfermedades adquiridas o hereditarias (Everett 2011).

Los defectos en el funcionamiento de los canales iónicos usualmente conllevan patologías diversas. Estas patologías derivadas del mal funcionamiento de los canales iónicos se conocen como canalopatías. Dentro de las canalopatías asociadas a los TRPs, se distinguen aquellas causadas por el mal funcionamiento de alguna proteína TRP, resultante de mutaciones en los genes que las codifican.

Debido a la importante participación en procesos fisiológicos y patológicos, los canales TRP son también dianas para el diseño de fármacos que puedan modular su función (Fernandez-Ballester et al 2011). Actualmente se han identificado mutaciones en 6 miembros de la familia de canales TRP relacionadas con canalopatías identificadas en humanos, como la Glomeruloesclerosis Focal y Segmentaria (TRPM6), Mucopolidosis tipo IV (TRPML1), Hipomagnesemia con Hipocalcemia Secundaria (TRPM6), Riñón Poliquístico Autosómico (TRPP1/TRPP2) y Síndrome de Exceso de Aromatasa (TRPM7). Eventualmente algunas mutaciones en TRPM7 son responsables del incremento en la probabilidad de padecer Esclerosis Lateral Amiotrófica y Parkinson (Nilius 2007).

Los canales TRP son receptores polimodales y por ello pueden detectar alteraciones en la homeóstasis celular y reaccionar ante ellas. Su funcionamiento alterado puede dar lugar al desarrollo de diversas patologías mediante alguno de los siguientes mecanismos: 1) Modificaciones en las  $[Ca^{2+}]_i$ , desencadenando eventos de señalización intracelular y provocando efectos importantes en procesos celulares y/o sistémicos, ya que la mayoría de los canales TRP regulan la entrada de  $Ca^{2+}$ ; 2) Problemas en la regulación somato-sensorial por desajustes en la percepción o transducción de los estímulos; 3) Alteración de los procesos de proliferación y crecimiento celular dependientes de algunos canales TRP, que a su vez modifican el crecimiento y desarrollo de tumores y 4) Alteración de canales TRP expresados en células excitables del sistema nervioso, provocando disfunciones nerviosas importantes (Nilius 2007).

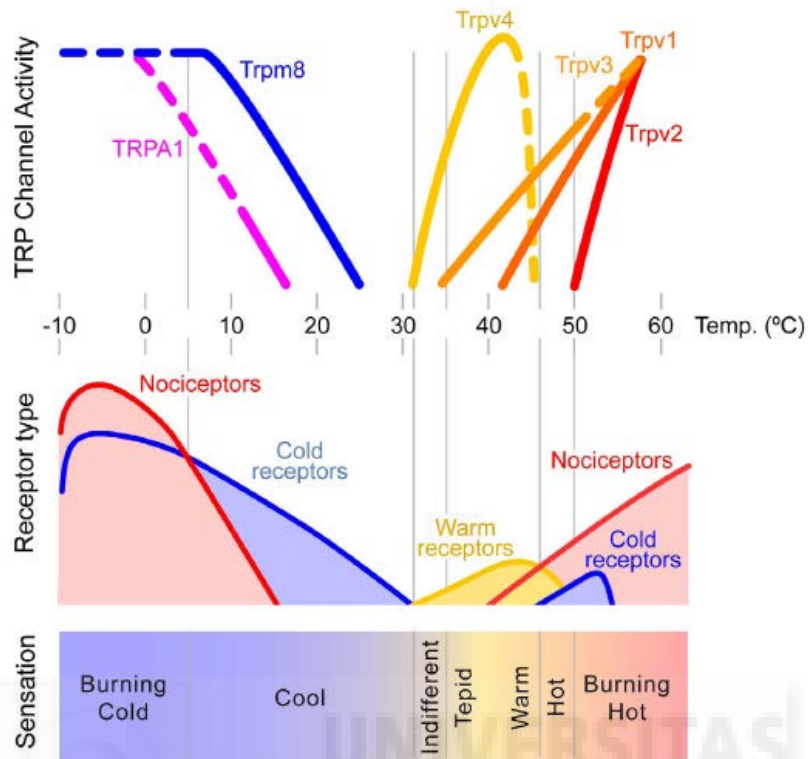
### **1.3.6 Canales TRP y la termosensación**

Los organismos vivos detectan y responden a los cambios de temperatura del ambiente en parte gracias a los canales iónicos termosensibles, que están



localizados en las terminaciones nerviosas periféricas termorreceptoras de neuronas sensoriales primarias que inervan la piel y los epitelios de las mucosas expuestas (como la córnea o las mucosas oral y nasal) y transformar los estímulos térmicos en señales eléctricas y bioquímicas. Este mecanismo permite a los organismos vivos evitar temperaturas extremas que pueden poner en peligro su supervivencia. Los termorreceptores forman parte del sistema somatosensorial y detectan alteraciones en los cambios de temperatura ambiental en un rango amplio, desde el frío lesivo hasta calor nocivo, abarcando así todo el rango de temperaturas a las que están usualmente expuestos la mayoría de los mamíferos (Belmonte & Viana 2008).

Los principales responsables en la detección de la temperatura en las terminaciones nerviosas de los mamíferos son los canales TRP (Voets et al 2004), los cuales responden cada uno a umbrales específicos de temperatura (Figura 1.7). Las temperaturas dentro del rango de calor nocivo son percibidas por TRPV2 y TRPV1, cada uno con umbrales distintos, TRPV2  $\geq 52$  °C (Caterina et al 1999) y TRPV1  $\geq 42$  °C (Caterina et al 1997). Dentro del rango de temperaturas intermedias se encuentran TRPV3  $\sim 34-38$  °C, (Xu et al 2002) y TRPV4  $\sim 27-35$  °C (Watanabe et al 2002). Finalmente, el umbral de los canales TRPM8 y TRPA1 activados por frío inocuo y nocivo, está en  $\sim 25-28$  °C (McKemy 2002) y  $\leq 17$  °C (Story et al 2003), respectivamente. Los potenciales de acción producidos en las neuronas termorreceptoras como resultado final de la activación de estos canales, viajan mediante las fibras aferentes de las neuronas de los ganglios sensoriales a la médula espinal, donde se generan respuestas reflejas, o llevando la información hasta el cerebro, donde la información es integrada e interpretada, produciendo respuestas cognitivas ante el estímulo térmico (Julius & Basbaum 2001). Los umbrales de temperatura para la activación de los diversos TRPs, pueden ser modulados por mediadores extracelulares liberados por daño en el tejido o por inflamación (Vay et al 2012).



**Figura 1.7 Correspondencia entre los canales TRP.** Parte superior: Representación esquemática del perfil de activación térmica de varios canales TRP expresados en sistemas recombinantes. Todos ellos han sido localizados en neuronas sensoriales y/o células de la piel. Parte media: Representación esquemática de la frecuencia de descarga de impulsos nerviosos en varios termorreceptores sensoriales cutáneos dentro de sus rangos de disparo respectivos, durante la aplicación de las temperaturas indicadas en la escala térmica. Parte inferior: Cualidad de las sensaciones evocadas en humanos por la aplicación de las diferentes temperaturas sobre la piel (Belmonte & Viana 2008).

## 1.4 Canal iónico TRPV1

El canal TRPV1 fue el primer canal TRP descubierto en mamíferos, y ha sido el más estudiado desde su clonación en 1997 (Caterina et al 1997). En la fisiología sensorial se considera como un integrador de múltiples estímulos dolorosos como calor nocivo, sustancias químicas o protones (Tominaga et al 1998). El receptor de capsaicina o canal TRPV1, conocido así por responder selectivamente a la capsaicina (el ingrediente picante de los chiles y comidas picantes) es un canal polimodal, por lo que se activa por estímulos de diversa naturaleza: temperaturas  $\geq 42$  °C, compuestos vaniloides como la capsaicina y resiniferatoxina (RTX), pH ácido ( $\leq 5.9$ ) (Baumann & Martenson 2000), múltiples



mediadores endógenos de la inflamación incluyendo lípidos como anandamida y lipoxigenasa, y eicosanoides como 12-HPETE (Hwang et al 2000).

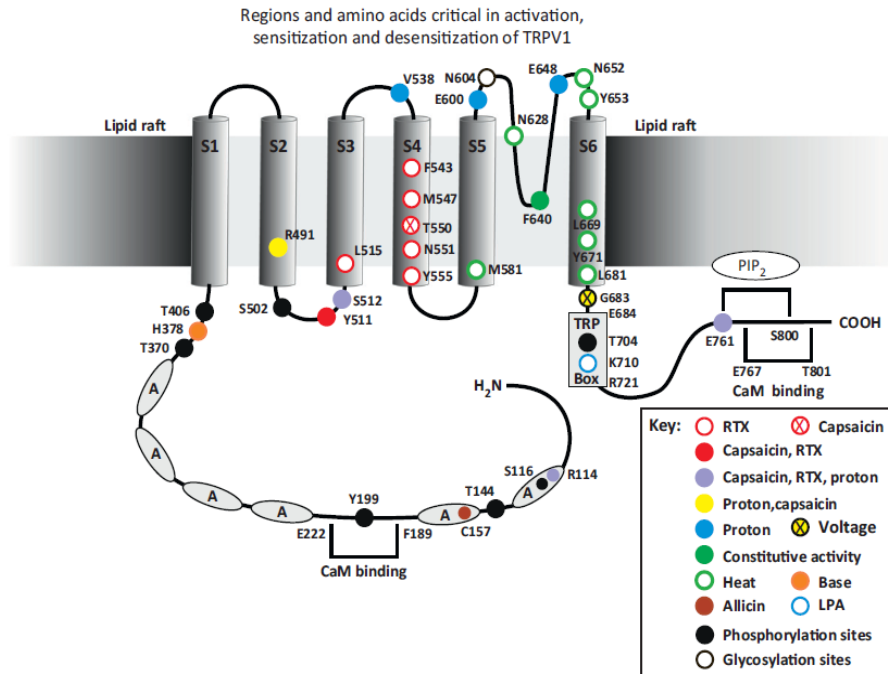
#### **1.4.1. Topología y estructura de TRPV1**

El canal TRPV1 es uno de los canales TRP de los que mejor se conoce la estructura y mecanismo, habiéndose obtenido recientemente datos sobre su estructura mediante electro-criomicroscopía (Cao et al 2013, Liao et al 2013).

Estructuralmente, el canal TRPV1 es una proteína de membrana de 839 aminoácidos con una masa molecular relativa de 95 KDa en el TRPV1 humano (Caterina et al 1997). Al igual que los demás canales de la familia TRP, la estructura funcional de TRPV1 es la de un tetrámero en el que cada subunidad consta de seis dominios transmembrana  $\alpha$ -hélice, un poro formado entre los segmentos S5 y S6 y un largo dominio citoplasmático C y N-terminal (Tominaga & Tominaga 2005), que contiene 6 dominios de anquirina (Lishko et al 2007) y donde se encuentra el sitio de unión para la calmodulina (CaM), sitio involucrado en la sensibilización del canal.

Recientemente (Fischer et al 2014) se ha descrito que el canal TRPV1 forma heterómeros funcionales con el canal TRPA1 en neuronas sensoriales. El estudio sugiere que la presencia de TRPA1 podría ejercer una inhibición funcional del canal TRPV1, ya que la sensibilidad a la activación por los distintos agonistas se ve reducida en comparación con el homómero de TRPV1 o con el canal silvestre.

En la figura 1.8 se muestran los diferentes amino ácidos sobre los que actúan los distintos agonistas y antagonistas de TRPV1, así como sitios intracelulares de fosforilación y un sitio de glicosilación (Szolcsanyi & Sandor 2012).



**Figura 1.8 Topología del canal TRPV1.** En la representación de la estructura del canal TRPV1 resaltan los residuos claves y amino ácidos involucrados en la apertura por efecto de diferentes estímulos (Szolcsanyi & Sandor 2012).

#### 1.4.2. Distribución tisular de TRPV1

La expresión de TRPV1 abarca desde células de tejido nervioso como no nervioso. En las neuronas el TRPV1 se expresa en aproximadamente el 50 % de todas las neuronas sensoriales primarias somáticas y viscerales, con una expresión restringida a las neuronas de pequeño a mediano diámetro en los ganglios raquídeos, trigeminal y nodoso (Caterina et al 1997, Helliwell et al 1998), así como en las neuronas sensoriales del asta posterior de la médula espinal (Tominaga et al 1998). También se expresa en el sistema nervioso central, en el área pre-óptica del hipotálamo (Szolcsanyi et al 1971), en el núcleo acumbens (Chavez et al 2010, Grueter et al 2010) y en el hipocampo (Cavanaugh et al 2011). En los dos últimos se conoce que TRPV1 modula la actividad sináptica en dichas neuronas.

Los axones de las neuronas sensoriales primarias que expresan el canal TRPV1 constituyen fibras nerviosas no mielinizadas o finamente mielinizadas, clasificadas como fibras C o A $\delta$ , las cuales se proyectan hacia la mayoría de

órganos y tejidos del cuerpo. Las poblaciones de neuronas clasificadas como C que expresan TRPV1 se dividen en 2 tipos: a) un grupo de neuronas peptidérgicas, sensibles a NGF, CGRP (*calcitonin-gene related peptide*) y a la sustancia P, ya que expresan los receptores para estos péptidos pro-inflamatorios y b) un grupo de neuronas sensibles a GDNF, que se unen a la isolectina B4 (IB4) (Tominaga et al 1998). También ha sido identificada la expresión de TRPV1 en el retículo endoplasmático (TRPV1<sub>ER</sub>) en las neuronas del ganglio raquídeo, además de en la membrana plasmática (Gallego-Sandin et al 2009).

Se ha identificado también TRPV1 expresado en células no nerviosas como las del músculo liso arteriolar, músculo esquelético y en ciertos tejidos 'termorreguladores' como la piel y la tráquea (Cavanaugh et al 2011), así como en el urotelio de la vejiga (Birder et al 2002) y en queratinocitos humanos (Inoue et al 2002). Se ha detectado también la expresión de TRPV1 en las aferentes articulares de la articulación temporomandibular de rata (Ioi et al 2006), así como en la articulación de rodilla de rata, humano y ratón (Fernihough et al 2005) (Cho & Valtschanoff 2008). Adicionalmente, se ha demostrado la expresión de TRPV1 en fibroblastos sinoviales de pacientes con osteoartritis (Engler et al 2007).

### **1.4.3 Permeabilidad iónica**

El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo con mayor preferencia por los cationes de Ca<sup>2+</sup>, cuya permeabilidad es 10 veces mayor que a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> y Rb<sup>+</sup>. Adicionalmente, la permeabilidad para los cationes divalentes es mayor cuando el canal ha sido activado por capsaicina (Mohapatra & Nau 2003). Se ha descrito que TRPV1 es también permeable a cationes grandes como el catión fluorescente YO-PRO1 y la N-metil-D-Glucamina, el catión fluorescente FM1-43 y el QX-314, proporcionando herramientas interesantes para el estudio del canal (Binshtok et al 2007, Meyers et al 2003, Munns et al 2015).

### **1.4.4 Agonistas y antagonistas de TRPV1**

De acuerdo a la importancia fisiopatológica que tiene el canal TRPV1, es de gran interés terapéutico estudiar potenciales agonistas y antagonistas de éste

canal iónico. TRPV1 puede ser activado por agonistas endógenos o exógenos, identificándose dentro de los exógenos a los compuestos vaniloides como los mejores agonistas conocidos, donde se destaca la capsaicina como el ejemplo más representativo de esta familia. Además de la capsaicina se han identificado otros compuestos vaniloides tales como la resiniferatoxina (RTX), un diterpeno relacionado con los ésteres de forbol, aislado de la planta *Euphorbia resinífera* (Appendino & Szallasi 1997). Dentro de la variedad de agentes exógenos que activan TRPV1, se encuentra el olvanilo (Liu et al 1997), que, a diferencia de la capsaicina y la RTX, tiene una potencia mucho menor para excitar las fibras nociceptivas. Otros compuestos con capacidad de activar TRPV1 provenientes de plantas son la piperina y la zingerona (de la pimienta negra) (Liu & Simon 1996, McNamara et al 2005), el gingerol y algunos aceites esenciales como la citronela, el geraniol y el eugenol. También es activado, aunque en menor intensidad, por la alicina, el extracto del ajo y la cebolla (Salazar et al 2008). El primer tipo de agonista endógeno de TRPV1 identificado fueron los endocannabinoides, tales como la anandamida (Zygmunt et al 1999). Hoy en día se conocen otros agonistas endógenos de TRPV1, como los metabolitos de lipoxigenasa, HEPE y HPETE (Hwang et al 2000); el lípido N-araquidonil dopamina (NADA) (Huang et al 2002) y la lipasa diacilglicerol (DAG), que puede ser inducida por la estimulación de PKC.

También se incluyen entre los activadores de TRPV1 productos de oxidación del ácido linoleico, como el ácido hidroxióctadecadienoico (HODEs) (Patwardhan et al 2010). Adicionalmente, TRPV1 es sensible a la activación por agentes inflamatorios, ya que la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) produce una sensibilización/activación de TRPV1 por la fosforilación del canal iónico (Cesare et al 1999a, Premkumar & Ahern 2000, Vellani et al 2001).

Asimismo, dada la importancia fisiopatológica que tiene el canal TRPV1, es de gran interés terapéutico mencionar también a los bloqueantes de este canal iónico.

La tabla 1.2 ofrece una lista de algunas de las sustancias que actúan como agonistas o como antagonistas de TRPV1.

Canal iónico TRPV1	Sustancia	Referencia
<b>Agonistas</b>	<u>Endógenos:</u> HEPE, HPETE, NADA, DAG, HODEs, leucotrieno B4, prostaglandinas, serotonina, pH ácido, bradiquinina e histamina	(Hwang et al 2000); (Huang et al 2002); (Patwardhan et al 2010); (Shin et al 2002); (Moriyama et al 2005); (Sugiuar et al 2004); (Tominaga et al 1998); (Chuang et al 2001).
	<u>Exógenos:</u> Capsaicina, pH ácido, resiniferatoxina, pinperina, zingergona, olvinilo y etanol	(Szallasi & Blumberg 1999); (Tominaga et al 1998); (Caterina et al 1999); (McNamara et al 2005); (Salazar et al 2008).
<b>Antagonistas</b>	Rojo Rutenio (RR), capsazepina, BCTC, DO1050, SB-452533, SKF96365, yodo-resiniferatoxina, CTPC, difeniltetrahidrofurano Cu:fenantrolina y N-arilcinamidas	(Szallasi & Blumberg 2007); (Tominaga & Tominaga 2005, Valenzano et al 2003).

**Tabla 1.2** Tabla resumen de una selección de agonistas y antagonistas de TRPV1

### 1.4.5 Modulación de TRPV1

La sensibilización provoca en los canales iónicos una disminución del umbral para un estímulo dado (térmico, químico o mecánico) y un incremento en la amplitud de la respuesta a éste. La mayoría de los agentes capaces de provocar este efecto sobre TRPV1 son los mediadores de la inflamación. Éstos provocan la sensibilización a través de diferentes vías moleculares como son la inhibición de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), la fosforilación de la proteína quinasa A (PKA), tirosina quinasa (Src) o de la proteína quinasa C (PKC) (Bhave et al 2002, Jeske et al 2011, Jin et al 2004, Vellani et al 2001). Por ello se ha sugerido que los antagonistas de TRPV1 podrían tener un efecto anti-inflamatorio y de protección, lo que sería de gran utilidad como alternativa terapéutica antiinflamatoria (Devesa et al 2011). Varios lípidos de membrana regulan la función de algunos canales

iónicos, como es también el caso para TRPV1. Por ejemplo, el rol del lípido fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) es contradictorio, ya que se ha propuesto que esta molécula de señalización tiene un efecto tanto inhibitorio como activador sobre TRPV1. Cuando PIP<sub>2</sub> es hidrolizado por acción de la fosfolipasa C (PLC), se genera como producto de la hidrólisis inositol 3 fosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), los cuales por sí solos activan TRPV1. Sin embargo, hay estudios que sugieren efectos opuestos, ya que se ha observado que TRPV1 es sensibilizado por PIP<sub>2</sub> luego de activar la PLC, incrementando la actividad del canal (Prescott & Julius 2003).

En la misma línea, otro grupo observó una pérdida en la respuesta de TRPV1 a capsaicina en parches de membrana escindidos provenientes de neuronas de ganglio raquídeo, a las cuales previamente se había eliminado el PIP<sub>2</sub> endógeno, recuperando la capacidad para responder al agonista después de ser expuestas a un análogo soluble de PIP<sub>2</sub> (Stein et al 2006). En contradicción con estos estudios, otro grupo observó en liposomas reconstituidos de TRPV1, que la activación del canal era inhibida por PIP<sub>2</sub> (Cao et al 2013). Estos datos, muestran un rol ambiguo del PIP<sub>2</sub>, que podría estar relacionado con la intensidad del estímulo (Lukacs et al 2007). Otros mediadores inflamatorios como las prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) promueven la activación de la proteína quinasa A (PKA), la cual se une a receptores acoplados a proteína G (GPCR). La sensibilización por la vía PKA involucra la modulación del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual activa PKA, produciéndose posteriormente la fosforilación del canal TRPV1 mediante la proteína anclada a la quinasa A (AKAP), AKAP79/150 (Zhang et al 2008). La PKA activada, activa a su vez a la proteína quinasa C (PKCε), contribuyendo al proceso de sensibilización. La fosforilación de TRPV1 a través de la vía de la proteína quinasa C (PKC) es activada por varios mediadores de la inflamación como: PGE<sub>2</sub>, NGF y bradiquinina (Cesare et al 1999a, Cesare & McNaughton 1996, Numazaki et al 2002, Premkumar et al 2004, Zhang et al 2005) Se cree que la sensibilización se produce a causa de un incremento en la probabilidad de apertura del canal (Studer & McNaughton 2010, Vellani et al

2001), y también por la estimulación del desplazamiento de TRPV1 a la membrana plasmática (Morenilla-Palao et al 2004, Stein et al 2006).

Por otra parte, el decaimiento en la intensidad percibida de un estímulo invariante, se conoce como desensibilización o inactivación. El efecto de la capsaicina sobre las fibras nociceptivas puede causar dolor o puede ejercer un efecto analgésico. Este fenómeno subyace en el efecto paradójico de éste vaniloide, por lo que la capsaicina puede ser usada como agente para el tratamiento de desórdenes dolorosos, como los de origen viral o las neuropatías metabólicas, así como en patologías articulares como la osteoartritis. Se ha demostrado que la fosforilación en múltiples sitios por PKA dependiente de AMPc, por PKC, o por calmodulina (CaM), disminuye el grado de desensibilización de TRPV1. Al igual que ocurre con otros canales iónicos, el TRPV1 es dependiente de la entrada de  $Ca^{2+}$  y es modulado por moléculas como quinasa II calcio/calmodulina (CaMKII), proceso dependiente de calcio y que involucra una serie de fosforilación/defosforilación (Vellani et al 2001). Uno de los mecanismos de desensibilización propuestos para el canal TRPV1 es el mediado por la fosforilación dependiente de PKA. Se han propuesto varios sitios de fosforilación en el canal tales como S116, T144, T370, S502, S774 y S800, siendo S116 y T730 los sitios más importantes para la reducción de la actividad de TRPV1 por PKA (Bhave et al 2002, Mohapatra & Nau 2003).

Otro mecanismo involucrado en la desensibilización de TRPV1 es la unión de la CaM al segmento de 35 amino ácidos en el C-terminal, que produce una reducción en la actividad del canal (Numazaki et al 2003), así como la reducción de  $PIP_2$  (Stein et al 2006). El ATP y la CaM compiten por el sitio de unión en los residuos de repeticiones de anquirina en el N-terminal del canal y la efectividad de esta interacción determina el grado de desensibilización del canal tras repetidas aplicaciones de capsaicina (Lishko et al 2007). Esta disminución en la sensibilidad de TRPV1 está asociada a una disminución de la afinidad por estos agonistas, ya que las respuestas pueden ser recuperadas aumentando la concentración del agonista (Novakova-Tousova et al 2007).



#### **1.4.6 Activación de TRPV1 por temperatura**

La similitud de la sensación de quemazón en el dolor inducido por compuestos vaniloides y por el calor, sugiere que ambas respuestas están siendo evocadas a través de una vía molecular común (Caterina et al 1997, Cesare et al 1999b). Consistente con esto, se ha visto que las corrientes de TRPV1 evocadas por la capsaicina tienen propiedades similares a las generadas por el calor. En parches escindidos en la configuración de “inside-out” en células transfectadas con TRPV1, se observó que el canal es capaz de abrirse en respuesta al aumento de temperatura, sugiriendo que el canal por sí mismo actúa como un sensor de calor, siendo un mecanismo restringido a la membrana plasmática e independiente de procesos citoplasmáticos (Tominaga et al 1998). Además, fue propuesto en su día (Vlachova et al 2003) y posteriormente demostrado, que la parte distal del C-terminal está involucrada en la sensibilidad térmica, así como en la cinética de apertura del canal y en su modulación por PIP<sub>2</sub> (Brauchi et al 2006). Las deleciones en la porción del poro (S5-S6) dieron lugar a alteraciones en la sensibilidad a calor sin modificar la apertura del canal por acción de la capsaicina (Cui et al 2012). Adicionalmente, como un posible mecanismo de apertura del canal por el calor se ha sugerido una relación entre la temperatura de activación y la voltaje-dependencia, al observarse que los cambios de temperatura dan lugar a un desplazamiento gradual de la curva dependiente de voltaje (Voets et al 2004).

#### **1.4.7 Activación de TRPV1 por capsaicina**

El TRPV1 expresado en las aves es insensible a la activación por capsaicina, mientras que la activación por calor se mantiene intacta (Jordt & Julius 2002). Mediante estudios de estructura-función utilizando quimeras de especies distintas fue posible localizar los dominios requeridos para la activación por este agonista. Existen evidencias que sugieren que el sitio de acción de la capsaicina es intracelular, ya que no se observó activación cuando se añadió extracelularmente una forma de capsaicina impermeable a la membrana, a diferencia de cuando se añadió intracelularmente (Jung et al 1999). La activación por capsaicina genera una entrada de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> hacia el interior de la célula,



resultando en una despolarización, con una concentración para producir el 50 % del efecto máximo (EC<sub>50</sub>) de 1.1 μM (Oh et al 1996).

#### **1.4.8 Patologías asociadas a TRPV1**

Hasta la fecha no se conocen patologías relacionadas a mutaciones en el gen que codifica para el canal TRPV1. Sin embargo, en los últimos años numerosos estudios han vinculado el aumento de expresión de TRPV1, su síntesis *de novo* o su desregulación, con numerosas patologías. Dado su rol nociceptivo y su papel en el desarrollo de hiperalgesia térmica inflamatoria, el canal TRPV1 se encuentra relacionado con una variedad de enfermedades inflamatorias o patologías relacionadas con la hipersensibilidad al dolor. También se ha relacionado con desordenes gastrointestinales, vulvodinia, pancreatitis (Nilius 2007), así como con la artritis (Fernihough et al 2005, Szabo 2005), donde hay evidencias que muestran relación entre la osteoartritis y el canal TRPV1, donde además se ha identificado la expresión TRPV1 en las fibras nociceptivas que inervan la cavidad articular (Engler et al 2007, Fernihough et al 2005, Kochukov et al 2006, Schaible & Grubb 1993).

#### **1.5 Canal iónico TRPA1**

El TRPA1 es un canal catiónico no selectivo, que fue clonado por primera vez a partir de fibroblastos de pulmón humano (Jaquemar et al 1999). TRPA1 se activa por una gran variedad de sustancias naturales como: alil-isotiocianato, alicina, cinemaldehído, mentol, así como también por compuestos no naturales como: anestésicos volátiles, gases lacrimógenos y acroleína e hipoclorito. Se considera que TRPA1 es clave en la detección de estímulos químicos irritantes (Bautista et al 2006, Peterlin et al 2007), ya que hay estudios que demuestran que responde a frío intenso en neuronas de ganglio nodoso (Fajardo et al 2008) y en neuronas de ganglio de trigémino (Karashima et al 2009), sin embargo, otros estudios niegan que dicho canal sea transductor de frío (Bautista et al 2005, Nagata et al 2005). También ha sido propuesto que TRPA1 tiene un papel en la

mecano-transducción, sugiriéndose su participación en la audición (Corey et al 2004).

Al igual que los demás TRPs, TRPA1 está constituido por 6 dominios transmembrana  $\alpha$ -hélice dispuestos en tetrámero. Entre los dominios S5 y S6 se encuentra un lazo de residuos de amino ácidos responsables de la permeabilidad iónica y de la formación del poro. Está flanqueado en S1 y S6, por los extremos citoplasmáticos N y C-terminal, respectivamente. En el extremo N-terminal, contiene el dominio EF, importante para la unión del  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que éste dominio está implicado en desensibilización de dicho canal, así como también cuenta con más de 18 repeticiones de anquirina, que modulan la unión del ligando al canal (Lishko et al 2007). Se ha sugerido que éstos residuos interactúan con el citoesqueleto formando un resorte molecular que hace posible cambios de tensión en la membrana en respuesta a estímulos mecánicos (Corey et al 2004, Howard & Bechstedt 2004, Lee et al 2006).

La expresión de TRPA1 abarca tanto células nerviosas como no nerviosas. En el sistema nervioso TRPA1 está expresado en neuronas nociceptivas del ganglio raquídeo (Brierley et al 2009), trigémino (Diogenes et al 2007) y nodoso (Story et al 2003), así como en otros tejidos del sistema nervioso como el hipocampo, el núcleo supraóptico, el tallo cerebral y en astrocitos (Koch et al 2011, Lee et al 2012, Yokoyama et al 2011). Se ha detectado expresión de TRPA1 en células no nerviosas de diversos tejidos tales como células renales, hepatocitos, miocitos cardiacos, mucosa gastrointestinal, células acinares del páncreas o células epiteliales prostáticas, entre otras (Stokes et al 2006).

## 1.6 Canal iónico TRPM8

El TRPM8 fue clonado a partir de tejido prostático humano, y fue denominado Trp-p8, ya que se observó que el gen compartía homología con los canales TRP (Tsavaler et al 2001). Se ha demostrado que este canal catiónico no selectivo responde a frío inocuo y a mentol (McKemy 2002, Peier et al 2002), así como a otros compuestos naturales como eucaliptol, linalol, hidroxí-citronelal, geraniol o icilina (Behrendt et al 2004, McKemy 2002). También es activado por

ciertos derivados sintéticos del mentol como Frescolat ML, frescolatMAG, Coolact P y PMD38 o WS-3-12 (Behrendt et al 2004). Al igual que ocurre con otros canales TRP, la activación de TRPM8 es polimodal (Jordt et al 2003), permitiéndole funcionar como integrador de señales (Tominaga et al 1998), lo que le hace fundamental para la transducción sensorial de frío moderado e intenso (Almaraz et al 2014, Colburn et al 2007, Madrid et al 2009, Madrid et al 2006, Reid et al 2002, Takashima et al 2007).

Estructuralmente, el TRPM8 consiste en una proteína conformada por cuatro subunidades de seis dominios  $\alpha$ -hélice transmembrana, flanqueada por dos largos dominios citoplasmáticos N y C-terminal, con la región del poro entre los segmentos S5 y S6, donde 22 residuos hidrofóbicos forman el poro de selectividad (Voets 2012). El dominio C-terminal es esencial para el propio funcionamiento del canal (Phelps & Gaudet 2007), así como también se ha sugerido que es responsable del enroscamiento y de la tetramerización del canal (Erler et al 2006, Tsuruda et al 2006). En el segmento C-terminal se encuentra además el dominio TRP, altamente conservado, involucrado en el acoplamiento de la unión del ligando y en la apertura del canal (Bandell et al 2006).

TRPM8 se expresa en neuronas sensoriales no peptidérgicas de los ganglios raquídeos y trigémino, y su distribución está restringida a una subpoblación (10-15 %) de neuronas sensibles a frío de pequeño a mediano diámetro (McKemy 2002, Peier et al 2002, Takashima et al 2007). También se expresa en fibras sensoriales periféricas de tejidos como piel, lengua, córnea, vejiga y colon (Dhaka et al 2008, Hayashi et al 2009, Parra et al 2010, Stein et al 2004, Takashima et al 2007) y en células tumorales primarias de mama, colon, pulmón y piel (Tsavaler et al 2001).

## **1.7 Nocicepción y canales TRP**

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, en inglés) define el dolor como: *“Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada al daño tisular o una experiencia descrita en términos de dicho daño”* (IASP 1979).

Diversos tejidos y estructuras como la piel, las articulaciones y músculos, poseen receptores sensoriales especializados que se activan por los estímulos nocivos, llamados nociceptores. La mayoría de estos nociceptores se corresponden con terminales nerviosas de las neuronas sensoriales primarias y sus cuerpos celulares están alojados en los ganglios raquídeos o en el ganglio trigémino. Estas fibras aferentes primarias que inervan los tejidos periféricos se clasifican de acuerdo a su diámetro, grado de mielinización y velocidad de conducción de sus axones en fibras A, a su vez divididas en  $A\alpha$ ,  $A\beta$ ,  $A\gamma$  y  $A\delta$  y fibras C (Tabla 1.3).

Los nociceptores térmicos y mecánicos se encuentran en las fibras de mediano diámetro y mielinizadas de tipo  $A\delta$ , las cuales conducen potenciales de acción a velocidades de 5-30 m/s. Los nociceptores polimodales se encuentran en las terminales nerviosas de los axones de las fibras no mielinizadas de pequeño diámetro, las fibras C, que conducen a velocidades promedio de 1.0 m/s. Las fibras  $A\delta$  detectan la sensación de dolor de forma rápida, funcionando como un sistema de advertencia al peligro o lesión, mientras que las fibras C al transmitir la información más lentamente y tener post-descarga, evocan una sensación de dolor más tardía y persistente.

La mayoría de las fibras C nociceptivas y algunas  $A\delta$  son polimodales, por lo que responden a estímulos nocivos de temperatura, mecánicos e incluso a ciertas sustancias químicas nocivas.

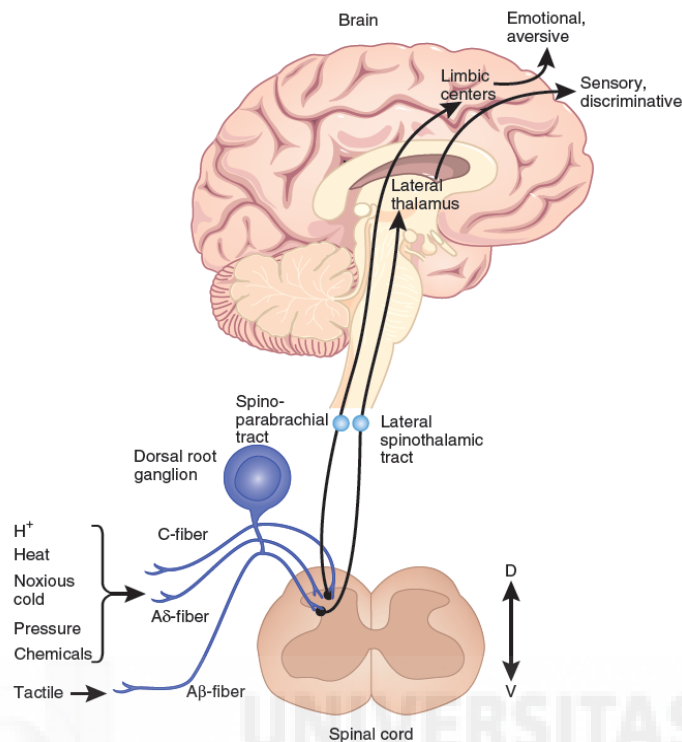
El estímulo nocivo es traducido a potenciales de acción en las terminales periféricas de estas neuronas por receptores o canales iónicos específicos, generando una corriente de entrada que despolariza la membrana de estas neuronas, produciendo un potencial generador o receptor, el cual si es suficientemente intenso, activa los canales voltaje dependientes de sodio, para iniciar potenciales de acción. En el caso de las neuronas cuyos somas se encuentran en los ganglios raquídeos, esta información es enviada al asta dorsal de la médula espinal, desde donde asciende al tálamo y a las diversas áreas de la corteza cerebral, incluyendo la corteza somatosensorial a lo largo de las vías espinotalámica y espinomesencefálica (Figura 1.9), generándose así la sensación

de dolor. La frecuencia y duración de la descarga de potenciales de acción codifican la intensidad y duración del estímulo específico.

	A $\alpha$	A $\beta$	A $\gamma$	A $\delta$	B	C
Función	Aferentes sensoriales de propioceptores y neuronas motoras de músculo esquelético.	Aferentes sensoriales mecanorreceptores de la piel	Fibras motoras del huso muscular	Aferentes sensoriales receptores de dolor y temperatura	Neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo	Aferentes sensoriales receptores de dolor, temperatura y picor
Diámetro ( $\mu$ m)	13-20	6-12	3-6	1-5	< 3	0.2-1.5
Velocidad conducción (m/s)	80-120	35-75	12-30	5-30	3-15	0.5-2.5

**Tabla 1.3.** Clasificación de los axones sensoriales periféricos y motores de acuerdo con su diámetro y velocidad de conducción.

Por otra parte, la activación alterada de los nociceptores en diversas condiciones patológicas (inflamación, lesión nerviosa) está asociada a *alodinia* e *hiperalgesia*. Ambos fenómenos son comunes en estados de dolor y reflejan en parte cambios en la actividad de los nociceptores. La alodinia se define como dolor en respuesta a estímulos que usualmente son no dolorosos. Por otra parte, la hiperalgesia se define como una respuesta dolorosa exagerada a un estímulo nocivo y presencia de dolor espontáneo en ausencia del estímulo, reflejando la sensibilización de los nociceptores periféricos, debido a la disminución del umbral de los nociceptores a la estimulación nociva y su descarga espontánea (IASP 1979).



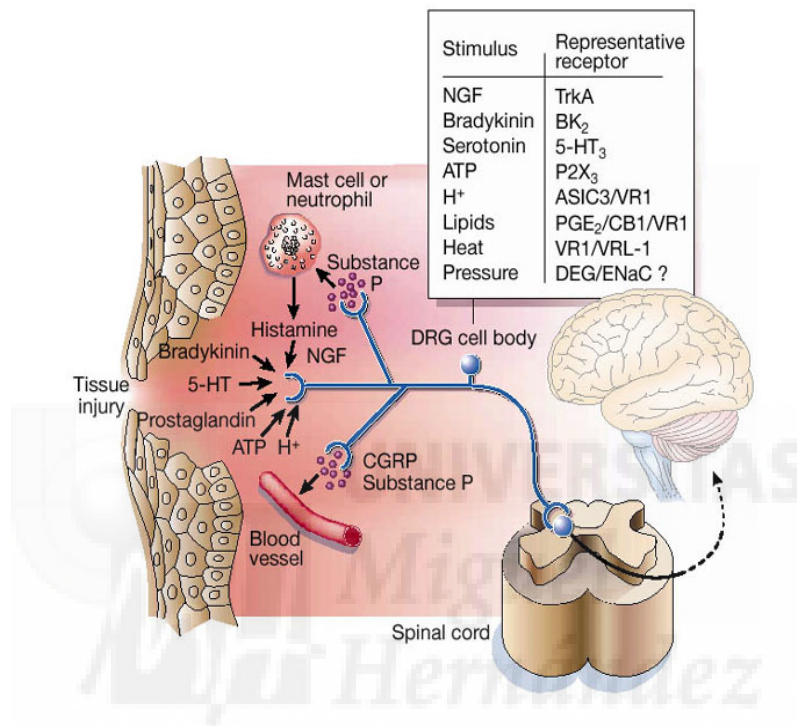
**Figura 1.9** Representación esquemática de la vía ascendente que transmite la información nociceptiva desde la médula espinal hasta los centros superiores. Extraído de Kuner (2010).

### 1.7.1 Sensibilización de los nociceptores

El daño o lesión en un tejido provoca el aumento en la sensibilidad al dolor, condición conocida como hiperalgesia primaria y secundaria (IASP 1979). En la figura 1.10 se representan de forma esquemática como se origina la hiperalgesia primaria: Los estímulos lesivos (mecánicos, químicos, térmicos) activan las aferentes primarias nociceptoras a causa del daño tisular y modifican su sensibilidad. Debido a la acción de una serie de sustancias químicas (mediadores de la inflamación) liberadas y acumuladas en la zona del daño. Estas sustancias son liberadas por las propias terminales sensoriales primarias, así como por células inflamatorias no nerviosas, como los mastocitos, creando una sopa inflamatoria en el sitio de la lesión.

Esta “sopa inflamatoria” contiene diversas sustancias tales como: serotonina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos, ATP; péptidos y proteínas como sustancia P, bradiquinina y NGF, así como protones e iones potasio. Todos

ellos actúan disminuyendo el umbral de activación de los nociceptores. Algunos de estos componentes como lípidos, serotonina, protones y ATP, pueden alterar la excitabilidad neuronal interactuando directamente con los canales iónicos de los nociceptores, mientras que otros compuestos como la bradiquinina lo hacen indirectamente sobre receptores específicos de membrana (Figura 1.10).



**Figura 1.10 Ilustración de la complejidad molecular de los nociceptores aferentes primarios en respuesta a los mediadores inflamatorios liberados en el sitio de daño tisular.** Se muestran algunos de los principales componentes de la “sopa inflamatoria”, incluyendo la bradiquinina. Cada uno de estos factores sensibiliza o excita las terminales de los nociceptores a través de la interacción con los receptores de la superficie celular expresado por estas neuronas (cuadro superior). La activación del nociceptor no solo transmite mensajes aferentes al asta dorsal de la médula espinal, y de aquí al cerebro, sino que también inicia un proceso de inflamación neurogénica (Julius & Basbaum 2001).

En conjunto, estos eventos producen un estado de hipersensibilidad (sensibilización periférica) (Scholz & Woolf 2002) que sustenta la hiperalgesia primaria. El daño del tejido más los efectos de la inflamación, determinan el cambio en la excitabilidad de las neuronas periféricas aferentes. Esto a su vez provoca cambios en la plasticidad sináptica y la excitabilidad de las conexiones centrales de las aferencias primarias en la médula espinal, el tálamo y la corteza,



provocando alodinia e hiperalgesia secundaria, alterando la percepción final del dolor.

## 1.8 La osteoartritis (OA)

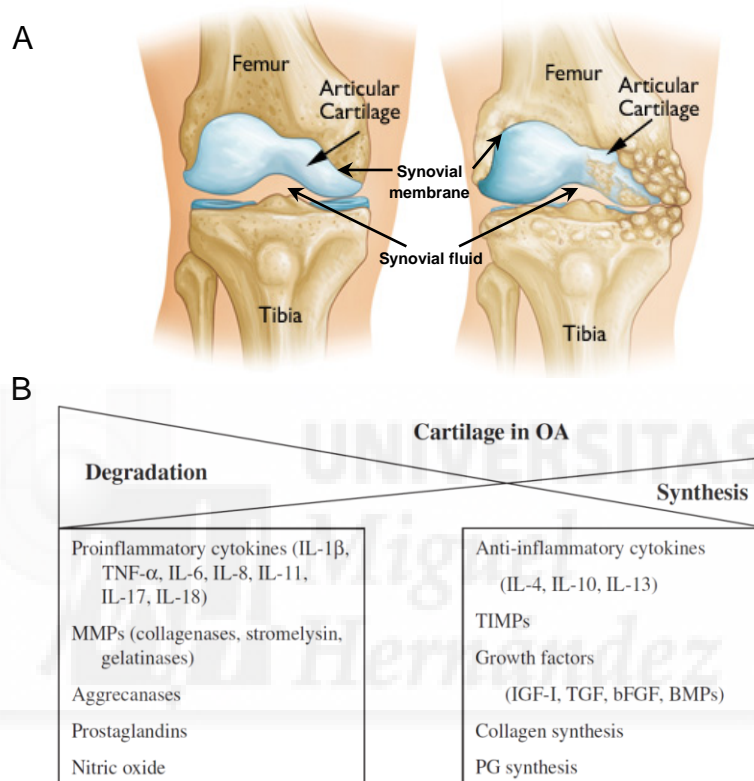
La osteoartritis (OA) es una de las enfermedades articulares más comunes y presenta una correlación con la edad, siendo predominante (~ 70 %) en individuos mayores de 65 años. Esta enfermedad es la principal causa de discapacidad física y pérdida de calidad de vida en los ancianos. Se caracteriza por una reducción progresiva del cartílago articular, menor formación de hueso nuevo y modificación de las propiedades reológicas y bioquímicas del líquido sinovial, lo que resulta en dolor y pérdida de la función articular (Figura 1.11.A). Al producirse degeneración del tejido articular, las fibras nerviosas aferentes que inervan los tejidos articulares (cápsula sinovial) quedan expuestos a las sustancias inflamatorias que se liberan por el daño. Esta exposición a éstas sustancias pro-inflamatorias excita y sensibiliza a los nociceptores articulares, produciendo sensaciones de dolor y potenciando la inflamación.

En condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y degradación de la matriz del cartílago articular, y también en las propiedades del HA del líquido sinovial que llena la cavidad articular, ya que se mantiene un HA de alto peso molecular y a una concentración estable (4-6 MDa y ~ 3 mg/ml, respectivamente). Sin embargo, en la OA la degradación de los componentes que conforman la ECM excede a su síntesis. Esto provoca una pérdida progresiva del tejido cartilaginoso, un aumento de los estados oxidativos, disminución del contenido de PGs, ruptura de las cadenas de agreganos, además de la mencionada reducción en el tamaño molecular y la concentración del HA. Se promueve además la producción de citoquinas y moléculas pro-inflamatorias producidas por los condrocitos y el líquido sinovial, lo cual contribuye también a la degradación del cartílago (Figura 1.11.B).

La síntesis de HA por los sinoviocitos decrece, disminuyendo su concentración en el líquido sinovial ( $\leq 1$  mg/ml), y el HA que es sintetizado *de novo* es de menor peso molecular (Abramson & Attur 2009, Smith & Ghosh 1987).



El hecho de que el HA del líquido sinovial se encuentre a menor concentración y que sus moléculas sean de mucha menor longitud, no solo altera sus propiedades reológicas, sino que determina la aparición de moléculas pequeñas de ácido hialurónico que promueven la producción de citoquinas pro-inflamatorias y enzimas, lo que acelera la destrucción de la articulación.



**Figura 1.11. Representación esquemática de una articulación sana (derecha) y una articulación con artritis (izquierda) y Esquema de los factores que contribuyen a la condición patológica de la OA.** Se muestran los componentes de la articulación de la rodilla: cartílago, capsula sinovial, membrana sinovial y fluido sinovial, en condiciones no patológicas y artritis. **B.** Esquema de varios factores que contribuyen al daño y síntesis del cartílago. En la artritis el balance entre degradación y síntesis del cartílago se inclina hacia la degradación. Esquema extraído de Moreland (2003a).

El proceso degenerativo de los elementos articulares, también da lugar a la activación de las fibras nerviosas nociceptoras que inervan la cavidad articular, generando el dolor experimentado por los pacientes con OA.

Las terapias farmacológicas disponibles actualmente están dirigidas a tratar el dolor de forma paliativa. Estos tratamientos comienzan por cambios en el estilo

de vida y se continúan con la intervención farmacológica para aliviar el dolor y la inflamación. Estos tratamientos incluyen analgésicos (acetaminofén, inhibidores específicos de la ciclooxigenasa-2, anti-inflamatorios no esteroideos y opioides); terapias intra-articulares (glucocorticoides y HA), así como tratamientos tópicos (capsaicina). Recientemente se ha planteado el uso de terapias de trasplantes de células pluripotenciales como un tratamiento alternativo para el alivio del dolor y mejora del cartílago en articulaciones con OA crónica (Jo et al 2014, Orozco et al 2013). Una alternativa terapéutica distinta se ha basado en la inyección intra-articular de HA, con el fin de reestablecer las características físico-químicas del HA presente en las articulaciones sanas.

## **1.9 Osteoartritis, dolor y HA**

El dolor es el síntoma más frecuente y la principal causa de incapacidad en articulaciones con OA. La investigación en torno al dolor en la OA se ha centrado en conocer los mecanismos moleculares involucrados, con el objetivo de poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Las fibras nerviosas aferentes de la articulación inervan el tejido articular, la cápsula articular, el periostio y la membrana sinovial articular (Felson 2005, Langford & Schmidt 1983, Skoglund 1956) y son activadas en grado variable por el movimiento de la articulación (Grigg et al 1986, Schaible & Schmidt 1983). Toda la cavidad articular se encuentra inflamada durante el proceso de OA (Benito et al 2005). El aumento de factores pro-inflamatorios en el líquido sinovial en los pacientes con OA, además de la degradación del HA, provoca una sensibilización de las fibras aferentes (Li et al 2011).

La inyección intra-articular de HA de alto peso molecular, un procedimiento terapéutico conocido como visco-suplementación, ha sido empleada como tratamiento efectivo para la OA, al observarse que aliviaba el dolor y atenuaba la inmovilidad inducida por la OA en caballos (Gingerich et al 1981), así como al restaurar la homeostasis reológica del líquido sinovial (Peyron & Balazs 1974, Rydell & Balazs 1971). Las inyecciones intra-articulares de HA de bajo peso molecular no producían disminución del dolor, a diferencia de las de alto peso

molecular (Balazs & Denlinger 1985). No obstante, el mecanismo por el cual el HA alivia el dolor es aún desconocido.

Se ha manejado hasta ahora la hipótesis de que el HA de alto peso molecular restaura la visco-elasticidad de la ECM, actuando por tanto como un filtro viscoelástico que reduce las fuerzas mecánicas transmitidas a los nociceptores que inervan la cápsula sinovial, lo que disminuye su activación y el dolor que esta genera, al tiempo que incrementa la movilidad de la articulación. Estudios electrofisiológicos realizados sobre los canales iónicos activados por estiramiento expresados de forma nativa en ovocitos de *Xenopus laevis*, demostraron que las respuestas evocadas por estímulos mecánicos en estos canales, disminuían por aplicación de Synvisc<sup>®</sup>, un HA de alto peso molecular (De la Peña et al 2002). Los estudios electrofisiológicos registrando extracelularmente en las fibras nerviosas que inervan la articulación de la rodilla, intacta o tras una inflamación producida mediante la inyección intra-articular de kaolina y carragenina en gatos (Pozo et al 1997) y en ratas (Gomis et al 2004), mostraron también que la inyección intra-articular de HA de alto peso molecular (Synvisc<sup>®</sup>) reducía gradualmente la frecuencia de los impulsos nerviosos evocados por tanto movimientos nocivos como no nocivos de la articulación de la rodilla. Los mismos resultados de reducción de la frecuencia de disparo de las fibras del nervio safeno en respuesta al estímulo mecánico nocivo y no nocivo, se obtuvieron en estudios posteriores realizados en cobayas a los que se les provocaba una osteoartritis experimental por menisectomía, tras inyectar intra-articularmente el Synvisc<sup>®</sup> (Gomis et al 2007) . Estas evidencias sugerían un efecto analgésico por parte de las sustancias visco-elásticas de alto peso molecular sobre las respuestas evocadas por estímulos mecánicos nociceptivos. Se concluía que el mecanismo analgésico se producía, a nivel molecular, a través de un efecto de filtro del HA sobre las fuerzas mecánicas de modo que la transmisión de energía mecánica a los canales mecanosensibles de las terminaciones nerviosas se reducía y con ello el grado de excitación de la terminación.

Esta interpretación, sin embargo, no aclara si el HA actúa además sobre otros elementos que también pueden contribuir a la excitación de los nociceptores,

tales como: 1) una posible interacción de las moléculas de HA, cargadas negativamente, sobre la movilidad y/o la concentración de las moléculas de agentes inflamatorios reduciendo su accesibilidad a la terminación nerviosa, 2) una posible acción del HA sobre las proteínas receptoras de los mediadores inflamatorios en la membrana de la terminación nociceptora y 3) una acción directa del HA sobre los canales iónicos que participan en la transducción y/o la codificación de los estímulos lesivos, en especial TRPV1 y TRPA1.

En el presente trabajo se ha explorado la hipótesis de que el efecto analgésico del HA en las articulaciones con osteoartritis o artritis, sea mediado, al menos en parte, a través de una modulación de la actividad del canal iónico TRPV1, presente en las terminales nociceptivas que inervan la articulación de la rodilla e 'integrador molecular' por excelencia de los estímulos lesivos.

Adicionalmente, se conoce que el canal TRPV1 se expresa en las fibras nociceptivas que inervan la cavidad articular (Engler et al 2007, Fernihough et al 2005, Kochukov et al 2006, Schaible & Grubb 1993) y ha sido implicado en el dolor articular en patologías como la OA (Caterina et al 1997, Huang et al 2006). Además, el dolor en la artritis crónica inducida por el co-adyuvante de Freund, inyectado tanto intraplantar (Szabo 2005) como intra-articularmente (Barton et al 2006), es menor en ratones nulos para TRPV1 que en ratones silvestres. Finalmente, la capsaicina aplicada de forma tópica en pacientes con OA ha mostrado efectos analgésicos en condiciones de OA moderada (McCarthy & McCarty 1992, Rains & Bryson 1995, Watson 1994), sugiriendo que la inactivación de nociceptores articulares que expresan TRPV1 por esta toxina reduce el dolor articular.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo General

Estudiar si el hialuronato sódico (HA) tiene un efecto modulador sobre la actividad del canal iónico TRPV1 y si este posible efecto puede explicar en parte el efecto analgésico del HA sobre el dolor articular.

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Estudiar el efecto de dos tipos de HA, uno de bajo peso molecular (HA-LMW) y otro de alto peso molecular (HA-HMW), sobre las respuestas mediadas por el canal iónico TRPV1 activado por estímulos químicos y físicos, tanto en sistemas de expresión heterólogos como en neuronas sensoriales primarias, midiendo los cambios en la concentración de calcio intracelular mediante la utilización de técnicas de imagen.
2. Estudiar el efecto del HA-HMW y HA-LMW sobre las corrientes macroscópicas mediadas por el canal TRPV1 activado por capsaicina, en células HEK transfectadas con TRPV1 (HEK293-TRPV1-EYFP+).
3. Estudiar cómo ciertas mutaciones del canal TRPV1 afectan la interacción con el HA, midiendo las corrientes macroscópicas evocadas por la capsaicina, expresado en células HEK293 transfectadas con el canal mutado.
4. Estudiar el efecto del HA-HMW sobre la sensibilización producida por la acción de la bradiquinina sobre el canal TRPV1, en cultivos de neuronas sensoriales primarias obtenidas de neuronas del ganglio raquídeo, midiendo los cambios en la concentración de calcio intracelular, utilizando técnicas de imagen.

5. Estudiar mediante pruebas conductuales de nocicepción (test de la placa caliente o inyección de capsaicina) el efecto del HA-HMW sobre la respuesta nocifensiva de los canales TRPV1 presentes en las terminaciones nerviosas de la planta de la pata en ratones adultos.
  
6. Estudiar el efecto del HA-HMW sobre otros canales iónicos de la familia de los TRP, como los canales TRPA1 y TRPM8, utilizando medidas de cambio en la concentración de calcio intracelular y registros electrofisiológicos, activando los canales con distintos agonistas, empleando sistemas de expresión heterólogos y neuronas sensoriales, con el fin de definir la especificidad del posible efecto del HA sobre TRPV1.





## **3. Materiales y métodos**

### **3.1 Cultivos celulares**

Se han utilizado diferentes líneas celulares como sistemas de expresión heterólogos del canal iónico a estudiar. Algunas se utilizaron para transfectar transitoriamente diferentes plásmidos para el estudio de diferentes canales iónicos y otras fueron líneas celulares estables que expresaban de forma permanente el canal iónico de interés.

#### **3.1.1 Línea celular SH-SY5Y TRPV1**

Esta línea celular fue donada a nuestro laboratorio por el Dr. Lilja, J. y la Dra. Forsby, A., del Departamento de Neuroquímica de la Universidad de Estocolmo, Suecia (Lilja et al 2007). Es una línea celular procedente de neuroblastoma humano (médula ósea) denominada SH-SY5Y, que fue transfectada de forma estable con TRPV1 de rata. Estas células se mantuvieron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y en el siguiente medio de cultivo:

- MEM (+Earle´s y L-Glutamina) (Gibco 21090-022)
- 1 % Aminoácidos no Esenciales (100x - Gibco 11140-35)
- 1 % Pencilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122)
- 10 % Suero fetal bovino (Gibco 10500-064)
- 200 mM L-Glutamina (Gibco 25030-024)
- 0.4 µg/ml Puromicina (Sigma P9620).

#### **3.1.2 Línea celular SH-SY5Y**

Esta línea celular fue donada a nuestro laboratorio por el Dr. Lilja, J. y la Dra. Forsby, A., del Departamento de Neuroquímica de la Universidad de Estocolmo, Suecia (Lilja et al 2007). Esta línea celular se utilizó como control de las células SH-SY5Y-VR1, ya que éstas células no expresan el canal iónico TRPV1. Las células SH-SY5Y se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y con el mismo medio de cultivo descrito anteriormente.



- DMEM sin GlutaMax (Gibco 41965-039)
- 1 % Pencilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122)
- 10 % Suero fetal bovino (Gibco 10500-064)
- Medio F-12 (Gibco 21765-029)

### **3.1.3 Línea celular CHO-TRPA1**

La línea celular CHO con expresión estable del canal TRPA1 de ratón fue donada a nuestro laboratorio por el Dr. Ardem Patapoutian (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) (Story et al 2003). Estas células proceden originalmente de la línea celular CHO (Células de Ovario de Hamster) y fueron transfectadas de forma estable con TRPA1. Las células CHO-TRPA1 se mantuvieron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en el siguiente medio de cultivo:

- DMEM sin GlutaMax (Gibco 41965-039)
- 10 % Suero bovino fetal (Gibco 10500-064)
- 2 % Glutamax® (Gibco 35050-038)
- 1 % Aminoácidos no esenciales (Gibco 11140-035)
- 2 % Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122)
- 200 µg/ml Higromicina B (H3274-250MG, Sigma Aldrich)
- 5 µg/ml Blastidina (46-1120, Invitrogen)

### **3.1.4 Células HEK293-mTRPM8-YFP**

Las células HEK293 con expresión estable del canal iónico TRPM8 de ratón, fueron creadas en el laboratorio del Dr. Felix Viana del Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, España. Esta línea celular contiene la secuencia de ADN del TRPM8 de ratón. El vector también codifica para la proteína amarilla fluorescente (YFP), la cual emite una luz amarilla fácilmente identificable cuando es excitada a 470 nm. Estas células se mantuvieron a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y en el siguiente medio de cultivo.

- DMEM + GlutaMax (Gibco 61965)
- 10 % Suero fetal bovino (Gibco 10500-064)
- 1 % Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122)

- 200 µg/ml Geneticina (A1720-1g, Sigma Aldrich)

### **3.1.5 Línea celular HEK293**

Las células HEK293 fueron obtenidas a través de ECACC (European Collection of Cell Cultures), UK. Es una línea celular procedente de células embrionarias humanas de riñón. Estas células se utilizaron como sistemas de expresión transitorio de los canales iónicos TRPV1 o TRPA1, dependiendo del experimento a realizar. Las células HEK293 se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en el siguiente medio de cultivo:

- DMEM + GlutaMax (Gibco 61965)
- 10 % Suero fetal bovino (Gibco 10500-064)
- 1 % Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122)

## **3.2 Transfección transitoria de células HEK293**

### **3.2.1 Protocolo de transfección:**

Las células HEK293 fueron transfectadas transitoriamente utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante. Se utilizó en cada caso uno de los siguientes plásmidos: TRPV1-EYFP, N604T-TRPV1-EYFP, hTRPA1-GFP o TRPV1-K615/R617A. La transfección se realizó en una proporción de 1:3 (plásmido: lipofectamina). Las células HEK293 fueron plantadas en placa Petri de 24 pocillos, entre 18 y 72 horas antes de la transfección, hasta llegar a un 80 % de confluencia.

El día de la transfección se retiró el medio completo (1ml) y se lavó con DMEM (1ml). Luego se agregó la mezcla de transfección que contenía 1 µg del plásmido y 3 µl de lipofectamina, ambos disueltos en DMEM, haciendo un volumen total de 100 µl (este volumen es por cada pocillo de la placa Petri de 24). La solución fue mezclada y centrifugada para remover las gotas del eppendorf. Esta mezcla se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los 20 minutos, se agregó la mezcla en el pocillo, al cual se le habían

retirado previamente 600 µl del medio completo. Pasadas 5 horas se retiró el medio de transfección. Las células se tripsinizaron con tripsina 0.25 % (EDTA1x – Tripsina, Gibco 25200) en DMEM y se plantaron en cristales de 12 mm tratados con poly-L-Lysina 0.01% (P4707, Sigma Aldrich). Las células transfectadas se utilizaron para los distintos experimentos después de 24 a 48 horas.

En los experimentos realizados con el plásmido de TRPV1-K615/R617A, se realizó una co-transfección con el plásmido que contiene el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP), ya que este plásmido no contiene ninguna proteína fluorescente. En los casos de co-transfección el protocolo a seguir fue similar al descrito arriba, agregando el ADN de la proteína fluorescente 0.5 µg en el eppendorf que contenía la mezcla con el otro plásmido.

### **3.2.2 Plásmidos utilizados**

#### ***Plásmido TRPV1-EYFP***

El plásmido del canal iónico TRPV1 de rata fue donado por el laboratorio del Dr. Cabedo del Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC, España. Este plásmido codifica para la proteína del canal iónico TRPV1 de rata, al cual se le ha fusionado en el extremo N-terminal la secuencia que codifica para la proteína amarilla fluorescente mejorada (EYFP) (Cabedo et al 2004).

#### ***Plásmido N604T-TRPV1-EYFP***

El plásmido que codifica para el canal iónico TRPV1 de rata N604T ha sido donado por el laboratorio del Dr. Ferrer-Montiel del Instituto de Biología Celular y Molecular, Universidad Miguel Hernández, España. Este plásmido presenta una mutación en el ADN que está relacionada con la modificación de un aminoácido en el sitio para la N-glicosilación, donde se consigue la expresión de una treonina (Thr) en lugar de la asparagina (Asn), aminoácido requerido para la realización de este enlace. Este plásmido codifica además la secuencia para expresión de la proteína amarilla fluorescente mejorada (EYFP) en el N-terminal.

### **Plásmido TRPV1-K615A/R617A**

Este plásmido, TRPV1-K615A/R617A, fue realizado por el Dr. Francisco Taberner en el laboratorio del Dr. Ferrer-Montiel del Instituto de Biología Celular y Molecular, Universidad Miguel Hernández, España. Este plásmido codifica para la proteína de TRPV1 con una mutación en la posición 615 y 617, donde los aminoácidos K y R (aminoácidos con carga positiva), han sido reemplazados por alanina (A), un aminoácido neutro. La mutación se encuentra en la secuencia “H+xRG” del dominio extracelular del segmento S5 cercano al poro, donde se sugiere una interacción electrostática de la proteína TRPV1 con el polisacárido (HA).

### **Plásmido hTRPA1-GFP**

Fue donado por el laboratorio del Dr. Karel Talavera de la Universidad Católica de Leuven, Bélgica. Las células HEK293 fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido que codifica para el canal iónico TRPA1 humano que tiene fusionado en el extremo N-terminal, el gen para la síntesis de la proteína verde fluorescente (GFP), observable cuando se excita a 470 nm.

**Tabla 3.4:** Resumen de los plásmidos empleados:

<b>Plásmido</b>	<b>Gen</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Observaciones</b>
TRPV1- EYFP	TRPV1 rata +EYFP	Dr. Hugo Cabedo (Instituto de Neurociencias de Alicante, UMH/CSIC, España).	Proteína de fusión. EYFP en N-terminal de TRPV1
N604T-TRPV1- EYFP	TRPV1 rata con mutación N604T +EYFP	Dr. Ferrer-Montiel (Instituto de Biología Celular y Molecular, UMH, España).	Proteína de fusión. EYFP en N-terminal de TRPV1
TRPV1- K615A/R617A	TRPV1 rata con mutación en K615A/R617A	Dr. Ferrer-Montiel (Instituto de Biología Celular y Molecular, UMH, España).	
TRPA1-GFP	TRPA1 de	Dr. Karel Talavera	Proteína de fusión. GFP

	humano y GFP	(Universidad Católica de Lovaina, Bélgica)	en N-terminal de TRPA1
--	-----------------	---	------------------------

### 3.3 Cultivo primario de neuronas sensoriales

Los estudios fueron realizados en ratones machos adultos (P-45) y neonatos (P3-P5) de la cepa C57BL/6JOlaHsd, provenientes del animalario del Instituto de Neurociencias de Alicante, RMG. Los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo al Real Decreto Español 1201/2005 y a la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea 2010/63/EU. Los procedimientos experimentales fueron aprobados además por el Comité de Ética de la Universidad Miguel Hernández, Alicante – España y la Generalitat Valenciana

#### 3.3.1 Cultivo de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG)

Se realizaron cultivos de neuronas sensoriales de ganglio raquídeo (DRG) de ratón para el estudio de los canales iónicos mediante registros de imagen de calcio. Para la extracción de las DRGs los ratones adultos fueron sacrificados mediante la técnica de dislocación cervical, mientras que los neonatos mediante decapitación. Una vez extraída la columna vertebral, se colectan los ganglios en 2 ml de Hank's Balanced Salt Solution 1X (HBSS sin  $\text{CaCl}_2$  y sin  $\text{MgCl}_2$ ; Invitrogen, Gibco). Una vez extraídas las raíces de los nervios raquídeos los ganglios se transfirieron a un recipiente de cristal para la disociación enzimática. Esta consistía en una solución que contenía 1 ml de medio "alimentado" (Inxmiz) compuesto por 0.6 mg de colagenasa (Collagenase Tipo XI; Sigma Aldrich) y 3 mg de Dispasa (Invitrogen, Gibco), los ganglios se mantuvieron durante una hora en el incubador a 37 °C y con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, se realizó una leve disociación mecánica con la pipeta de plástico de 1 ml subiendo y bajando la mezcla con los ganglios. Una vez disociados los ganglios, el resultado se filtró a través de una malla de 40  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Finalmente se añadió 4 ml de medio completo sin calcio, lo cual evita la agregación celular, y se procedió a centrifugar las neuronas a 1250 r.p.m. (revoluciones por minuto) durante 10 minutos. El precipitado obtenido se re-suspendió en 80  $\mu\text{l}$  de medio completo sin calcio por

cada cristal de 12 mm de diámetro (en los cuales se plantan las neuronas). Transcurrida aproximadamente 1 hora en la que asentaron y se pegaron las células, se añadió 1 ml de medio completo a cada placa de Petri de 35 mm de diámetro.

El cultivo de neuronas de DRG provenientes de ratones neonatos, se realizó de forma similar al protocolo descrito anteriormente para el adulto, con la diferencia de que una vez centrifugadas las neuronas, el precipitado obtenido se re-suspendió en un medio completo específico para neonato (descrito más abajo). Se plantó de igual forma 80  $\mu$ l por cristal y después de 1 hora se añadió medio completo de neonato que contiene calcio, añadiendo 1  $\mu$ l/ml de NGF (Sigma N-0513).

Las neuronas fueron plantadas en cristales de 12 mm de diámetro y de grosor nº 1, pre-tratados con poly-L lisina 0.01 % (P4707, Sigma Aldrich). Las neuronas fueron mantenidas a 37 °C, en una atmósfera con control de humedad al 5 % de CO<sub>2</sub>. En ambos casos las neuronas fueron utilizadas de 24 a 48 horas después del cultivo, y en este lapso de tiempo el medio en el cual se mantenían las células fue reemplazado (500  $\mu$ l) cada día con medio de cultivo fresco.

#### Medio de cultivo para DRGs de ratón adulto:

- MEM (Gibco 11095-080)
- 1 % MEM Vit (Gibco 11120-037)
- 10 % Suero fetal bovino (Gibco 16000-044)
- 1 % Penicilina/Estreptomina (Gibco 15140-122)
- 1  $\mu$ l/ml NGF (Sigma N-0513)

#### Medio de cultivo para DRGs de ratón neonato:

- DMEM (Gibco 61965)
- F-12 (Gibco 21765-029)
- 10 % Suero fetal bovino (Gibco 16000-044)
- 1 % Penicilina/Estreptomina (Gibco 15140-122)
- 1 % Glutamina (Gibco 25030-024)

- 3 % Glucosa al 20 % (JT Baker 0115)
- 1  $\mu$ l/ml NGF (Sigma N-0513)

### **3.3.2 Cultivo de neuronas sensoriales primarias de ganglio nodoso**

Los ganglios se obtuvieron de ratones machos adultos de la cepa C57 mencionada anteriormente, de una edad comprendida en 30 y 90 días. Los animales fueron sacrificados utilizando CO<sub>2</sub>. Una vez extraídos los ganglios, éstos se mantuvieron en el incubador a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 1 hora con una mezcla que contenía las enzimas colagenasa XI 0.07 % y dispasa 0.3 %. Posteriormente los ganglios se disociaron mecánicamente y se plantaron en el medio de cultivo que se describe a continuación. Las neuronas se plantaron sobre cristales de 12 mm de diámetro pre-tratados con poly-L-lisina (tal como describió anteriormente para las neuronas de DRG). Las neuronas fueron usadas 24 horas después del cultivo.

- MEM (Gibco 11095-080)
- 10 % Suero fetal bovino (Gibco 16000-044)
- 1 % MEM con solución de vitaminas (Invitrogen)
- 100  $\mu$ g/ml Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122)
- 1 ng/ml NGF (Sigma N-0513)

### **3.4 Soluciones extracelulares e intracelulares**

En las tablas a continuación se describen las soluciones empleadas: solución control extracelular, empleada en los experimentos de electrofisiología y de medida de cambios en la concentración de calcio intracelular y las utilizadas para rellenar la pipeta de registro electrofisiológico, “solución intracelular” variables según el experimento a realizar.

**Tabla 3.5**

<b>Solución control extracelular (SC)</b>	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	3
CaCl <sub>2</sub>	2,4
MgCl <sub>2</sub>	1,3
HEPES	10
Glucosa	10
pH: 7.4    300 mOsm aprox.	

**Tabla 3.6**

<b>Solución intracelular utilizada para TRPV1-EYFP, N604T- TRPV1-EYFP y TRPV1-K615A/R617A</b>		<b>Solución intracelular utilizada para TRPA1-GFP</b>	
Compuesto	Concentración (mM)	Compuesto	Concentración (mM)
CsCl	140	NaCl	140
HEPES	10	CsCl	5
EGTA	5	EGTA	10
		HEPES	10
pH: 7.4    300 mOsm aprox.		pH 7.4    300 mOsm aprox.	

### 3.5 Resumen de los compuestos químicos empleados

En todas las soluciones preparadas el pH se mantuvo a 7.4 y la osmolaridad alrededor de los 300 mOsm.

- Hialuronato de sodio (HA) en solución al 1% en NaCl, de alto peso molecular (HMW,  $\approx$  5.2 MDa) y bajo peso molecular (LMW,  $\approx$  0.44 MDa) (Biomatrix Biology Institute, NJ, USA). Se utilizó disuelto en la solución control, o en solución salino estéril. Las concentraciones utilizadas fueron 200, 400 y 800  $\mu$ g/ml, según se indica en cada caso.



- Capsaicina (CAP), (M2028-50MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) disuelta inicialmente en etanol para preparar una solución concentrada 1mM. A partir de ésta, se preparó disuelta en solución control. Se utilizaron las siguientes concentraciones: 100 nM, 1  $\mu$ M y 0.25  $\mu$ M.
- Bradiquinina (BK), (B3259, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) disuelta inicialmente en ácido acético al 5 % para preparar una solución concentrada 1 mM. A partir de ésta, se preparó en solución control a una concentración de 2  $\mu$ M.
- Hialuronidasa (Hyasa), (H1136, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) disuelta en solución salino estéril a una concentración final 0.6 U/ml, quedando al inyectar 10  $\mu$ l en 6U de actividad enzimática de hialuronidasa.
- Nifedipina (NIF), (N7634, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) disuelta inicialmente en DMSO (472301, Sigma Aldrich) para preparar una solución concentrada de 10 mM. A partir de ésta se preparó en solución control a una concentración de 10  $\mu$ M.
- Carbacol (Cch), (C4382, Sigma Aldrich) disuelto en H<sub>2</sub>O. A partir una solución concentrada de 100 mM se preparó en solución control a una concentración de 100  $\mu$ M.
- Allil isotiocianato (AITC), (377430, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) disuelto inicialmente en DMSO (472301, Sigma Aldrich) para preparar una solución 1 mM. A partir de ésta se diluyó en solución control a las siguientes concentraciones: 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M.
- Cinmaldehído (CA), (C8.068-7, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) disuelto en DMSO inicialmente para preparar una 500 mM. A partir de ésta se diluyó en solución control hasta una concentración final de 50  $\mu$ M.

- Mentol, (Me 065, Scharlau, España) disuelta en DMSO inicialmente para preparar una solución 300 mM. A partir de ésta se diluyó en solución control hasta una concentración final de 100  $\mu$ M.

### 3.6 Sistemas de Registro

Las células plantadas sobre cristal se colocaron en una cámara de registro con perfusión constante de solución extracelular control (0.5 ml/min) a una temperatura basal de 22 °C para células SH-SY5Y, HEK293 y CHO-TRPA1, y a una temperatura de 35 °C para las neuronas de DRG y ganglio nodoso. La solución llegaba a la cámara a través de un *peltier* que mantenía la temperatura constante y permitía también aplicar un cambio de temperatura (frío o calor) cuando era necesario. La solución extracelular control se sustituyó por la solución con la sustancia química que servía de estímulo en los experimentos indicados, así como por solución que contenía el HA, en experimentos determinados. En algunos experimentos se registraron cambios en la concentración del calcio intracelular y en otros se realizaron registros electrofisiológicos midiendo las corrientes evocadas por el canal iónico a estudiar.

#### 3.6.1 Medida de cambios en la concentración de calcio intracelular

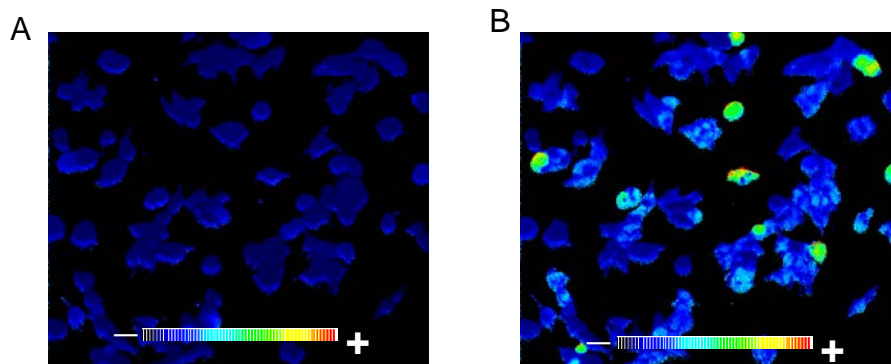
Los cambios en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) se determinaron mediante el análisis fluorimétrico con la sonda Fura-2AM (Moore et al 1990, Williams et al 1985). Para ello las células plantadas en los cristales se incubaron con Fura-2AM (Molecular Probes) a una concentración 5  $\mu$ M junto con 0,02 % de ácido plurónico (P6867-2G, Invitrogen, Molecular Probes), ambos disueltos en solución extracelular control. Las células se incubaron durante 45 minutos a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en oscuridad, mientras se cargaban con la sonda fluorescente. Una vez cargadas, se retiró el medio con la sonda fluorescente y se añadió solución control o solución con HA según el experimento. Posteriormente los cristales con las células cultivadas y cargadas, se llevaron al sistema de registro, donde bajo el microscopio se excitaron con luz ultravioleta a dos longitudes de onda, 340 y 380 nm aplicándolas de forma alterna mediante la

utilización de un policromador “Polychrome V” (Till Photonics). La fluorescencia emitida fue filtrada a una longitud de onda de 510 nm para ser captada por una cámara. El cociente obtenido de la división de la intensidad de fluorescencia procedente de las dos longitudes de excitación ( $F_{340}/F_{380}$ ) es proporcional a la concentración de calcio intracelular (Grynkiewicz et al 1985), por lo que a lo largo del trabajo nos referimos a los cambios en la concentración de calcio intracelular aunque el sistema no se calibró para obtener los datos expresados de tal forma.

Para llevar a cabo los experimentos de imagen de calcio se empleó un sistema de imagen basado en un policromador (Polychrome V, Till Photonics) y una cámara iXon-EMCCD885 (Andor Technology) acoplados a un microscopio Nikon Eclipse TS-2000-U (Nikon Instruments Inc.) El policromador y la cámara estaban controlados a través del programa Till Vision (Till Photonics).

Como se puede observar en la figura 3.12, los bajos niveles de calcio intracelular vienen reflejados en azul (panel A), avanzando la escala de pseudocolor hacia el color rojo según aumenta la concentración de calcio intracelular en respuesta a un estímulo (panel B). La solución control extracelular empleada en todos los experimentos de imagen de calcio es la descrita anteriormente.

En los experimentos donde se estimuló el canal TRPV1 con temperatura, se usó al final del protocolo de temperatura, una solución de capsaicina (100 nM) para seleccionar las neuronas TRPV1 positivas, identificando así las neuronas TRV1 positivas por su respuesta a ambos estímulos. Al finalizar la aplicación de los estímulos de temperatura se pasó una solución con alta concentración de  $K^+$  (30 mM) para distinguir las células excitables de las no excitables. De forma similar se aplicó una solución que contenía carbacol (Cch) 100  $\mu$ M en las células HEK293 para establecer la viabilidad de dichas células.



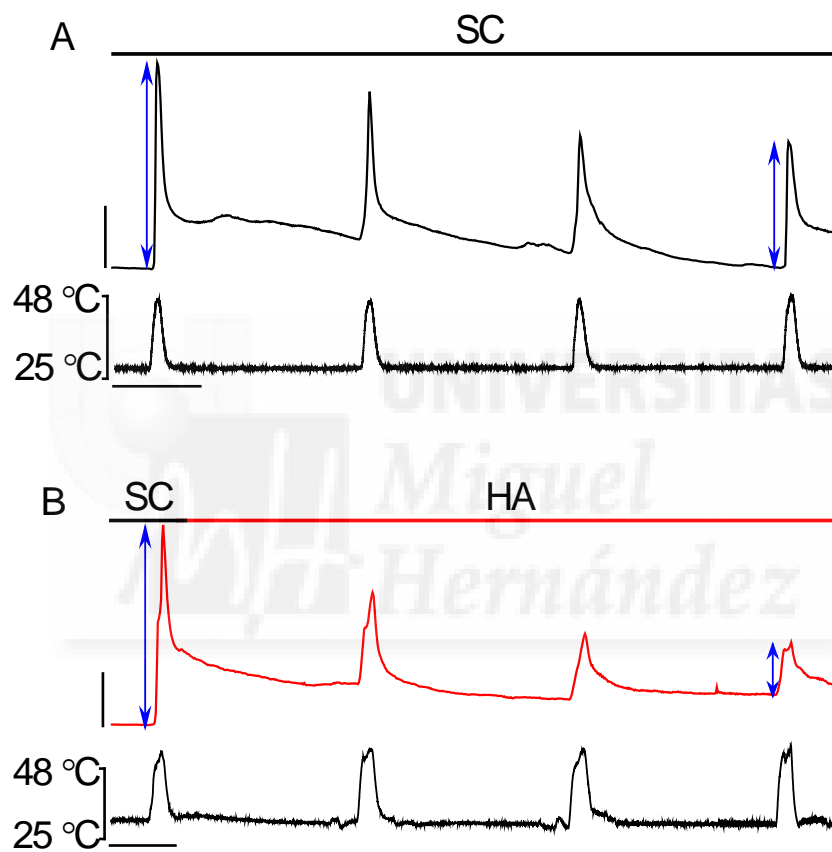
**Figura 3.12. Representación del cociente entre la intensidad de fluorescencia  $F_{340}/F_{380}$  en una escala de pseudocolores como indicadores del incremento del calcio intracelular.** Células HEK293 transfectadas con el plásmido del canal iónico TRPV1, cargadas previamente durante 45 minutos con fura-2 AM, antes (**A**) y después de la aplicación de calor (**B**).

### **3.6.1.1 Aplicación de los estímulos de temperatura**

En todos los casos las células plantadas en los cubreobjetos fueron ubicadas en una micro-cámara y fueron continuamente perfundidas (0.5 ml/min) con soluciones mantenidas a  $35 \pm 1$  °C en los experimentos realizados en neuronas y a  $22 \pm 1$  °C, temperatura ambiente, en los experimentos realizados en las líneas celulares. La estimulación térmica se aplicó cambiando la temperatura de la solución de perfusión, generando rampas a través de un sistema *peltier*. Se realizaron incrementos de temperatura hasta los 48 °C o descensos hasta los 10 °C (rampa de temperatura: 5 s/°C), de acuerdo al canal iónico estudiado en cada caso. Paralelamente a los registros de fluorimetría, se registraron las rampas de temperatura mediante un termómetro (Warner Instruments, Hamden, USA) ubicado lo más cerca posible de las células, que medía la temperatura de forma continua. Se aplicó calor hasta el rango nocivo (48 °C) como estímulo para activar el canal TRPV1 (Caterina et al 1997).

En la figura 3.13 se muestra un ejemplo del protocolo de aplicación del estímulo de calor, en este caso particular se aplicaron 4 estímulos de calor en presencia de solución control extracelular o de HA (solución que se describe a continuación), 1 minuto después de finalizado el 1º estímulo de calor (siempre en solución control y utilizado como referencia). Esta perfusión se mantuvo fluyendo continuamente hasta el último estímulo de calor. Entre cada estímulo de temperatura se dejó un tiempo de aproximadamente 10 minutos.

En otro grupo de experimentos en los cuales las células habían sido pre-tratadas con solución control extracelular o con solución con HA, se aplicó un único estímulo de temperatura, en presencia de la solución correspondiente (control o HA). La incubación con tal solución se mantuvo durante 30 – 60 minutos a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.



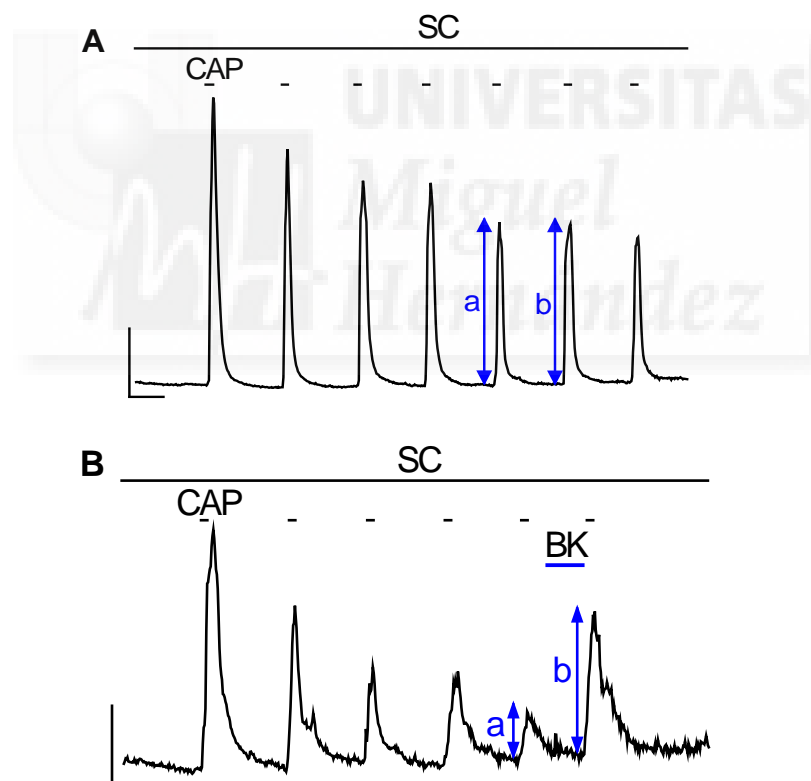
**Figura 3.13. Ejemplo representativo del protocolo general de aplicación de pulsos de calor.**

Registro fluorimétrico que refleja el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  expresado como el cociente o ratio de intensidad de fluorescencia ( $F_{340}/F_{380}$ ) en células SH-SY5Y-TRPV1, en respuesta a los estímulos de calor en presencia de solución control extracelular **(A)**, así como en presencia de HA **(B)**. Las flechas azules indican el punto mínimo y el punto máximo considerados para obtener la amplitud de cada respuesta a calor. Barra vertical:  $0.5 F_{340}/F_{380}$  y la horizontal corresponde a 200 s

### 3.6.1.2 Aplicación de estímulos químicos

Las sustancias químicas que se utilizaron para estimular las células se aplicaron intercambiando la solución control por la solución que contenía el agonista químico correspondiente para activar cada canal iónico (Capsaicina: TRPV1; Nifedipina: TRPA1 y Mentol: TRPM8). Las soluciones fluían a través de un peltier que las mantenía a una temperatura constante ( $35 \pm 1$  °C en neuronas y  $22 \pm 1$  °C líneas celulares). Así mismo, la velocidad de perfusión se mantuvo constante (0.5 ml/min).

Se realizó un único estímulo químico en presencia de solución control extracelular o solución con HA, una vez que las células habían sido pre-tratadas con solución control extracelular, o solución de HA durante 30 – 60 minutos a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.



**Figura 3.14.** Trazo representativo para ilustrar el protocolo general aplicado en DRGs de ratón siguiendo el previamente descrito por Boningtong y Mcnaughton, 2003. **A.** en presencia de solución control extracelular y **B** aplicando 2  $\mu$ M bradiquinina (2 minutos antes del 6° estímulo de capsaicina, línea roja). Las amplitudes de las respuestas, antes (a) y después (b) de la aplicación de bradiquinina, son medidas y utilizadas para calcular la sensibilización del canal TRPV1 por efecto del agente pro-inflamatorio, calculado como el cociente  $b/a$ . Barra vertical:  $0.2 F_{340}/F_{380}$  y la horizontal corresponde a 2 min.

En otro grupo de experimentos realizados sobre TRPV1, el canal iónico fue sensibilizado con una solución que contenía bradiquinina 2  $\mu\text{M}$ , intercambiada durante el tiempo de aplicación con la solución control extracelular o la solución con HA, de acuerdo al experimento. En la figura 3.14 se muestra un trazo representativo de la estimulación con pulsos de capsaicina 100 nM, protocolo descrito por Bonnington y McNaughton en 2003 (Bonnington & McNaughton 2003).

En estos experimentos, la bradiquinina fue aplicada durante 2 minutos antes de la aplicación del 6º estímulo de capsaicina, durante la perfusión continua con solución control extracelular. Se realizaron también registros empleando un protocolo similar, con la diferencia que después de un minuto de finalizado el 1º estímulo de capsaicina, se pasó a una solución que contenía HA, realizando los estímulos de capsaicina en presencia de HA. Finalmente en otro grupo, se aplicó la solución con bradiquinina tal como se describió anteriormente, pero esta vez durante la perfusión de la solución de HA. En la figura 3.14 se muestra el protocolo descrito para el grupo control (perfusión y aplicación del agonista en presencia de la solución control extracelular).

### **3.6.1.3 Análisis de los datos**

Los datos crudos extraídos del programa de adquisición, Till Vision fueron analizados posteriormente utilizando el programa de representación gráfica Origin v.8.0 (OriginLab Corporation). Se determinó la amplitud de las repuestas al estímulo aplicado como el cociente de la intensidad de la fluorescencia ( $F_{340}/F_{380}$ ). En los casos así indicados en el apartado de resultados, la amplitud de la respuesta obtenida para cada célula se normalizó con la 1º respuesta a un estímulo, siempre en solución control (respuesta control). En otros casos, donde se aplicó un único estímulo (físico o químico) se analizó la amplitud de las respuestas del grupo control y la del grupo tratado con la solución a estudiar. Los datos se muestran como valores promedio junto con el error estándar de la media.

### **3.6.2 Registros electrofisiológicos**

Las corrientes iónicas registradas en las células HEK293 transfectadas transitoriamente con el canal iónico TRPV1-EYFP, N604T-TRPV1-YFP o hTRPA1-GFP fueron estudiadas en la modalidad conocida como “patch-clamp” en la configuración de célula entera y fijación de voltaje, midiendo las corrientes macroscópicas evocadas a través de los canales iónicos de la membrana plasmática, en respuesta a un estímulo químico. El voltaje de fijación de las células se estableció en - 60 mV. A partir de éste voltaje, los canales iónicos fueron activados por la aplicación de rampas de voltaje de - 120 a + 150 mV para el canal TRPV1 y de - 150 a + 150 para TRPA1., y 0.8 segundos de duración. Cada rampa de voltaje se aplicó con un intervalo de 3 segundos (TRPV1) o 5 segundos (TRPA1). Se utilizaron microelectrodos realizados a partir de capilares de borosilicato (GC150F-7.5, Harvard Apparatus). La resistencia de los electrodos en el baño una vez rellenos con la solución intracelular (ver tabla 3.5) fue de 5 a 8 MΩ. Como electrodo de referencia se empleó un pellet de cloruro de plata (Ag-AgCl). Las corrientes capacitivas, así como la resistencia, se compensaron electrónicamente con el amplificador y se usaron estos valores de capacitancia para el cálculo de las densidades de corriente. Las corrientes se registraron con un amplificador Multiclamp 700B (Axon CNS, Molecular Devices) a una velocidad de muestreo de 5 kHz. Los datos se digitalizaron mediante un conversor analógico-digital Axon Digidata 1440A (Molecular Devices). El control de los estímulos y la adquisición de los datos se realizó mediante el programa pClamp 10.0 (Axon Instruments Inc, USA).

#### **3.6.2.1 Aplicación de estímulos químicos**

Las sustancias químicas que se utilizaron para estimular las células se administraron intercambiando la solución extracelular control por la solución que contenía el agonista químico correspondiente para activar el canal iónico deseado (capsaicina o nifedipina, para TRPV1 o TRPA1, respectivamente). Las soluciones fluían a través de un *peltier* que mantenía las soluciones a una temperatura constante ( $22 \pm 1$  °C). La velocidad de perfusión se mantuvo constante (0.5



ml/min). En este grupo de experimentos las células habían sido pre-tratadas en solución control o en solución con HA, durante 30-60 minutos a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Para el estudio de las corrientes macroscópicas se aplicaron primero 10 rampas de voltaje con flujo constante de solución extracelular (en los grupos control) o de solución de HA. Estas 10 rampas fueron posteriormente utilizadas en el análisis como la corriente basal (control) de cada célula. Luego de haber aplicado las 10 rampas basales se aplicó el agonista correspondiente (capsaicina 100 nM o nifedipina 10 µM) durante aproximadamente 2 minutos y a continuación se lavó con solución extracelular para ambos casos, mientras se continuaba el protocolo de rampas de voltaje.

### **3.6.2.2 Análisis de los datos**

Los datos extraídos del programa pClamp 10.0 fueron analizados posteriormente utilizando el programa de representación gráfica Origin v.8.0 (OriginLab Corporation). El análisis de la amplitud máxima de la corriente se estudió a + 80 y - 80 mV para el grupo control y para el grupo tratado con HA. El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism v.5.01®. Los datos se muestran como la media de la densidad de corriente junto con el error estándar de la media.

## **3.7 Respuesta nocifensiva**

Se estudió la respuesta nocifensiva al estímulo de calor nocivo (52°C) en ratones a los que se inyectó diferentes sustancias en las dos patas traseras. Los estudios se realizaron en ratones adultos (P-45) machos de la cepa C57BL/6JOlaHsd provenientes del animalario del Instituto de Neurociencias de Alicante, RMG. También se utilizaron ratones macho adultos (P45-P60) de la cepa C57BL/6.129X1-TRPV1<sup>tm<sup>i</sup>Jul</sup>/J (TRPV1 KO) que no muestra las respuestas características de TRPV1, ya que carece de dicho canal iónico (Caterina et al 2000). Los animales se mantenían bajo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con comida y agua *ad libitum* a una temperatura de ~21 °C, y eran revisados diariamente por el personal cualificado del SEA (Servicio de

Experimentación Animal, Universidad Miguel Hernández, Campus de San Juan). Los ratones se habituaron a la habitación, así como al equipo de experimentación durante los 4 días anteriores a comenzar las pruebas experimentales. Los experimentos se realizaron en ciego con respecto al conocimiento de las soluciones inyectadas.

### **3.7.1 Test de la placa caliente o “Hot plate”**

Para la realización de la prueba de la placa caliente se utilizó la placa caliente modelo LE7406 (Harvard Apparatus). La temperatura de la placa se fijó a  $52.0 \pm 0.1$  °C. El test de la placa caliente consiste en medir el tiempo en segundos que tarda el ratón en mostrar su primera respuesta nocidéfensiva, como: sacudir, esconder, lamerse la pata o incluso saltar. El tiempo máximo permitido al animal sobre la placa caliente (*cut-off*) fue de 30 segundos, para de esta manera evitar daños en el tejido. Las inyecciones se realizaron en las patas traseras inyectando un volumen final de 10 µl de la solución indicada en cada momento: salino estéril, HA-HMW (400 µg/ml) o hialuronidasa (6U). Se utilizó una jeringa de insulina de 1 ml con una aguja de 30 G. Se realizaron mediciones de las respuestas nocidéfensas a las 24 horas, 48 horas, 3, 5, 7 y 9 días después de la inyección.

### **3.7.2 Test de capsaicina**

El test de capsaicina consistió en inyectar en la misma pata 1 µg/µl de esta sustancia. La capsaicina estaba disuelta en 10 % etanol, 10 % de Tween 80 y 80 % de salino estéril. Se midió durante una ventana de tiempo de 3 minutos el tiempo total que el animal realizaba respuestas nocidéfensas así como el número total de respuestas en ese tiempo. Al igual que en el test anterior, se utilizó una jeringa de insulina de 1 ml con una aguja de 30 G. Con el objetivo de estudiar si el tratamiento con HA tiene efecto sobre la respuesta a capsaicina, se realizaron experimentos conductuales en ratones adultos a los que 48 horas antes del test de capsaicina, se les inyectó 10 µl de solución salina estéril a un grupo y 10 µl de HA-HMW 400 µg/ml a otro grupo.

### **3.7.3 Análisis de los datos**

El análisis de los datos sobre la latencia a la respuesta nocifensiva (a calor y a capsaicina) en todas las condiciones aplicadas, así como las representaciones graficas se realizaron mediante el programa Origin v. 8.0 (OriginLab Corporation). Los datos se muestran como la media de la latencia (s) junto con el error estándar de la media.

### **3.8 Análisis Estadístico de los datos**

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa GraphPad Prism v.5.01® y las representaciones gráficas mediante el programa Origin v. 8.0 (OriginLab Corporation). Para las comparaciones de datos con distribución normal pertenecientes a dos grupos dependientes se utilizó la prueba t de Student pareada, mientras que para los grupos independientes se empleó la prueba t de Student no pareada. Adicionalmente, para las comparaciones de tres o más grupos con distribución normal, se utilizó la prueba ANOVA junto con el análisis *post hoc* Bonferroni.

## 4. Resultados

### 4.1 Efecto del HA sobre TRPV1 activado por calor.

Inicialmente se llevaron a cabo medidas de cambio en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en la línea celular SH-SY5Y-TRPV1, que expresa de forma estable el canal iónico TRPV1. Se analizó el efecto de la concentración y del peso molecular de HA. Para ello se utilizaron dos tipos de HA: uno de bajo peso molecular, aproximadamente 0.47 M Da, que se denominó HA-LMW y otro de alto peso molecular de aproximadamente 5.2 M Da, que se denominó HA-HMW. Este estudio sirvió para determinar la concentración y el tipo de HA que producía un mayor efecto sobre la respuesta al calor del canal TRPV1 y se corroboró con un protocolo experimental similar, pero aplicado en neuronas sensoriales primarias cultivada obtenidas de ganglios raquídeos (DRG).

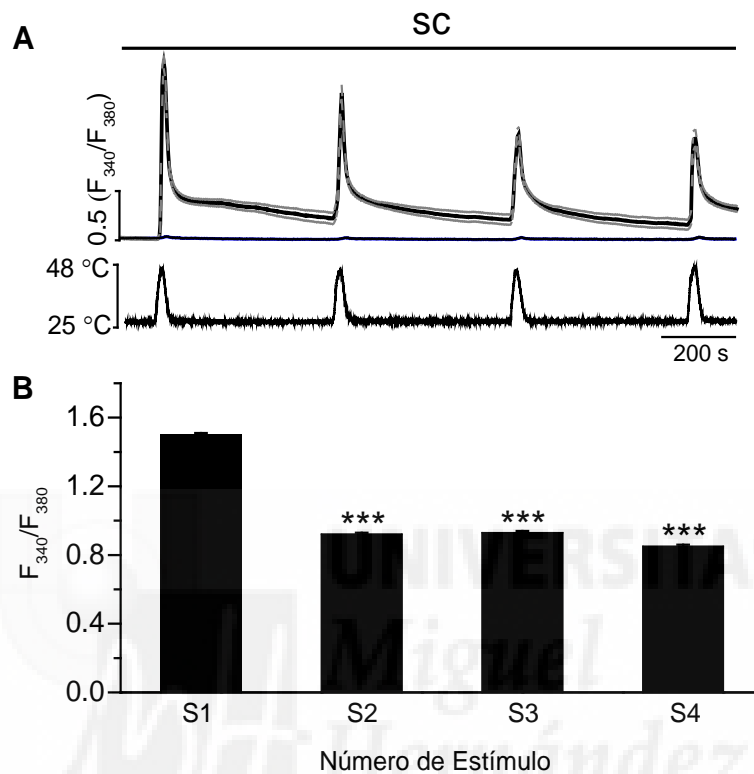
#### 4.1.1 Efecto del HA sobre el canal TRPV1 expresado en la línea celular estable SH-SY5Y-TRPV1

Se exploró el efecto de dos tipos de hialuronato sódico, un HA de bajo peso molecular (HA-LMW  $\approx$  0.47 M Da) y otro HA de alto peso molecular (HA-HMW  $\approx$  5.2 M Da), ambos HA a tres concentraciones diferentes: 200  $\mu$ g/ml, 400  $\mu$ g/ml y 800  $\mu$ g/ml. El protocolo de temperatura utilizado consistió en la aplicación de 4 estímulos de calor (S1, S2, S3 y S4) en forma de rampas desde 22 °C a 48 °C (2 s/ °C), aplicados en intervalos de 10 minutos cada estímulo (Figura 4.15)

##### 4.1.1.1 Desensibilización del canal TRPV1

En un primer grupo de experimentos, se aplicaron los 4 estímulos de calor durante perfusión continua con solución control (SC, grupo control), y se determinó la amplitud de las respuestas mediadas por el canal iónico TRPV1 activado por calor (48 °C). En la figura 4.15 se muestra un ejemplo representativo y se observa la desensibilización de las respuestas evocadas por los estímulos consecutivos de calor S2, S3 y S4. Estas respuestas fueron significativamente inferiores a la

respuesta evocada por el primer estímulo de calor (S1) tomado como control, fenómeno que se ha descrito en la introducción y que se conoce como desensibilización o taquifilaxia.

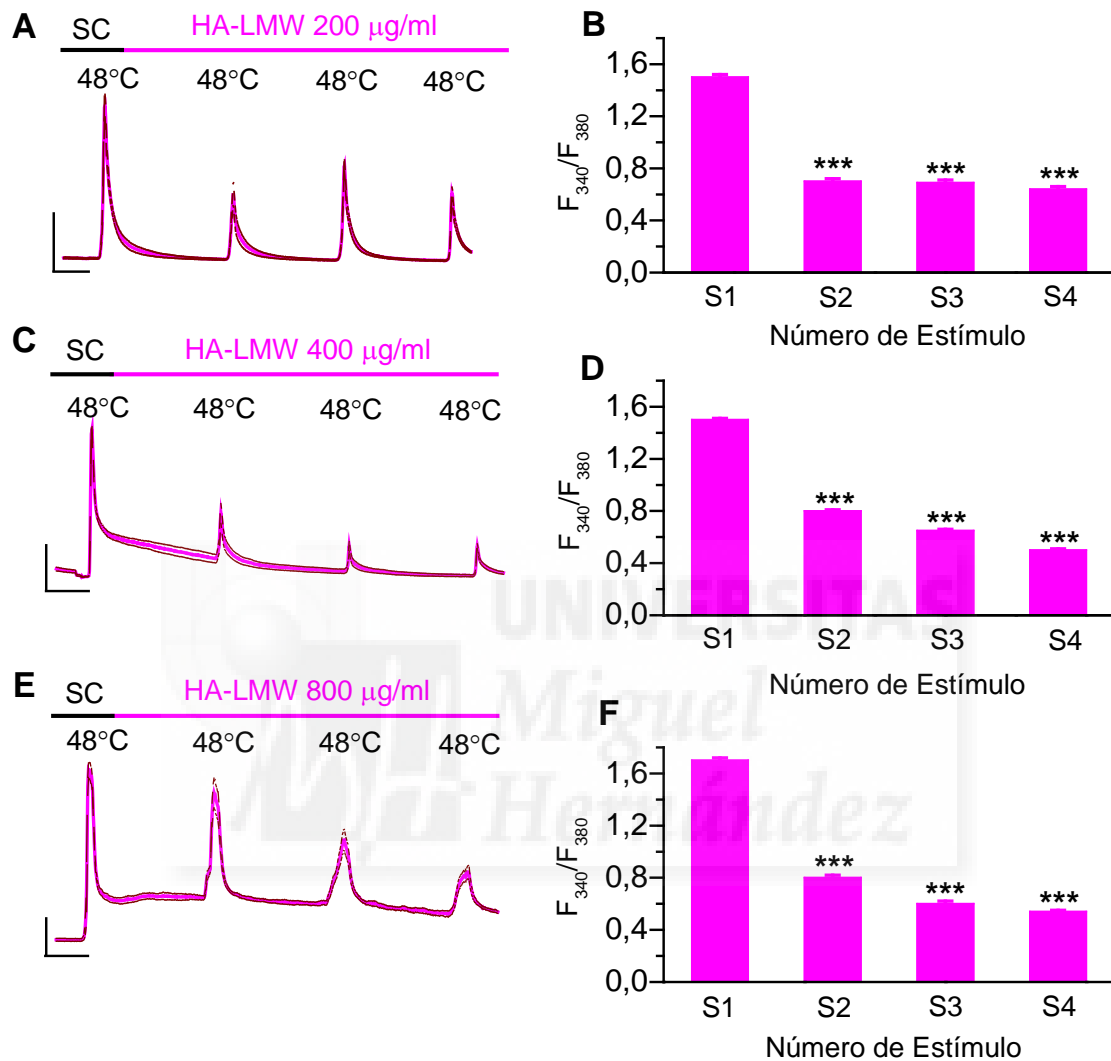


**Figura 4.15. Efecto de la desensibilización del canal TRPV1 expresado en las células SH-SY5Y-TRPV1.** **A.** Trazado superior, ejemplo del curso temporal de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta al estímulo de calor (rampas hasta 48 °C, trazado inferior) en células SH-SY5Y-TRPV1 perfundidas con solución control (SC). En el mismo campo se muestran células carentes del SH-SY5Y WT (carentes de TRPV1), que no han respondido a los estímulos de calor (trazo azul). Se representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 células. **B.** Promedio de la amplitud de la respuesta ( $F_{340}/F_{380}$ ) a cada estímulo de calor (n=2525). Prueba T de Student: \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.1.1.2 Efecto del HA de bajo peso molecular (HA-LMW) sobre TRPV1

Se aplicó HA-LMW a las concentraciones: 200, 400 y 800  $\mu\text{g/ml}$  en las células SH-SY5Y-TRPV1. El protocolo fue similar al descrito anteriormente, donde el primer estímulo de calor (S1, respuesta control) se realizó en presencia de solución control (SC). Posteriormente se perfundió con la solución de HA-LMW a la concentración indicada, de forma continua durante 30 minutos, realizando el

segundo (S2), tercero (S3) y cuarto (S4) estímulo de calor en presencia de la solución con HA, como se puede observar en la figura 4.16. A, C y E.



**Figura 4.16. Efecto del HA-LMW sobre las respuestas a calor del TRPV1 expresado en la línea celular SH-SY5Y-TRPV1.** Se muestra el curso temporal de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a los estímulos de calor (48 °C) en células SH-SY5Y-TRPV1 perfundidas con HA-LMW a 200 µg/ml (A), 400 µg/ml (C) y 800 µg/ml (E). Se identifica la perfusión con la solución de HA con la línea rosa en la parte superior y la perfusión en solución control (SC). En los registros se representa el promedio de cinco células junto con el error estándar. La escala vertical corresponde a 0.5  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal 200 s. A la derecha el promedio de la amplitud de la respuesta ( $F_{340}/F_{380}$ ) evocada por cada estímulo de calor para 200 µg/ml (B), 400 µg/ml (D) y 800 µg/ml (F). En todos los casos, la primera respuesta (S1) se realizó en presencia de solución control. Los datos están normalizados con la amplitud de primera respuesta (S1). 200 µg/ml, n=394; 400 µg/ml, n=1025 y 800 µg/ml, n=846. Prueba t de Student: \*\*\* p<0.001.

Cuando se perfundió con la solución de HA-LMW se observó que las respuestas evocadas por los estímulos de calor fueron significativamente inferiores a la primera respuesta (S1) (Figura 4.16). Para eliminar el componente debido a la desensibilización o taquifilaxia, se comparó la amplitud de la respuesta en el cuarto estímulo (S4), en el que las células habían pasado 30 minutos en presencia de HA-LMW (Figura 4.16.A, C y E), con la amplitud de la respuesta en el cuarto estímulo del grupo de células estudiadas en solución control (figura 4.15), en el que veíamos el efecto de la desensibilización del canal por estimulación repetitiva. Para ello se normalizó la amplitud de la respuesta de cada célula en el cuarto estímulo, respecto a la amplitud de su respuesta al primer estímulo obtenida siempre en solución control, obteniendo de esta forma el porcentaje de respuesta respecto a su control (explicado en Métodos, figura 3.13). Como se muestra en la tabla 4.7, se observó que en presencia de HA-LMW la amplitud de las respuestas a calor fue de menor amplitud a lo esperado por el efecto de la desensibilización.

Condición	SC	HA-LMW 200 µg/ml	HA-LMW 400 µg/ml	HA-LMW 800 µg/ml
% Respuesta respecto a su control (S4 vs S1)	60 ± 0.8 (n=2525)	45 ± 1.5 (n=394)	34 ± 0.7 (n=1025)	31 ± 0.5 (n=846)
T de Student		vs. Control: ***	vs. Control: *** vs. LMW 200: ***	vs. Control: *** vs. LMW 200: *** vs LMW 400: N.S.

**Tabla 4.7.** Porcentaje de respuesta normalizado en cada condición, S4 con respecto a S1: Solución control (SC), 200, 400 y 800 µg/ml de HA-LMW en células SH-SY5Y-TRPV1. Prueba t de Student: n.s. p>0.05; \*\*\* p<0.001.

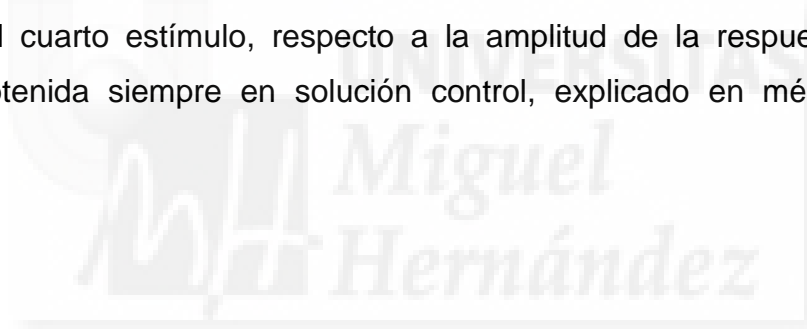
#### **4.1.1.3 Efecto del HA de alto peso molecular (HA-HMW) sobre TRPV1**

Siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, se emplearon soluciones de HA-HMW a las tres concentraciones: 200, 400 y 800 µg/ml. El primer estímulo de calor (S1) se realizó en presencia de solución control (SC). Posteriormente se perfundió con la solución de HA-LMW de forma continua

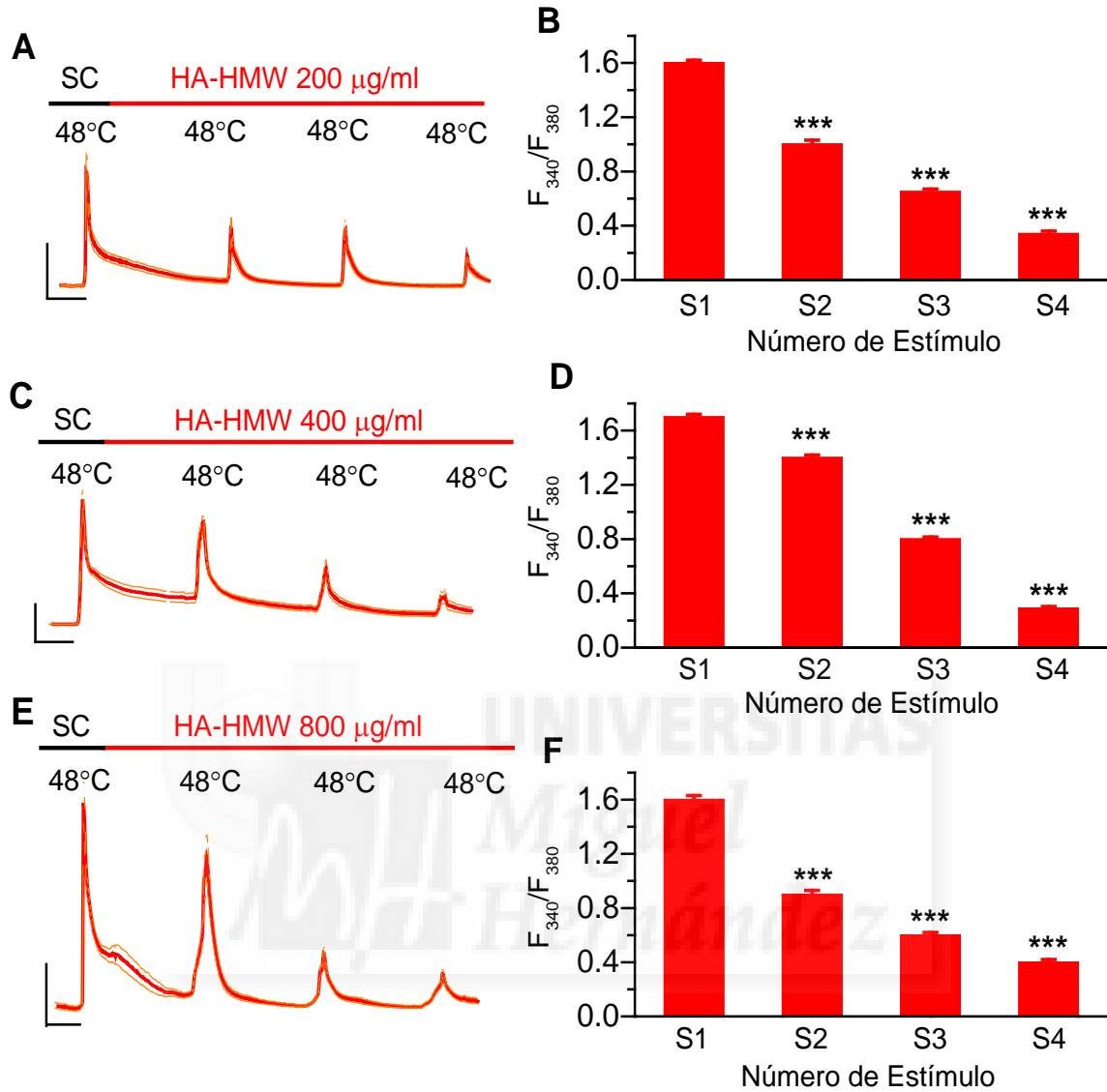
durante 30 minutos, realizando el segundo (S2), tercero (S3) y cuarto (S4) estímulo de calor en presencia de la solución con HA-HMW.

Los grupos de células tratadas con HA-HMW mostraron amplitudes de respuesta significativamente inferiores en comparación con su respuesta control. La amplitud de la respuesta evocada por la activación del canal TRPV1, fue menor después de 30 minutos de exposición con las soluciones de HA-HMW, es decir, en S4 (Figura 4.17).

Para eliminar el componente debido a la desensibilización o taquifilaxia, se comparó la amplitud de la respuesta en el cuarto estímulo (S4) en el que las células habían pasado 30 minutos en presencia de HA-HMW (figura 4.17), con la amplitud de la respuesta en el cuarto estímulo de otro grupo de células en solución control (Figura 4.15), en el que se veía el efecto de la desensibilización del canal por estimulación repetitiva. Se normalizó la amplitud de la respuesta de cada célula en el cuarto estímulo, respecto a la amplitud de la respuesta al primer estímulo obtenida siempre en solución control, explicado en métodos (Figura 3.13).







**Figura 4.17. Efecto del HA-HMW sobre las respuestas a calor del TRPV1 expresado en la línea celular SH-SY5Y-TRPV1.** Se muestran ejemplos del curso temporal de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a los estímulos de calor (48 °C) en células SH-SY5Y-TRPV1 perfundidas con HA-HMW a 200 µg/ml (A), 400 µg/ml (C) y 800 µg/ml (E). Se identifica la perfusión con la solución con HA con la línea roja en la parte superior y la perfusión en solución control (SC). En los registros se representa el promedio de cinco células junto con el error estándar. La escala vertical corresponde a 0.5  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal 200 s. A la derecha el promedio de la amplitud de la respuesta ( $F_{340}/F_{380}$ ) evocado por los estímulos de calor con 200 µg/ml (B), 400 µg/ml (D) y 800 µg/ml (F). En todos los casos, la primera respuesta (S1) en presencia de solución control (SC). Los datos están normalizados respecto a la primera respuesta (S1). 200 µg/ml; n=292, 400 µg/ml; n=400 y 800 µg/ml; n=635. Prueba t de Student: \*\*\* p<0.001.

Como se muestra en la tabla 4.8, se observó que en presencia de HA-HMW la amplitud de las respuestas a calor fueron de menor amplitud a lo esperado por el efecto de la desensibilización.

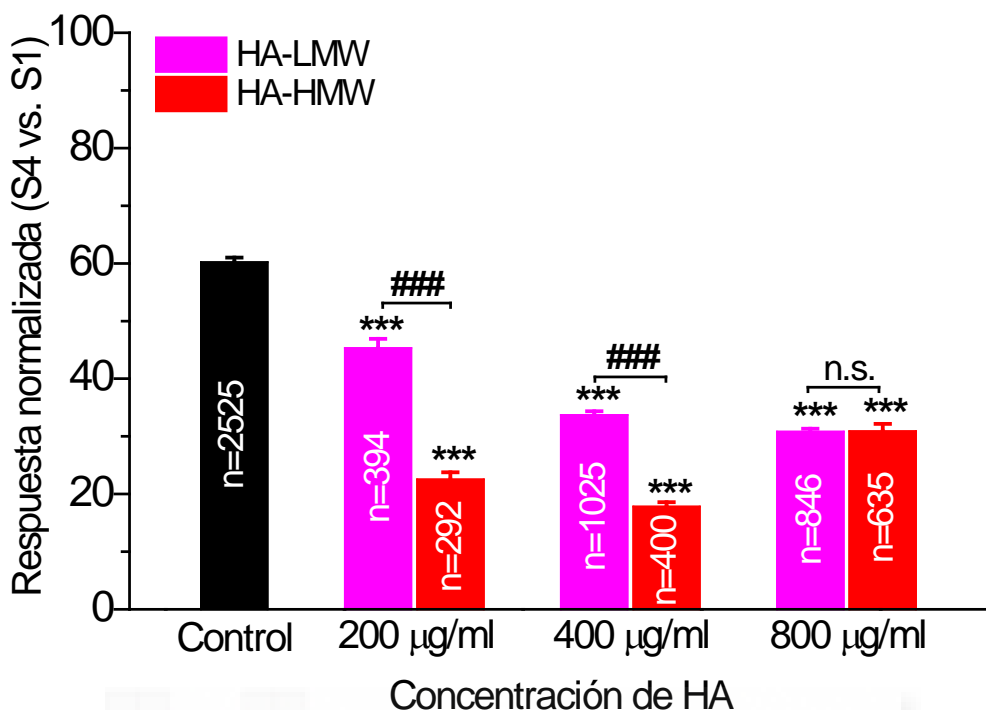
Condición	SC	HA-HMW 200 µg/ml	HA-HMW 400 µg/ml	HA-HMW 800 µg/ml
% Respuesta respecto a su control (S4 vs S1)	60 ± 0.8 (n=2525)	23 ± 1.0 (n=292)	18 ± 0.8 (n=400)	31 ± 1.0 (n=635)
Test t de Student		vs. Control: ***	vs. Control: *** vs. HMW 200: **	vs. Control: *** vs. HMW 200: ** vs HMW 400: ***

**Tabla 4.8.** Porcentaje de respuesta normalizado en cada condición, S4 con respecto a S1: Solución control (SC), 200, 400 y 800 µg/ml de HA-HMW en células SH-SY5Y-TRPV1. Prueba Prueba t de Student: n.s. p>0.05; p<0.01; \*\*\* p<0.001.

#### **4.1.1.4 Análisis comparativo del efecto de la concentración y peso molecular del HA sobre TRPV1 en las células SH-SY5Y-TRPV1**

Para ver el efecto de la concentración y peso molecular, se compararon las respuestas obtenidas con el último estímulo de calor (S4) tras estar las células en presencia del polisacárido durante 30 minutos (Figura 4.18), y siempre se tuvo de referencia la desensibilización del canal. Como se puede apreciar en la figura 4.18, se observó un efecto inhibitorio por parte del HA tanto de bajo peso molecular como de alto peso molecular, siendo mayor el efecto inhibitorio de la respuesta a calor de TRPV1 cuando se empleó el HA-HMW a la concentración 400 µg/ml. En este caso la respuesta se redujo un 82 % frente a un 40 % observado en el grupo tratado con la solución control (SC), debido al efecto de la desensibilización o taquifilixia. Los resultados obtenidos en la línea celular SH-SY5Y-TRPV1 sugieren un efecto inhibitorio del HA sobre las respuestas del canal iónico TRPV1 activado por calor, teniendo un efecto más robusto tras 30 minutos de exposición con la solución de HA.

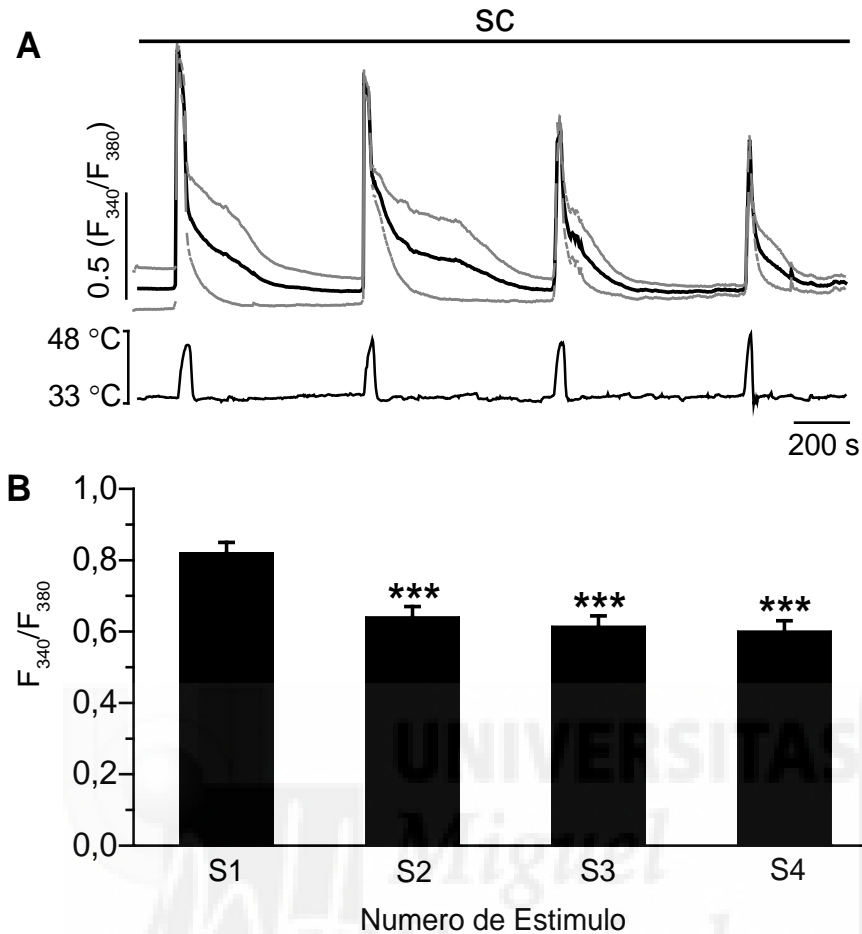
De acuerdo al peso molecular del HA empleado, se observó que el mayor efecto fue conseguido con el HA de alto peso molecular (HA-HMW).



**Figura 4.18.** Efecto de la concentración y peso molecular del HA sobre la respuesta de TRPV1 a los estímulos de calor en células SH-SY5Y-TRPV1. Valor medio del porcentaje de respuesta evocada por S4 en cada condición estudiada (valores normalizados en cada célula con el de su la primera respuesta S1, respuesta control). Se muestra el grupo control (barra negra), el grupo tratado con HA-LMW (barras rosa) y el grupo tratado con HA-HMW (barras rojas). En la parte inferior de las barras se indica la concentración de HA correspondiente a cada grupo: 200 µg/ml, 400 µg/ml y 800 µg/ml. Prueba ANOVA una vía + Bonferroni: n.s. p>0.05; \*\*\* p<0.001. Estadística: (\*) Control vs. HA-HMW o HA-LMW; (#) HA-LMW vs. HA-HMW.

#### 4.1.2 Efecto del HA sobre el canal TRPV1 expresado en neuronas sensoriales de ganglio raquídeo

Una vez estudiado el efecto del HA sobre el canal iónico TRPV1 en la línea celular de expresión estable, se decidió realizar los mismos experimentos en neuronas sensoriales primarias en cultivo que expresan el canal TRPV1 de forma nativa. Para ello, utilizando cultivos celulares de 24 – 48 h de neuronas del ganglio raquídeo (DRG), se estudió el efecto del HA sobre la amplitud del cambio en  $[Ca^{2+}]_i$  mediado por TRPV1, cuando se utilizó como estímulo el calor en un rango nocivo (> 48 °C).



**Figura 4.19. Efecto de la desensibilización del canal TRPV1 en neuronas cultivadas de DRG.**  
**A.** Trazados superiores: Ejemplos del curso temporal de las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$ , en respuesta al estímulo de calor (48 °C, trazado inferior) en tres neuronas de DRG tratadas con solución control. **B.** Promedio de la amplitud de la respuesta ( $F_{340}/F_{380}$ ) a cada estímulo de calor en presencia de solución control (SC), n=92. Prueba t de Student: \*\*\* p<0.001.

En este estudio se han incluido aquellas células que respondieron al estímulo de temperatura, al estímulo de capsaicina 100 nM y al estímulo de 30 mM KCl, seleccionando de este modo neuronas TRPV1 positivas. La capsaicina se utilizó para seleccionar las neuronas que respondieron al estímulo de temperatura mediante el canal iónico TRPV1 y no a través de otros TRP termosensibles, como TRPV2, el cual se activa alrededor de los 52 °C o TRPV3 que se activa sobre los 34 °C (Xu et al 2002). Finalmente el KCl 30 mM se aplicó con el objetivo de diferenciar las células nerviosas de las no nerviosas. Estos

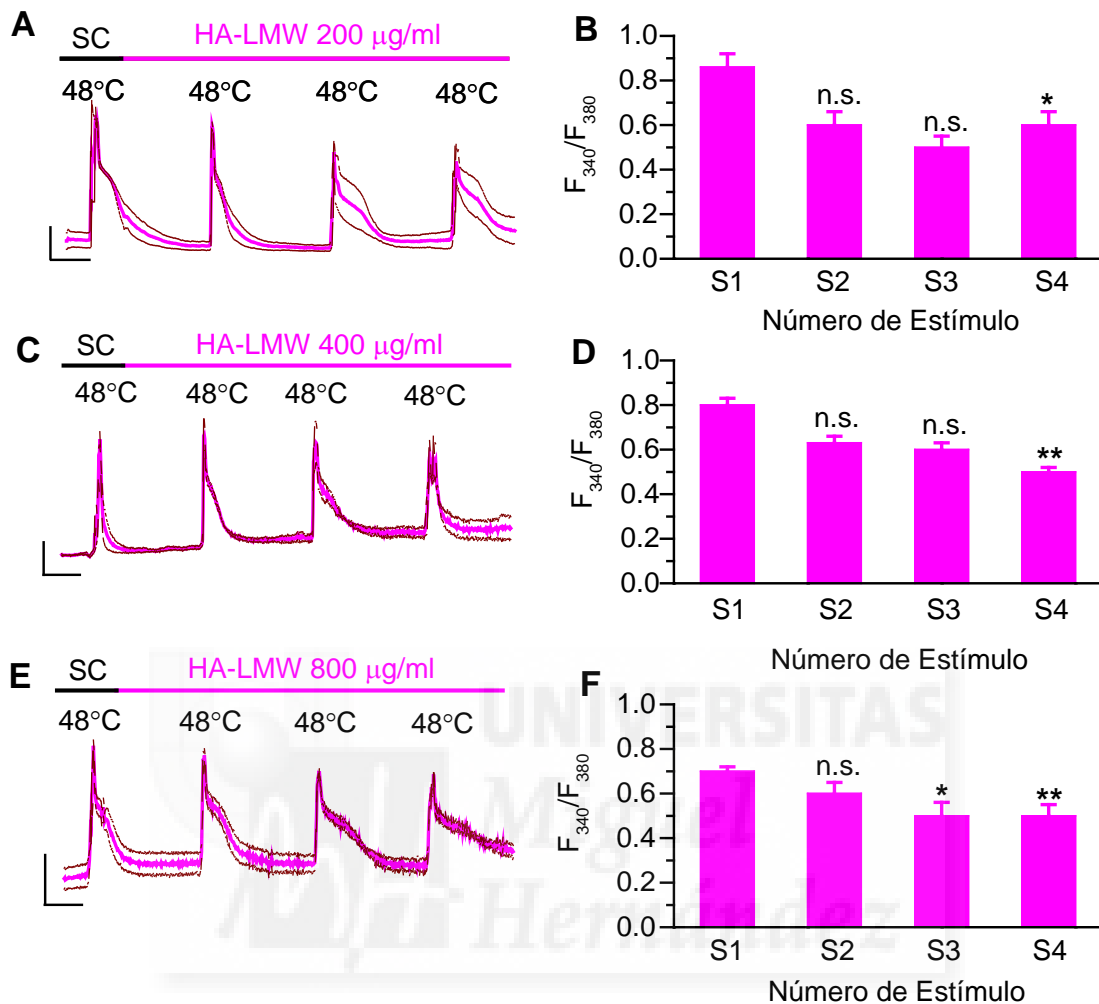
estímulos (capsaicina y KCl) fueron aplicados al final del protocolo para no interferir en el mismo y no producir desensibilización (estímulos no mostrados).

Nuevamente, primero se determinó la desensibilización del canal TRPV1 por estimulación repetitiva, para lo que se aplicó un protocolo de 4 estímulos de temperatura consecutivos en intervalos de 10 minutos, perfundiendo con solución extracelular (SC), tal como se muestra en la figura 4.19.A.

#### ***4.1.2.1 Efecto del HA-LMW sobre el canal TRPV1 expresado en neuronas de ganglio raquídeo***

Como se describió anteriormente, el primer estímulo de calor (S1, respuesta control) se realizó perfundiendo con solución control y posteriormente se perfundió con solución de HA-LMW, de forma continua durante 30 minutos, realizando en esas condiciones el segundo (S2), tercero (S3) y cuarto (S4) estímulo de calor (Figura 4.20). Se emplearon soluciones de HA-LMW a las concentraciones: 200, 400 y 800 µg/ml.

Las respuestas evocadas por los estímulos de calor en presencia de HA fueron significativamente inferiores en amplitud a la de la primera respuesta (S1), (Figura 4.20). Sin embargo, una parte de este efecto se debe solamente a la desensibilización (taquifilaxia), como se muestra en la figura 4.19. Para eliminar el componente atribuible a la desensibilización, se comparó la amplitud de la respuesta al cuarto estímulo (S4) tras 30 minutos en presencia de HA-LMW (Figura 4.20), con la de la respuesta al cuarto estímulo del grupo de células perfundidas con solución control (Figura 4.19), en el que se veía el efecto de la desensibilización del canal por estimulación repetitiva. Se normalizó la amplitud de la respuesta de cada célula en el cuarto estímulo, respecto a la amplitud de la respuesta al primer estímulo obtenida siempre en solución control, como se explicó en la Sección de Métodos (Figura 3.13).



**Figura 4.20. Efecto del HA-LMW sobre las respuestas a calor del canal TRPV1 expresado de forma nativa en neuronas cultivadas de DRG.** Se muestra el curso temporal del aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a los estímulos de calor (48 °C) en neuronas de DRG perfundidas con HA-LMW a 200 µg/ml (A), 400 µg/ml (C) y 800 µg/ml (E). Se identifica la perfusión con la solución con HA con la línea rosa en la parte superior y la perfusión en solución control (SC). En los registros se representa el promedio de cinco células junto con el error estándar. La escala vertical corresponde a 0.25  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal 200 s. A la derecha se representa el valor medio de la amplitud de la respuesta ( $F_{340}/F_{380}$ ) evocada por el estímulo de calor para 200 µg/ml (B), 400 µg/ml (D) y 800 µg/ml (F) comparando los valores a los sucesivos estímulos con el valor durante la perfusión con la solución control (primera respuesta S1) 200 µg/ml; n=31, 400 µg/ml; n=86 y 800 µg/ml; n=18. Prueba t de Student: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Como se muestra en la tabla 4.9, solo cuando se aplicó HA-LMW a la concentración 400 µg/ml la amplitud de la respuesta a calor se redujo significativamente en comparación con la respuesta en solución control.

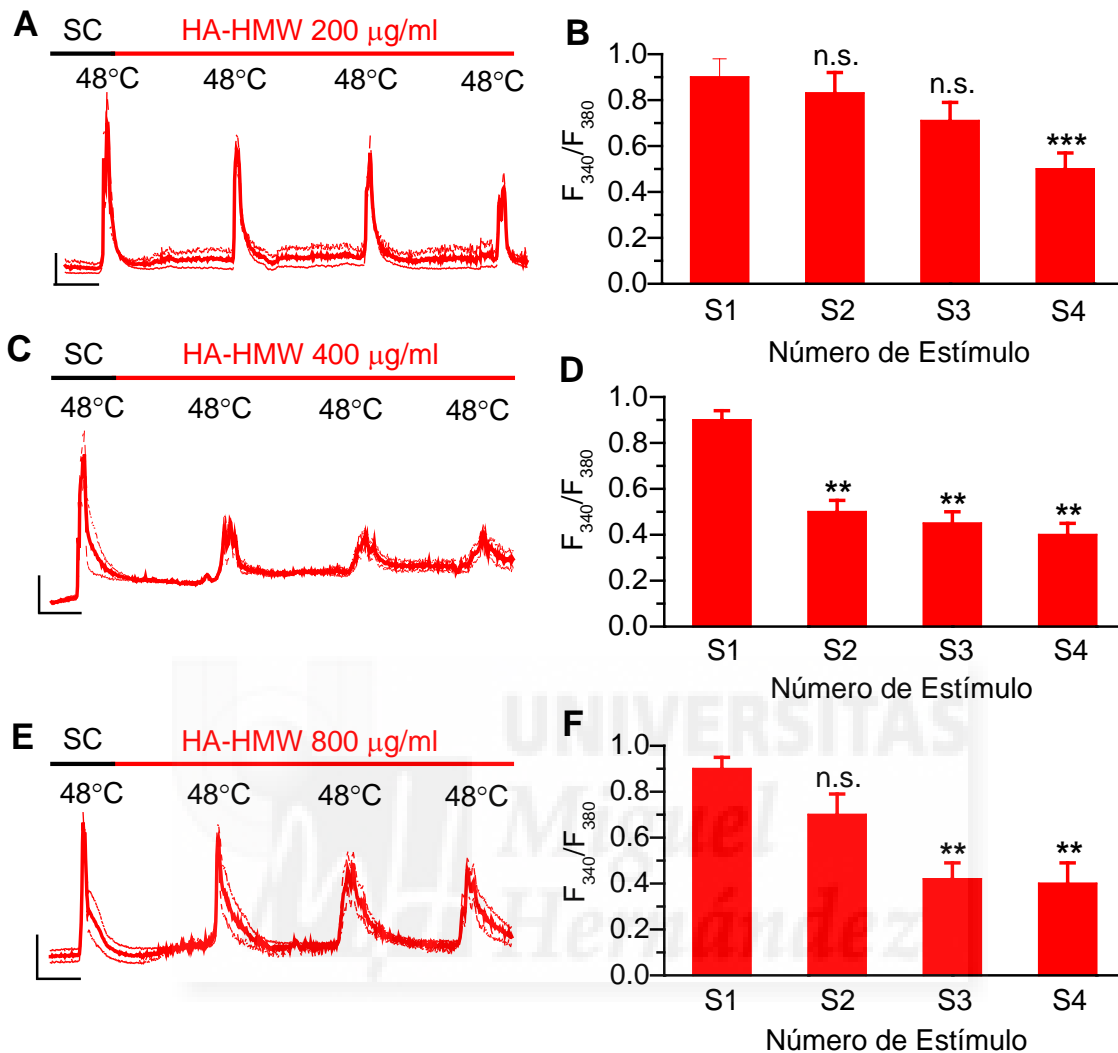
Condición	SC	HA-LMW 200 µg/ml	HA-LMW 400 µg/ml	HA-LMW 800 µg/ml
% Respuesta respecto a su control (S4 vs S1)	73 ± 3.0 (n=92)	65 ± 5.0 (n=31)	60 ± 2.0 (n=86)	68 ± 7.0 (n=18)
Test t de Student		vs. Control: N.S.	vs. Control: ** vs. LMW 200: N.S.	vs. Control: N.S. vs. LMW 200: N.S. vs LMW 400: N.S.

**Tabla 4.9.** Porcentaje de respuesta normalizado en cada condición, S4 con respecto a S1: Solución control (SC), 200, 400 y 800 µg/ml de HA-LMW en neuronas cultivadas de DRG provenientes de ratón. Prueba t de Student: n.s. p>0.05; \* p<0.05; \*\* p<0.01.

#### **4.1.2.2 Efecto del HA-HMW sobre el canal TRPV1 expresados en neuronas de ganglio raquídeo**

En las neuronas sensoriales de DRG, también se estudió el efecto de este polímero de alto peso molecular a las concentraciones 200, 400 y 800 µg/ml, siguiendo el mismo protocolo descrito en los apartados anteriores. Al final del protocolo, se aplicó un estímulo de capsaicina 100 nM, con el fin de identificar aquellas neuronas que habían respondido tanto a calor como al compuesto vaniloide. La amplitud de las respuestas en las neuronas DRG activadas por calor, tratadas con las soluciones de HA-HMW, mostraron una reducción significativa con cada una de las concentraciones empleadas (Figura 4.21).

Las respuestas evocadas en presencia de HA, por los estímulos de calor, fueron inferiores a la primera respuesta (S1), obteniendo una disminución significativa de la amplitud de la respuesta de TRPV1 (Figura 4.21). Como se describió anteriormente, para eliminar el componente debido a la desensibilización o taquifilaxia, se comparó también la amplitud de la respuesta en el cuarto estímulo (S4), en el que las células habían pasado 30 minutos en presencia de HA-HMW (Figura 4.21), con la amplitud de la respuesta en el cuarto estímulo de otro grupo de células en solución control (Figura 4.19), en el que se veía sólo el efecto de la desensibilización del canal por estimulación repetitiva. Se normalizó la amplitud de la respuesta de cada célula en el cuarto estímulo, respecto a la amplitud de la respuesta al primer estímulo obtenida siempre en solución control, explicado en métodos, figura 3.13.



**Figura 4.21. Efecto del HA-HMW sobre las respuestas a calor del canal TRPV1 expresado de forma nativa en neuronas cultivadas de DRG.** Se muestra el curso temporal de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a los estímulos de calor (48 °C) en neuronas de DRG perfundidas con HA-HMW a 200 µg/ml (A), 400 µg/ml (C) y 800 µg/ml (E). Se identifica la perfusión con la solución con HA con la línea roja en la parte superior y la perfusión en solución control (SC). En los registros se representa el promedio de cinco células junto con el error estándar. La escala vertical corresponde a 0.25  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal 200 s. A la derecha el valor medio de la amplitud de la respuesta ( $F_{340}/F_{380}$ ) evocada en cada estímulo de calor con 200 µg/ml (B), 400 µg/ml (D) y 800 µg/ml (F). En todos los casos, la primera respuesta (S1) se realizó en presencia de solución control. 200 µg/ml; n=34, 400 µg/ml; n=36 y 800 µg/ml; n=18. Prueba t de Student: n.s. p>0.05; \* p<0.01; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Como se muestra en la tabla 4.10, se observó una reducción de la respuesta a calor (48 °C) en presencia de HA-HMW a todas las concentraciones, que fue mayor a lo esperado por efecto de la desensibilización. Los resultados



correspondientes al HA-HMW 400 µg/ml y el control en las neuronas de DRG mostrados en este apartado dieron lugar a los resultados mostrados en el artículo adjunto, figura 1d-f.

Condición	SC	HA-HMW 200 µg/ml	HA-HMW 400 µg/ml	HA-HMW 800 µg/ml
% Respuesta respecto a su control (S4 vs S1)	73 ± 3.0	50 ± 3.0	50 ± 4.0	55 ± 6.0
Test t de Student		vs. Control: ***	vs. Control: ** vs. LMW 200: N.S.	vs. Control: * vs. LMW 200: N.S. vs LMW 400: N.S.

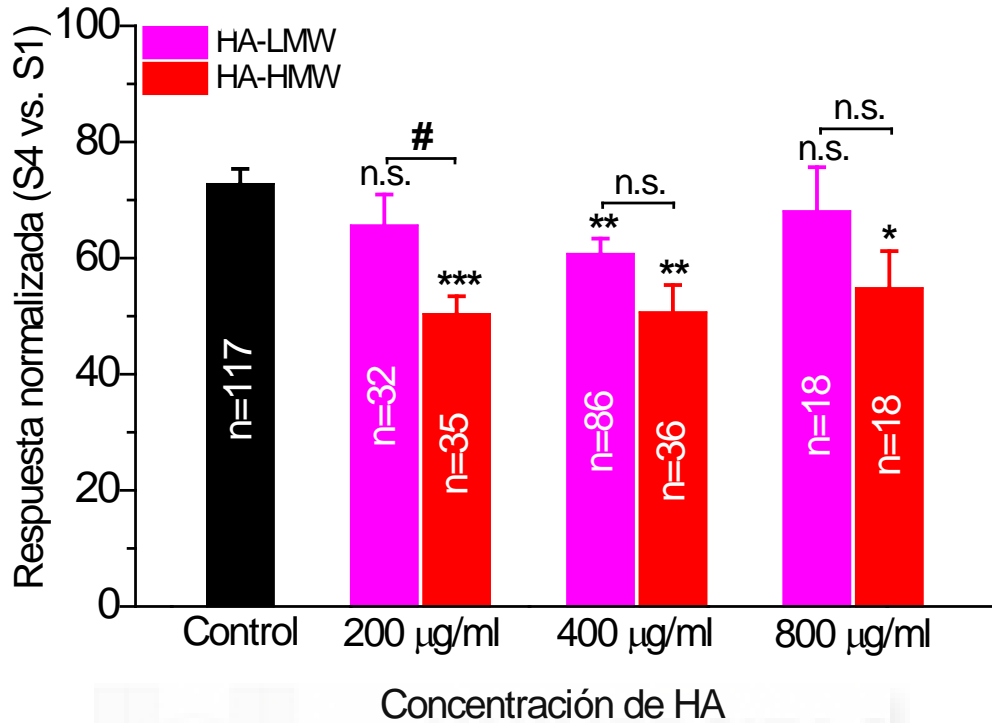
**Tabla 4.10.** Porcentaje de respuesta del S4 con respecto a S1 de cada condición: Solución control (SC), 200, 400 y 800 µg/ml de HA-HMW en neuronas de DRG. Prueba t de Student: n.s. p>0.05; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

#### **4.1.2.3 Análisis comparativo del efecto del HA sobre el canal TRPV1 expresado en neuronas de ganglio raquídeo**

Al igual que ocurría con la línea celular (SH-SY5Y-TRPV1), en el grupo de neuronas de DRG registradas siempre en solución control, la amplitud de las respuestas iba disminuyendo con cada aplicación sucesiva de calor (desensibilización).

Adicionalmente, al realizar las aplicaciones de calor en los grupos tratados con las diferentes soluciones de HA, se observó, a partir del segundo estímulo de calor, que la amplitud de las respuestas iba siendo inferior en comparación a las respuestas correspondientes obtenidas en el grupo control, siendo este efecto mayor al utilizar el HA de alto peso molecular (HA-HMW), con el que se obtenía un efecto similar a todas las concentraciones (Figura 4.22).

Finalmente, debido a que el mayor efecto se obtuvo en el grupo de neuronas expuestas a HA de alto peso molecular (HA-HMW) a la concentración de 400 µg/ml, se decidió emplear esta concentración con el HA de alto peso molecular para llevar a cabo el estudio que se desarrolla a partir de este punto en el presente trabajo.

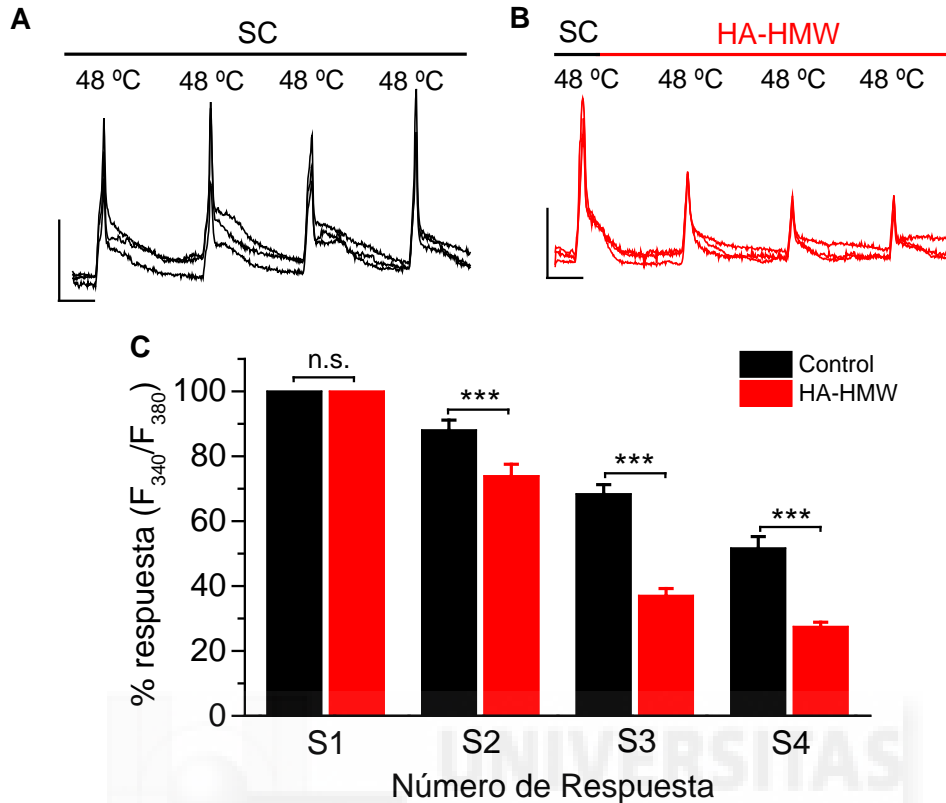


**Figura 4.22. Efecto de la concentración y peso molecular del HA sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a los estímulos de calor en neuronas de DRG.** Promedio del porcentaje de la respuesta evocada por S4 en cada condición estudiada (valores normalizados con la primera respuesta, respuesta control). Se muestra el grupo control (barra negra), el grupo tratado con HA-LMW (barras rosa) y el grupo de células tratadas con HA-HMW (barras rojas). En la parte inferior de las barras se indica la concentración correspondiente a cada grupo: 200 µg/ml, 400 µg/ml y 800 µg/ml. Prueba t de Student: n.s.  $p > 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . (\*) Control vs. HA; (#) HA-LMW vs. HA-HMW.

## 4.2 Efecto del HA sobre el canal TRPV1 expresado en células HEK293

La supervivencia de las células SH-SY5Y-TRPV1 empleadas en los experimentos antes descritos no fue satisfactoria. Por ello se decidió, pasar a utilizar células HEK293 transfectadas con el plásmido que codifica para el canal iónico TRPV1 unido a la proteína fluorescente amarilla EYFP (ver Métodos sección 3.2).

En el grupo de experimentos con estas células se estudió el efecto de la solución de HA-HMW a 400 µg/ml, con la que se había observado un efecto mayor sobre las respuestas de TRPV1, tanto en la línea celular como en las neuronas. Para ello se aplicó el mismo protocolo de cuatro pulsos de temperatura (rampas hasta 48 °C, cada 10 min) descrito en los apartados anteriores (Figura 4.23).



**Figura 4.23. Efecto del HA-HMW 400 µg/ml sobre las respuestas a calor del canal TRPV1 expresado en la línea celular HEK293.** Ejemplo, en tres células en cada caso, del curso temporal de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a los estímulos de calor (48 °C) en células HEK293-TRPV1-EYFP (+), en presencia de solución control (A), así como en presencia de HA-HMW 400 µg/ml (B). El tiempo de perfusión con la solución con HA se identifica con una línea roja en la parte superior de los trazos. la perfusión con solución control (SC) se marca como línea de color negro. La barra vertical en los registros representa la escala 0.04  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal 200 s. C. Valor medio del porcentaje de respuesta evocada en cada estímulo de calor en condición control (barras negras) y con HA-HMW 400 µg/ml (barras rojas). La primera respuesta (S1) se realizó en presencia de solución control. Los datos están normalizados con la primera respuesta en cada situación. Control; n=55 y HA; n=74. Prueba t de Student: n.s.  $p > 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Cuando se perfundió con solución control, la amplitud de la respuesta de TRPV1 a los estímulos de calor fue disminuyendo por efecto de la desensibilización, tal como se describió en la línea celular SH-SY5Y-TRPV1 y en las neuronas de DRG. En el grupo de células perfundido con HA-HMWA a 400 µg/ml después del primer estímulo de temperatura (S1) obtenido bajo solución control (SC), se puede observar como las respuestas también fueron disminuyendo con la aplicación consecutiva de estímulos de calor (48 °C). Sin embargo, la magnitud del descenso de la respuesta fue mayor en comparación con el grupo control. Los resultados obtenidos en este apartado dieron lugar a los

resultados mostrados en el artículo que se adjunta, figura 1a-c. En la tabla 4.11, se muestra el porcentaje de respuesta del cuarto estímulo de calor normalizado con el primero (S4 vs. S1), para determinar el efecto del HA, descartando la desensibilización del canal. Como puede observarse, el HA-HMW evocó una disminución significativa de la respuesta.

Condición	SC	HA-HMW 400 µg/ml
% Respuesta respecto a su control (S4 vs S1)	52 ± 4.0 (n=55)	27 ± 1.0 (n=74)
Test t de Student		***

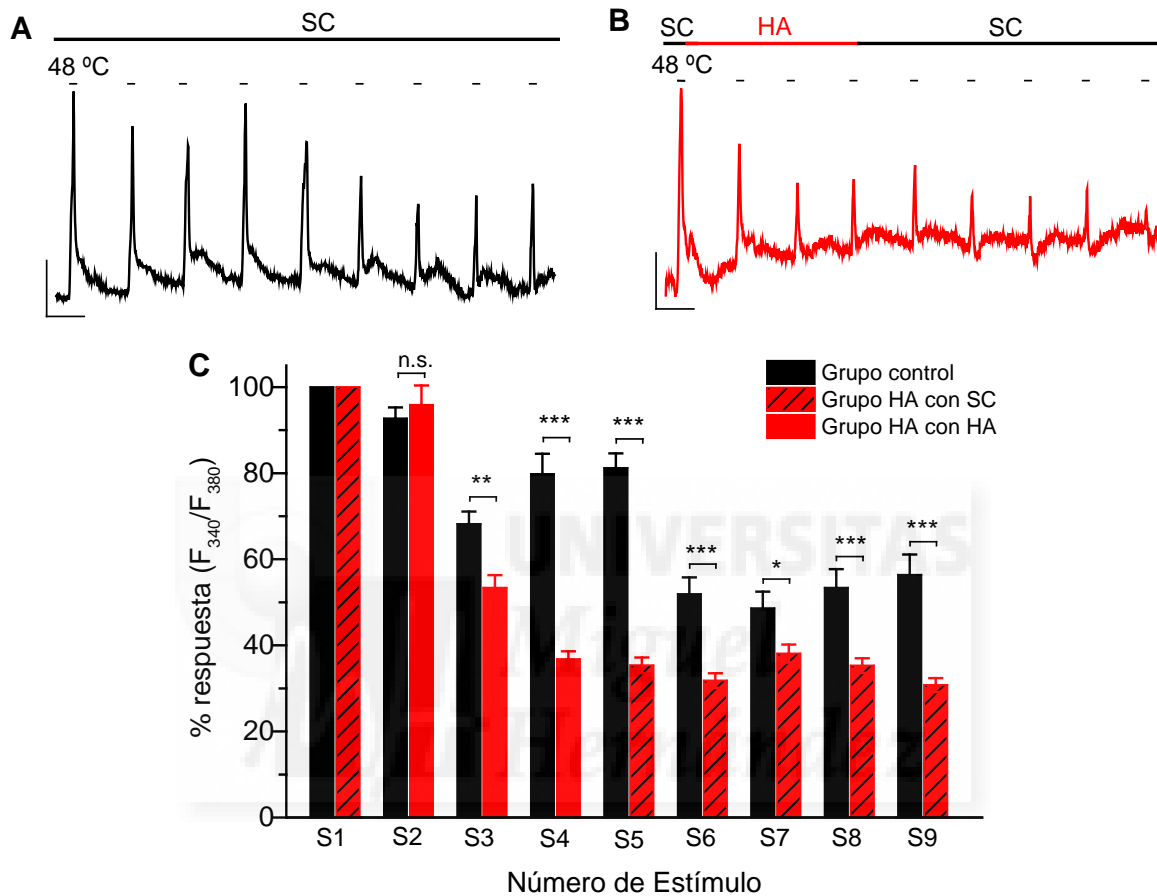
**Tabla 4.11.** Porcentaje de respuesta del S4 con respecto a S1 de cada condición: Solución control (SC) y HA-HMW 400 µg/ml en células HEK293-TRPV1-EYFP(+). Prueba t de Student: \*\*\* p<0.001.

#### 4.2.1 Duración del efecto del HA sobre la respuesta a calor de TRPV1 en células HEK293

En otro grupo de células HEK293-TRPV1-EYFP (+) se realizó un protocolo de nueve pulsos de temperatura (S1-S9) aplicados cada 10 min, (Figura 4.24) con el objetivo de determinar la persistencia del efecto del HA-HMW 400 µg/ml sobre las respuestas a calor evocadas por el canal iónico TRPV1 una vez retirado el polisacárido. Se siguió un protocolo similar al descrito anteriormente, con la diferencia de que, en el grupo tratado con la solución de HA, una vez retirada la solución de HA (en el cuarto estímulo de temperatura, S4) se aplicaron 5 estímulos más de calor, perfundiendo con solución control, tal como se muestra en la figura 4.24.B, llegando así a un total de 9 estímulos de calor.

En la figura 4.24.C se representa el promedio de la amplitud de las respuestas evocadas por los estímulos de calor del grupo tratado con perfusión continua de solución control extracelular (grupo control, barras negras) o del grupo tratado con HA durante S2-S4 (barras rojas). Se puede apreciar que el HA-HMW, mantiene su efecto sobre las respuestas del canal TRPV1 después de que éste haya sido retirado y que entre los estímulos S6-S7 se alcanza un grado de desensibilización estable que se mantiene hasta el noveno estímulo, S9.

A los 30 minutos (a partir de S4) de exposición al HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$ , se obtiene ya una reducción significativa al estímulo de calor que se mantiene en el tiempo estudiado a pesar de haber retirado la perfusión con HA.



**Figura 4.24. Efecto de HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta al estímulo de calor en células HEK293-TRPV1-EYFP (+).** A-B Curso temporal de las variaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las células HEK293-TRPV1-EGFP, donde se muestran las respuestas a calor en presencia de solución control (A) y en presencia de HA (B). C Porcentaje de respuesta del canal TRPV1 en respuesta a los estímulos de calor, en presencia de solución control extracelular (n=53, barras negras) en presencia de solución de HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  (n=93, barras rojas). Las barras rojas con líneas diagonales indican el grupo tratado con HA pero durante el lavado con solución control extracelular. La escala vertical de los registros es 0.04  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal corresponde a 400 s. Prueba t de Student: n.s.  $p > 0.05$ ; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Así pues, el HA-HMW continua ejerciendo su efecto sobre las respuestas evocadas por TRPV1 y manteniendo una reducción de alrededor del 77 % en las respuestas a calor, tras el lavado del polisacárido. Esto sugiere que el efecto del HA se mantiene a largo plazo, y que el HA permanecería asociado a alguna zona

de la membrana o del canal, lo que le permitiría ejercer su efecto. Estos datos dieron lugar a los resultados mostrados en el artículo adjunto, figura S1.

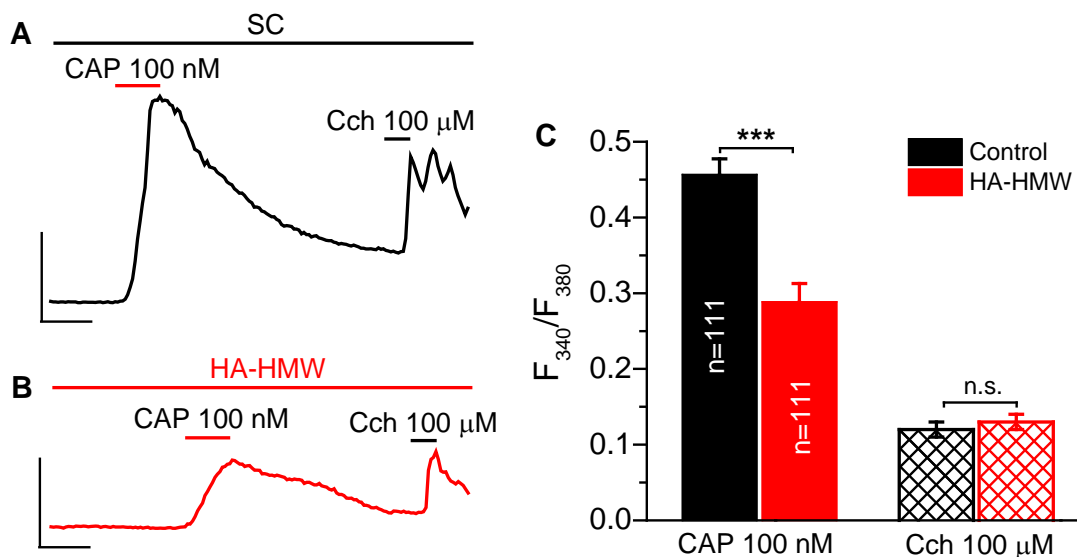
### **4.3 Efecto del HA sobre los cambios en la concentración de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) producidos en respuesta a la activación de TRPV1 por capsaicina.**

#### **4.3.1 Efecto del HA-HMW sobre la respuesta a capsaicina del canal TRPV1-EYFP expresado en células HEK293**

El protocolo consistió en activar el canal TRPV1 con un estímulo de capsaicina 100 nM preparada en solución control o en HA-HMW 400 µg/ml. Las células en las que se perfundió con HA-HMW 400 µg/ml, habían sido incubadas previamente con esta solución durante al menos 30 minutos (mantenidas en el incubador a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>). Para comprobar la viabilidad de las células se aplicó 100 µM carbacol (Cch), que activa los receptores muscarínicos (Gomis et al 2007) , al final del experimento.

El 92 % (111 de 121) de las células HEK293-TRPV1-EYFP (+) respondieron al estímulo de capsaicina en solución control, mientras que en el grupo de células pre-tratadas y perfundidas con HA, éste número disminuyó a 63 % (111/175). En las células que respondieron a capsaicina se midió la amplitud del incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  evocado por el estímulo, siendo éste un 31 % menor en las células tratadas con HA-HMW 400 µg/ml, sin que se afectara la amplitud de la respuesta a carbacol (Figura 4.25).

Los resultados mostrados en este apartado dieron lugar a los resultados expuestos en el artículo que se adjunta, figura 1g-h.

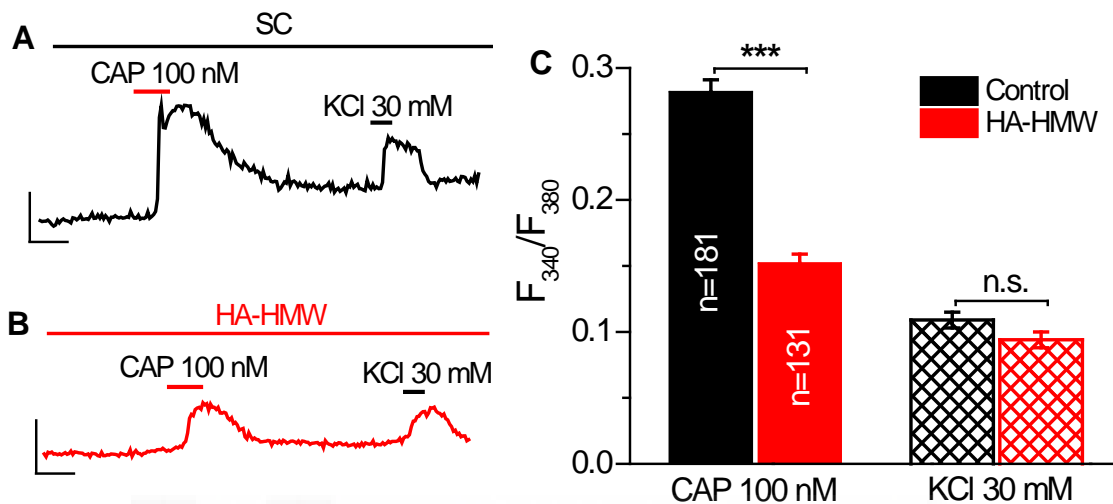


**Figura 4.25. Efecto del HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células HEK293 transfectadas con TRPV1-EYFP en respuesta al estímulo capsaicina 100 nM. A-B** Ejemplo del curso temporal de las variaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en dos neuronas de DRG en respuesta a capsaicina 100 nM, una en presencia de solución control (A) y la otra en presencia de HA (B). **C.** Promedio de la amplitud de respuesta de TRPV1 a capsaicina 100 nM (barras llenas) en condición control o con HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  y promedio de la respuesta a 100  $\mu\text{M}$  de carbachol (barras con líneas) en condición control y con HA. Escala vertical de los registros es 0.2  $F_{340}/F_{380}$  y horizontal 1 min. Prueba t de Student: n.s,  $p > 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

#### 4.3.2 Efecto del HA-HMW sobre la respuesta a capsaicina del canal TRPV1 expresado en neuronas sensoriales en cultivo.

En cultivos de neuronas sensoriales primarias de ganglios raquídeos, de 24 o 48 horas, se comparó la amplitud de la respuesta a capsaicina 100 nM disuelta en solución control con la obtenida en un grupo de neuronas tratadas previamente durante al menos 30 minutos con HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  y en las que la capsaicina se aplicó disuelta en la solución de HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 4.26.). Para comprobar la viabilidad de las células se utilizó KCl 30 mM. El 68 % de las neuronas estudiadas en solución control respondieron a capsaicina mientras que en el grupo de células pre-tratadas con HA-HMW respondieron el 37 %. El pre-tratamiento y la perfusión con HA produjo además una reducción del 44 % en la amplitud de la respuesta a capsaicina (control:  $0.3 \pm 0.009$  vs. HA:  $0.15 \pm 0.007$ , Figura 4.26.C). No hubo diferencias significativas en las respuestas a KCl 30 mM entre ambos grupos (Figura 4.27.C, barras con líneas). Igualmente, los resultados

mostrados en este apartado dieron lugar a los resultados expuestos en el artículo que se adjunta, figura 1j-l.

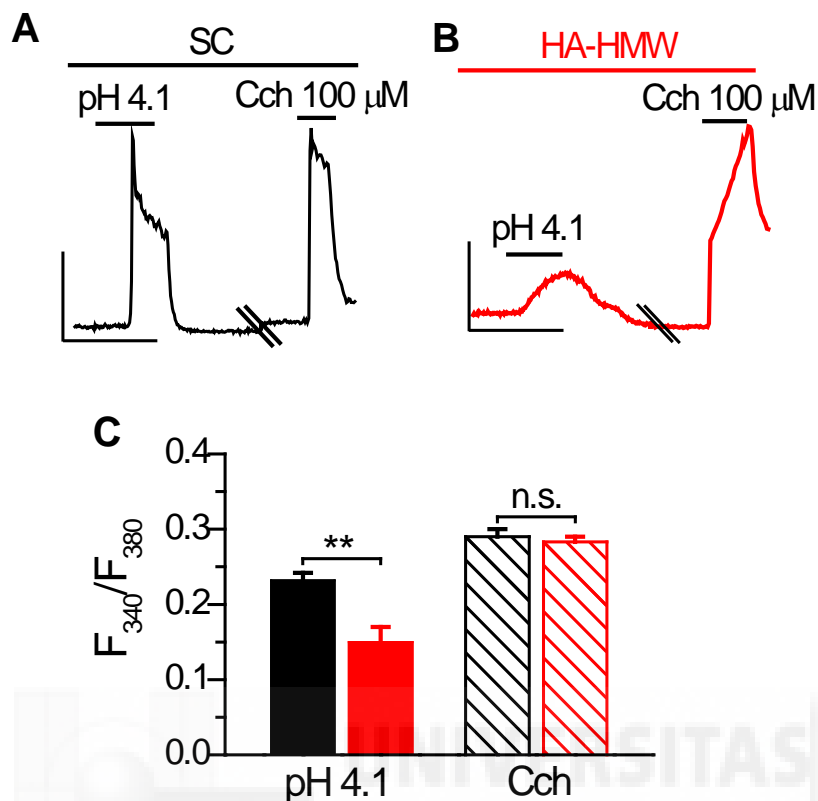


**Figura 4.26. Efecto del HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  sobre los cambios en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en neuronas de DRG en respuesta al estímulo capsaicina 100 nM. A-B** Ejemplo del curso temporal de las variaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en dos neuronas de DRG en respuesta a capsaicina 100 nM en presencia de solución control (A) o en presencia de HA (B). **C.** Promedio de la amplitud de respuesta de TRPV1 a capsaicina 100 nM (barras llenas) o a 100  $\mu\text{M}$  KCl (barras rayadas) en solución control (barras negras) y con HA (barras rojas). La escala de calibración en A y B: vertical corresponde a 0.1  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal a 1 min. Prueba t de Student, n.s,  $p > 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.4 Efecto del HA sobre los cambios en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) producidos en respuesta a la activación de TRPV1 por pH ácido.

Empleando cultivos de células HEK293 transfectadas con TRPV1-EYFP, se comparó en aquellas células que expresaban la proteína fluorescente, la amplitud de la respuesta evocada por la activación del canal TRPV1 por una solución ácida (pH 4.1). Se comparó la amplitud de la respuesta obtenida en solución control, con la respuesta obtenida en otro grupo de células tratadas previamente, durante al menos 30 minutos con HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  y en las que se aplicó a continuación una solución que contenía HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  ajustada a pH 4.1 (Figura 4.27).





**Figura 4.27. Efecto del HA HMW 400 µg/ml sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  células HEK293-TRPV1-EYFP en respuesta al estímulo de pH 4.1. A-B** Curso temporal de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en dos células HEK-TRPV1-EYFP (+) en respuesta a la solución control ajustada a pH 4.1 (A) o en solución HA-HMW 400 ajustada a pH 4.1 (B). **C.** Promedio de la amplitud de la respuesta de TRPV1 evocada por pH 4.1 (barras llenas) o a 100 µM carbacol en solución control (barras negras, n=74) y con HA (barras rojas, n=10). La escala vertical corresponde a 0.2  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal 200 s. Prueba t de Student, n.s.  $p > 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Se pudo observar una reducción significativa del 40 % en la respuesta a pH 4.1 en el grupo tratado con el polisacárido (Figura 4.27C). Por otro lado la aplicación de carbacol 100 µM (Cch), utilizado para comprobar la viabilidad de las células, no produjo diferencias en las respuestas entre ambos grupos (Figura 4.27.C, barras rayadas). Estos datos muestran que el HA-HMW reduce las respuestas evocadas por la activación con protones del canal TRPV1 expresado en células HEK293, como ocurría también con los estímulos de calor y capsaicina, descritos anteriormente. Los resultados que se muestran en este apartado dieron lugar a los resultados expuestos en el artículo que se adjunta, figura S2.

## **4.5 Efecto del HA sobre la amplitud de las corrientes macroscópicas inducidas por capsaicina mediadas por el canal TRPV1 expresado en células HEK293.**

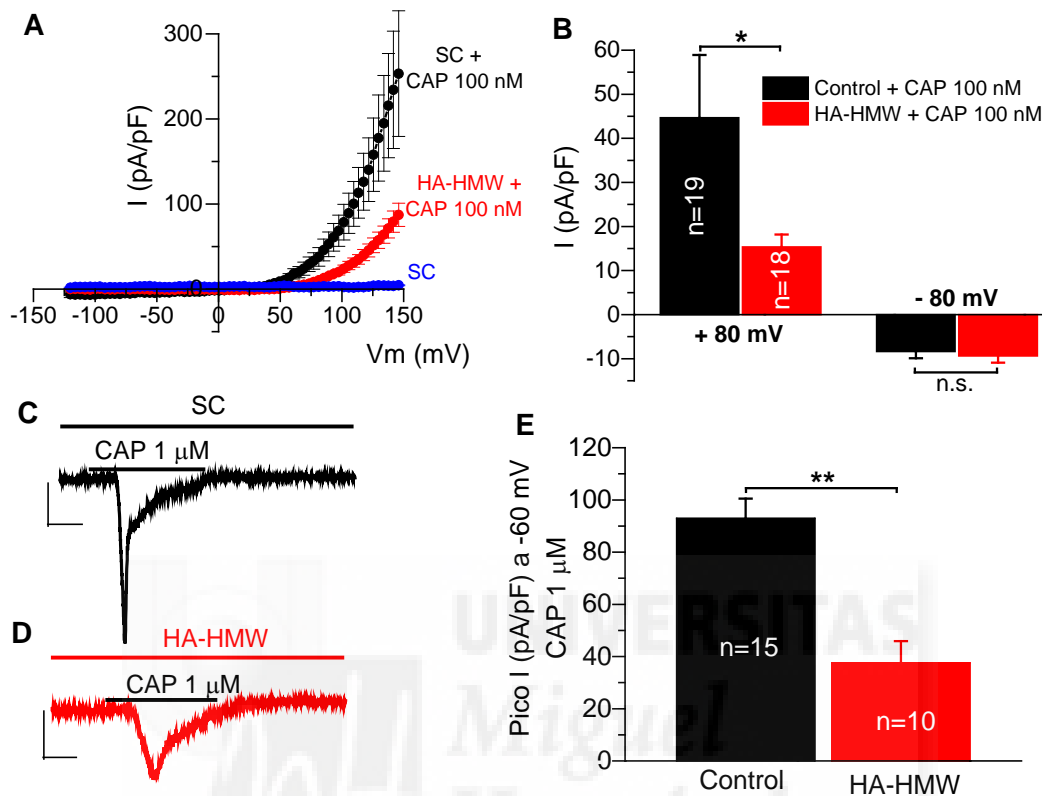
En este grupo de experimentos se midió la corriente evocada a través del canal TRPV1 empleando la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de célula entera y fijación de voltaje. El estudio se realizó en células HEK293 transfectadas con la proteína de fusión TRPV1-EYFP, seleccionando las células fluorescentes como TRPV1 positivas. Se aplicaron rampas de voltaje desde -120 mV a +150 mV, de 350 ms de duración, en intervalos de 5 segundos. En cada célula se aplicó primero 10 rampas perfundiendo con la solución control (corriente basal debido a la voltaje-dependencia del canal), a continuación una solución con capsaicina 100 nM durante 2 minutos aproximadamente, mientras seguían aplicándose las rampas y finalmente se lavó con la solución control. Las corrientes basales fueron sustraídas de la corriente obtenida en respuesta a capsaicina.

Se estudió el efecto de los dos tipos de HA, el de alto peso molecular (HA-HMW) y el de bajo peso molecular (HA-LMW). Para ello, en diferentes grupos de células previamente incubadas, bien con HA-HMW 400 µg/ml o con HA-LMW 400 µg/ml, durante al menos 30 min (en incubador 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>), se obtuvieron las primeras 10 rampas (corriente basal) en presencia de HA, y a continuación se aplicó la capsaicina 100 nM preparada en HA-HMW o en HA-LMW. Una vez finalizado el estímulo con capsaicina, se pasó a lavar con solución control. De las corrientes obtenidas en respuesta a capsaicina se sustrajeron las corrientes basales.

### **4.5.1 Efecto del HA-HMW 400 µg/ml sobre las corrientes macroscópicas del TRPV1 evocadas por capsaicina**

En la figura 4.28.A se muestra el promedio de las curvas corriente-voltaje de los registros obtenidos en varios grupos de células: células registradas en solución control (n=19, símbolos azules), células activadas con capsaicina 100 nM preparada en solución control (n=19, símbolos negros) y células registradas

cuando la corriente se activó con capsaicina 100 nM en solución con HA-HMW 400 µg/ml (n=18 símbolos rojos).



**Figura 4.28. Efecto del HA-HMW 400 µg/ml sobre la amplitud de las corrientes macroscópicas inducidas por capsaicina 100 nM en células HEK293-TRPV1-EYFP (+).** **A** Promedio de las curvas corriente-voltaje obtenidas en la configuración de célula entera, mostrando la corriente total sin el agonista (símbolos en azul) y la corriente activada por capsaicina 100 nM, en presencia de solución control (símbolos en negro) y en presencia de HA-HMW 400 µg/ml (símbolos en rojo). **B** Promedio de la densidad de corriente medida a + 80 y a - 80 mV, evocada por capsaicina 100 nM en las células registradas en solución control (barras negras) o en células tratadas previamente y perfundidas con HA-HMW 400 µg/ml (barras rojas). **C-D.** Curso temporal de la corriente a V<sub>h</sub> = -60 mV activada por capsaicina 1 µM en presencia de solución extracelular (**C**) o con HA-HMW 400 µg/ml (**D**). **E.** Promedio del máximo de corriente (pA/pF) evocada por capsaicina 1 µM a - 60 mV en solución extracelular (barra negra) o en presencia de HA (barra roja). Escala vertical de registros corresponde a 20 pA/pF y la horizontal a 1 min. Prueba t de Student: n.s. p>0.05; \* p<0.05; \*\* p<0.01.

En la figura 4.28.B se muestra el promedio de la amplitud de las corrientes macroscópicas mediadas por TRPV1 en las células HEK293-TRPV1-EYFP, medida a + 80 mV y a - 80 mV. Se puede observar que el promedio de la densidad de la corriente medida a + 80 mV en respuesta a capsaicina del grupo de células que fueron pre-tratadas y registradas en HA-HMWA, fue significativamente menor

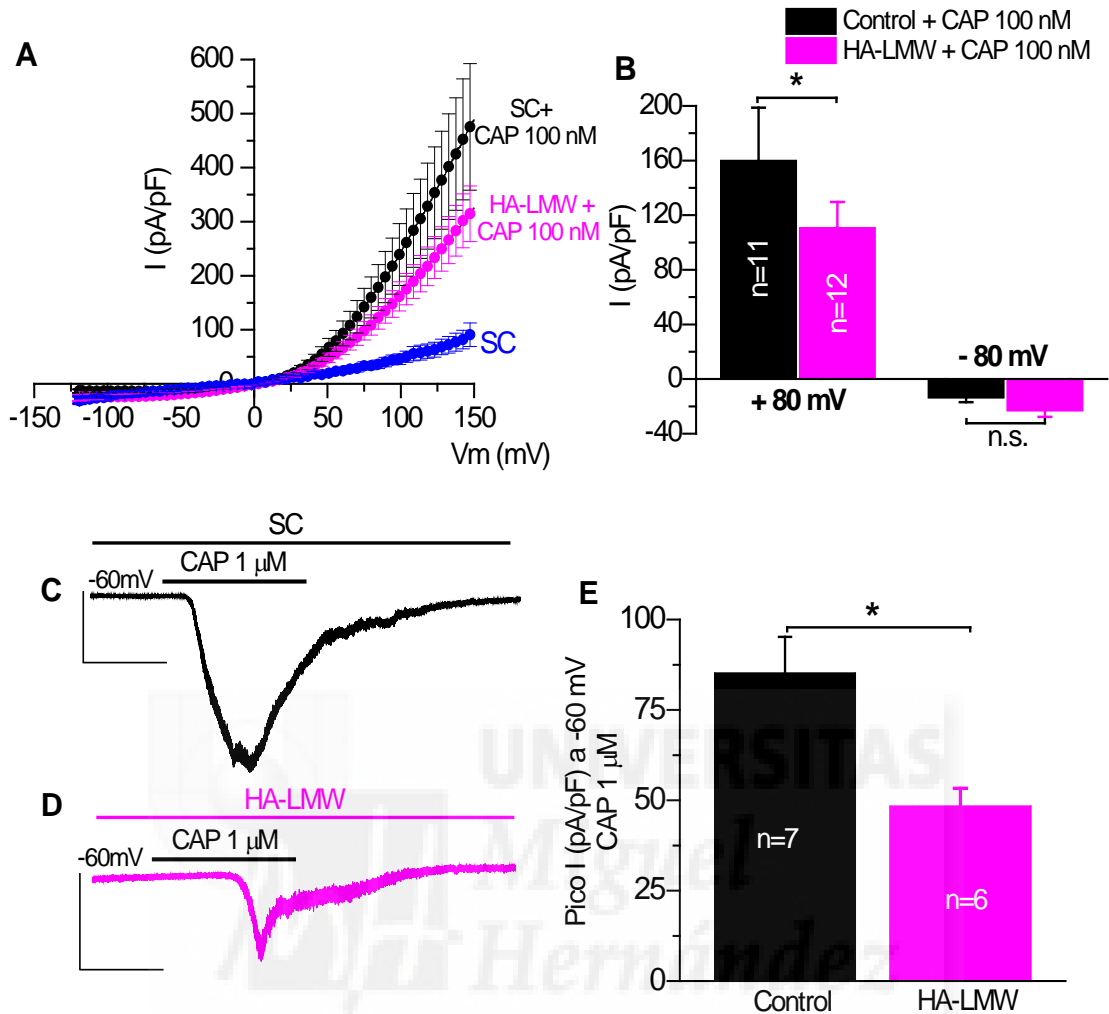
en comparación con el grupo de células registradas en solución control, con una reducción de la amplitud del 70 % en presencia de HA-HMW.

Este efecto inhibitorio en la corriente también se observó a valores fisiológicos de potencial de membrana de las células, como pudo comprobarse en experimentos de registro de *patch-clamp* en la modalidad de fijación de voltaje en célula entera, utilizando células HEK293-TRPV1-EYFP (+) y manteniendo el potencial de membrana a -60 mV. En la figura 4.28.C se muestra un registro de corriente representativo de una célula registrada en solución control que contenía capsaicina 1  $\mu$ M, y en la figura 4.28.D, el registro de una célula representativa previamente incubada y registrada con HA-HMW 400  $\mu$ g/ml durante la aplicación de capsaicina 1  $\mu$ M. Las corrientes macroscópicas evocadas por la aplicación de 1  $\mu$ M de capsaicina mostraron una reducción del 60 % en las células pre-tratadas y registradas con HA-HMW, tal como puede verse en la figura 4.28.E, en la que se muestra la densidad de la corriente. Los resultados que se muestran en este apartado dieron lugar a los resultados expuestos en el artículo que se adjunta, figura 2.

#### **4.5.2 Efecto del HA-LMW 400 $\mu$ g/ml sobre las corrientes macroscópicas del TRPV1 evocadas por capsaicina**

Los experimentos de medida de cambios en la concentración de calcio intracelular en las células SH-SY5Y-TRPV1 tratadas con HA de bajo peso molecular (HA-LMW) habían mostrado una disminución de la respuesta de TRPV1 al estímulo de calor. Por ello se ha estudiado también el efecto del HA-LMW sobre la corriente macroscópica evocada por capsaicina mediante registros electrofisiológicos en los que se siguió el mismo protocolo realizado en el apartado anterior, pero utilizando HA-LMW 400  $\mu$ g/ml (figura 4.29).

En la figura 4.29.A se muestra el promedio de las curvas corriente-voltaje correspondiente a los registros obtenidos en varios grupos de células: células registradas en solución control (n=11, símbolos azules), células activadas con capsaicina 100 nM en solución control (n=11, símbolos negros) y células activadas con capsaicina 100 nM en solución de HA-LMW 400  $\mu$ g/ml (n=12 símbolos rosa).



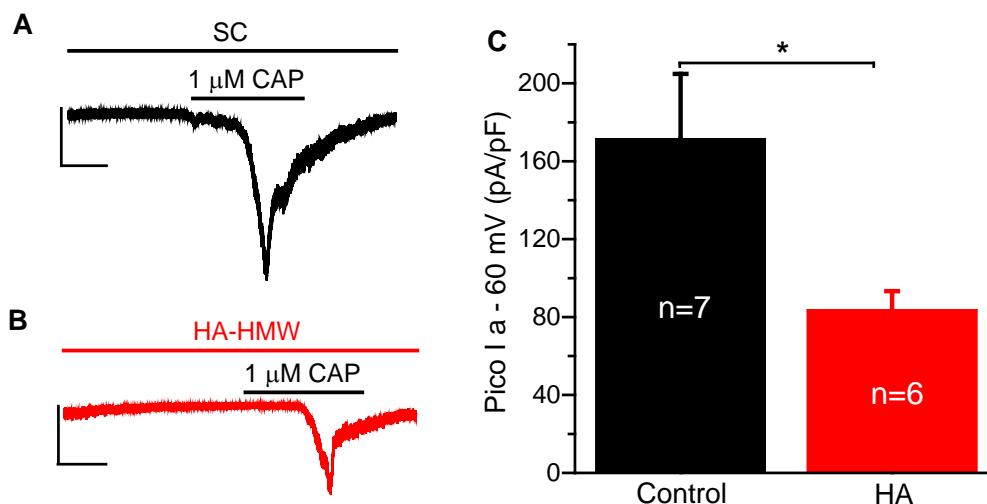
**Figura 4.29. Efecto del HA-LMW 400  $\mu\text{g/ml}$  sobre la amplitud de las corrientes macroscópicas inducidas por capsaicina 100 nM en células HEK293-TRPV1-EYFP (+).** **A** Promedio de las curvas corriente-voltaje obtenidas en la configuración de célula entera, de la corriente total sin agonista (símbolos azules), la corriente activada por capsaicina 100 nM preparada en solución control (símbolos negros) o preparada en HA-LMW 400  $\mu\text{g/ml}$  (símbolos rosa). **B** Promedio de la densidad de corriente evocada por capsaicina 100 nM medida a +80 y -80 mV en solución control (barras negras) o en HA-LMW 400  $\mu\text{g/ml}$  (barras rosa). **C-D.** Curso temporal de la corriente a  $V_h - 60$  mV activada por capsaicina 1  $\mu\text{M}$  en presencia de solución control (**C**) o de HA-LMW 400  $\mu\text{g/ml}$  (**D**). **E.** Promedio del máximo de corriente (pA/pF) evocada por capsaicina 1  $\mu\text{M}$  a -60 mV en solución control (barra negra) o en presencia de HA (barra rosa). Escala vertical de registros corresponde a 40 pA/pF y la horizontal a 1 min. Prueba t de Student: n.s.  $p > 0.05$ ; \*  $p < 0.05$ .

En la figura 4.29.B se muestra el promedio de la amplitud de las corrientes macroscópicas mediadas por TRPV1 en las células HEK293-TRPV1-EYFP (+), medida a +80 mV y a -80 mV, expresada como densidad de corriente. Comparando la densidad de corriente activada por capsaicina 100 nM a +80 mV en solución control o en HA-LMW 400  $\mu\text{g/ml}$ , se observa una reducción

significativa del 37 %, en las células en presencia del polisacárido. Asimismo, la corriente registrada a  $-60$  mV durante la aplicación de capsaicina  $1 \mu\text{M}$  se redujo significativamente en un 44 %, en el grupo de células pre-tratado y registrado con HA-LMW (Figura 4.29.E). Como se puede observar, el HA de bajo peso molecular fue capaz de reducir la corriente de TRPV1 evocada por el vaniloide, pero su efecto fue menor que el observado con el HA de alto peso molecular (apartado de resultados anterior, 4.5.1, figura 4.28).

#### **4.6 La inhibición producida por el HA sobre TRPV1 no se ve afectada por la N-glicosilación del canal.**

El canal iónico TRPV1 presenta una N-glicosilación en la asparagina 604 (N604) cercana al poro del canal. Esta glicosilación se ha encontrado tanto en el canal expresado en sistemas de expresión heterólogos, como en el canal nativo que se expresa en neuronas del ganglio raquídeo (Jahnel et al 2001, Veldhuis et al 2012). Se ha demostrado que la N-glicosilación modifica la desensibilización y la permeabilidad iónica del canal (Veldhuis et al 2012), afectando de esta manera la transducción de la información y consecuentemente la percepción del dolor. Para comprobar si la N-glicosilación en TRPV1 tenía un papel en el efecto inhibitorio del HA sobre el canal, se realizaron registros electrofisiológicos en la modalidad de *patch-clamp*, usando la configuración de célula entera y fijación de voltaje y se compararon las corrientes macroscópicas mediadas por el canal TRPV1 activado por capsaicina  $1 \mu\text{M}$  en células HEK293 transfectadas con TRPV1-EYFP y células HEK293 transfectadas con el TRPV1 modificado, en el que se había cambiado la asparagina 604 por una treonina (N604T-TRPV1-EYFP). Esta modificación se realizó en laboratorio del Dr. Ferrer Montiel (Instituto de Biología Celular y molecular, UMH). Los registros se obtuvieron manteniendo la membrana a un potencial de membrana fijo de  $-60$  mV. Se compararon las corrientes evocadas por la capsaicina  $1 \mu\text{M}$ , medidas en solución control y en presencia de HA-HMW  $400 \mu\text{g/ml}$ , tras una incubación previa de las células en HA, como en protocolos anteriores.



**Figura 4.30 Efecto del HA-HMW 400  $\mu$ g/ml sobre la amplitud máxima de la corriente a -60 mV en células HEK293 transfectadas con N604T-TRPV1-EYFP en respuesta al estímulo capsaicina 1  $\mu$ M. A-B** Trazo de representativo de una célula activada con capsaicina 1  $\mu$ M en preparada en solución control (A) o en HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (B). La escala vertical de los registros corresponde a 40 pA/pF y la horizontal 50 s. **C.** Promedio del máximo de corriente (pA/pF) a -60 mV en respuesta a capsaicina 1  $\mu$ M en solución control (barra negra) y en HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (barra roja). Prueba t de Student: \*  $p < 0.05$ .

En la figura 4.30.A y B, se muestra el registro de una célula representativa de las HEK293-N604T-TRPV1-EYFP (+), respondiendo al estímulo de capsaicina 1  $\mu$ M en solución control (Figura 4.30.A) y en solución de HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (Figura 4.30.B). En la figura 4.30.C se muestra el promedio del pico máximo de la densidad de corriente. Se observan diferencias significativas entre ambos grupos, resultando en una reducción de la amplitud de la corriente del 50 % en el grupo tratado con HA HMW 400  $\mu$ g/ml. Esto implica que la glicosilación no afectó a la inhibición provocada por el HA.

El porcentaje de reducción de la corriente mediada por el canal iónico N604T-TRPV1-EYFP es muy similar al obtenido utilizando el canal TRPV1-EYFP silvestre (el plásmido utilizado en los experimentos anteriores, figura 4.28 y 4.29), con valores del 50 % y 60 %, respectivamente lo que no representa una diferencia significativa en la reducción de la respuesta con HA observada en el canal N604T-TRPV1-EYFP y el canal TRPV1-EYFP (silvestre). Ello sugiere que el sitio de glicosilación en la asparagina 604 no está involucrado en la posible interacción del

HA con el canal iónico TRPV1. Los resultados mostrados en este apartado dieron lugar a los resultados expuestos en el artículo que se adjunta, figura S3.

#### 4.7 Interacción del HA con el canal TRPV1.

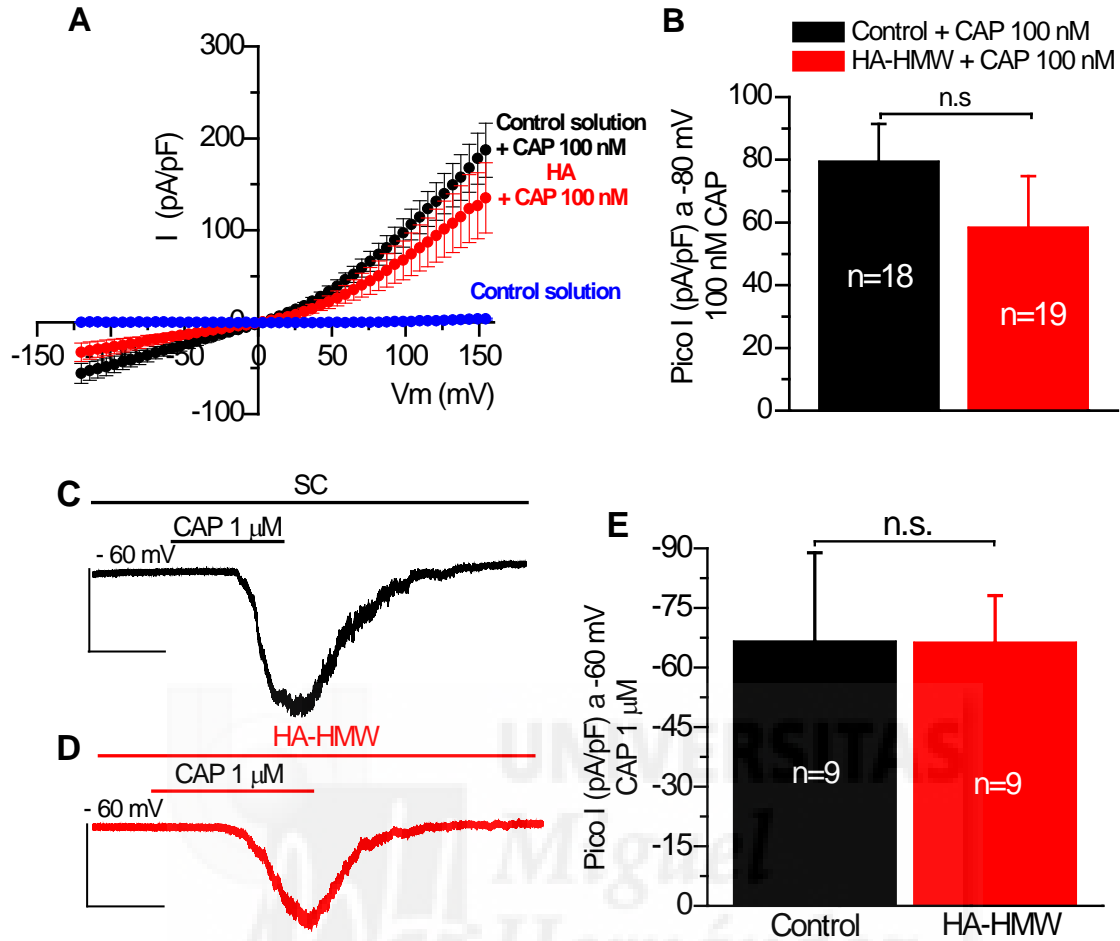
En colaboración con el laboratorio del Dr. Ferrer Montiel (Instituto de Biología Celular y molecular, UMH) se realizaron diferentes aproximaciones bioquímicas para tratar de definir si el efecto inhibitorio del HA sobre la actividad de TRPV1 se debía a una interacción directa o indirecta del HA con el canal.

El HA se une a varias proteínas extracelulares de membrana mediante diferentes dominios de unión “hyaluronan-bindings domains” (Yang et al 1994) y también se une a secuencias cortas que contienen aminoácidos básicos, denominadas “BX<sub>7</sub>B motifs”. Como se describe en el Apéndice III, realizando experimentos *in silico* se halló un sitio con una alta probabilidad de interacción entre el HA y TRPV1, la secuencia **H+xRG**, localizada en el dominio externo del quinto segmento del canal cerca del poro.

Basándose en esta información, se generó un plásmido con el canal TRPV1 mutado (TRPV1-K615A/R617A), en el que se reemplazaron los aminoácidos cargados positivamente, lisina y arginina (K y R, respectivamente), en la secuencia **H+xRG**, por un aminoácido neutro como la alanina (A). Con este plásmido se realizó una co-trasfección junto con el plásmido que codifica para la proteína fluorescente GFP.

A continuación, en las células que eran fluorescentes, se realizaron registros electrofisiológicos de “*patch-clamp*” con fijación de voltaje, en la configuración de célula entera, aplicando rampas de voltaje de - 120 a + 150 mV, siguiendo el mismo protocolo experimental que se había aplicado para el estudio del efecto del HA sobre el canal TRPV1 silvestre (apartado de resultados 4.5).





**Figura 4.31. Efecto del HA-HMW 400  $\mu$ g/ml sobre la amplitud de las corrientes macroscópicas inducidas por capsaicina 100 nM en células HEK293-TRPV1-K615/R617A.** **A.** Promedio de las curvas corriente-voltaje obtenidas en la configuración de célula entera, de la corriente total sin el agonista (símbolos azules) y la corriente activada por capsaicina 100 nM, preparada en solución control (símbolos negros) y preparada en HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (símbolos rojos). **B.** Promedio de la densidad de corriente medida a + 80 evocada por capsaicina 100 nM preparada en solución control (barra negras) o en HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (barra rojas). **C-D.** Ejemplo del curso temporal de la corriente a un valor fijado -60 mV en una célula activada por capsaicina 1  $\mu$ M en solución control (**C**) y de una célula activada por capsaicina preparada en HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (**D**). Escala vertical de los registros es 40 pA/pF y la horizontal 50 s. Prueba t de Student: n.s.  $p > 0.05$ .

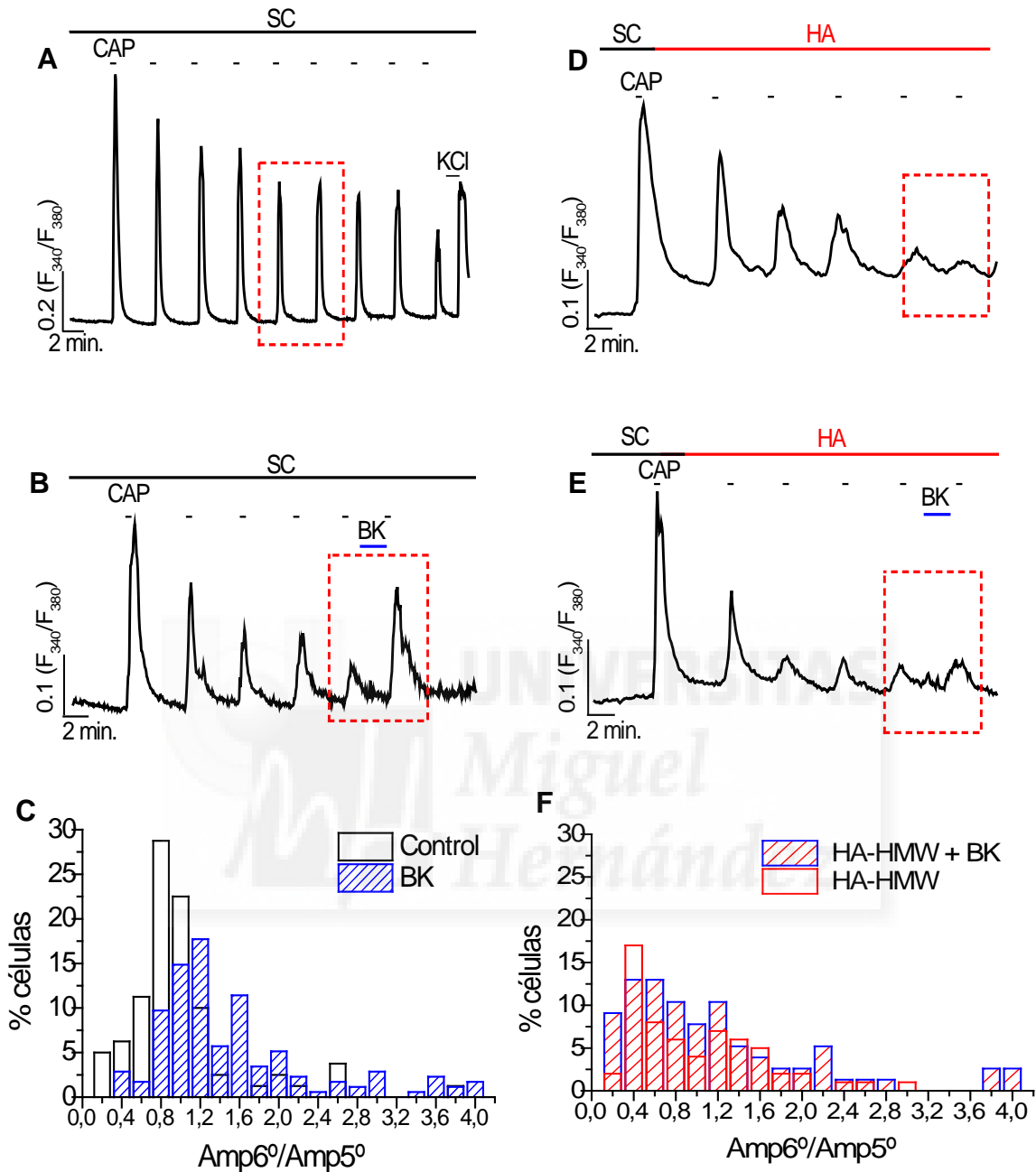
Como se puede observar en la figura 4.31.B, no se encontraron diferencias significativas en la densidad de corriente (pA/pF) a + 80 mV entre el grupo control y el grupo de células tratadas con HA-HMW. Asimismo, el estudio de la corriente a potencial de membrana fisiológico (-60 mV) activando el canal TRPV1 con capsaicina 1  $\mu$ M, no mostró diferencias de respuesta entre el grupo control y el tratado con HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (Figura 4.31.E). En conjunto, los resultados

obtenidos con el canal mutado TRPV1-K615A/R617A, confirman que el HA no tiene ningún efecto sobre las células que expresan el canal TRPV1 mutado, indicando que éste ha perdido su potencial sitio de interacción, lo que apoya la interpretación de que el sitio mutado constituye un punto importante para la interacción entre ambas moléculas. Los resultados que se muestran en este apartado dieron lugar a los resultados mostrados en el artículo que se adjunta, figura 2b-d.

#### **4.8 Efecto del HA sobre la sensibilización del TRPV1 por la bradiquinina en neuronas sensoriales primarias cultivadas.**

Uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria, incluyendo el dolor y la hiperalgesia, es la bradiquinina (BK) (Cesare et al 1999a, Zhang et al 2005). La bradiquinina causa despolarización de los nociceptores y sensibilización de la respuesta a los estímulos térmicos y mecánicos a través del canal TRPV1. Esta acción viene mediada, tanto en condiciones normales como en condiciones de inflamación por el receptor de bradiquinina B2 y la activación de canales TRPV1 ubicados en la membrana plasmática (Cesare & McNaughton 1996, Huang et al 2006).

A la vista de la inhibición producida por el HA sobre el canal TRPV1 observada en los experimentos anteriores, se exploró si el HA podría también prevenir la sensibilización del canal producida por la bradiquinina. Para cuantificar la sensibilización por la BK sobre la respuesta a capsaicina 100 nM del TRPV1, se llevaron a cabo en neuronas disociadas de ganglio raquídeo de ratón, medidas de  $[Ca^{2+}]_i$  empleando el protocolo descrito por Bonnington and McNaughton (2003). Este protocolo consistió en aplicar inicialmente 9 estímulos de capsaicina 100 nM de una duración de 20 segundos a intervalos de 4 minutos (ver figura 4.32.A). Como se mencionó al inicio, la capsaicina provocaba un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  solo en las neuronas que expresan TRPV1.



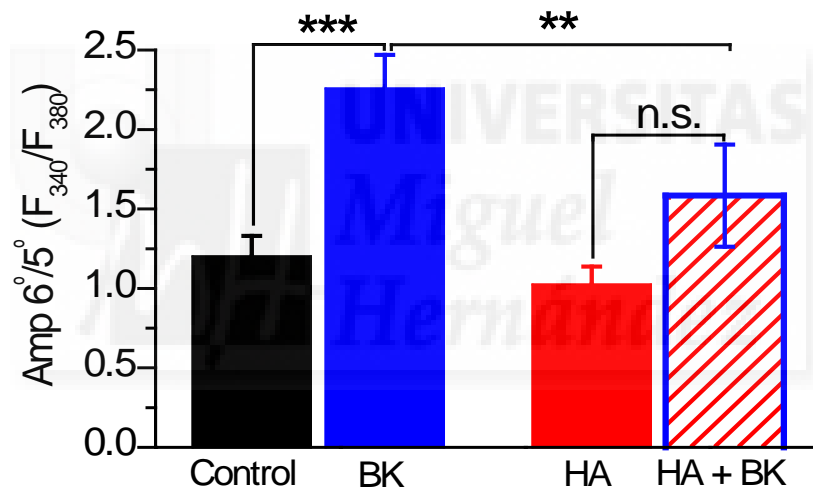
**Figura 4.32. Efecto del HA-HMW 400  $\mu$ g/ml sobre los cambios en  $[Ca^{2+}]_i$  en las respuestas de TRPV1 sensibilizadas por bradiquinina en neuronas sensoriales de DRG provenientes de ratón. A** Trazado obtenido de una neurona representativa que muestra los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a estímulos de capsaicina 100 nM perfundiendo con solución control. **B** Experimento similar al **A** agregando bradiquinina 2  $\mu$ M tras el 5<sup>o</sup> estímulo. **D** perfundiendo con solución de HA-HMW 400  $\mu$ g/ml y **E** experimento similar al **D** agregando bradiquinina 2  $\mu$ M esta vez preparada en HA-HMW 400  $\mu$ g/ml. **C-F** Distribución de frecuencia del cociente entre 6<sup>o</sup>/5<sup>o</sup> estímulo de capsaicina 100 nM en condiciones control (barra negra) y aplicando BK 2  $\mu$ M (barra azul) (**C**), efecto del HA (barra roja) y HA con bradiquinina 2  $\mu$ M (barra azul y rojo) (**F**).

Un grupo de células se registró con solución control, y en ellas la amplitud de las respuestas a estímulos sucesivos con el agonista evidenció la aparición de desensibilización, que se estabilizó normalmente entre el 5° quinto y 6° estímulo con capsaicina 100 nM, tal como se observa en la figura 4.32.A. El valor del cociente entre las amplitudes del 6° y 5° estímulo ( $Amp6^{\circ}/Amp5^{\circ}$ ) se empleó como referencia de la estabilización de la desensibilización (Figura 4.32.C). Para medir el efecto sensibilizador de la bradiquinina (en presencia o no del HA), se aplicó bradiquinina 2  $\mu$ M, 2 min antes de administrar el 6° estímulo, midiéndose la amplitud de las respuestas del 6° estímulo y 5° estímulo (Figura 4.32.C y F). Pudo observarse que la respuesta al 6° estímulo aumentaba claramente con la exposición a bradiquinina (Figura 4.32.B), lo que se tradujo en un valor más alto del cociente ( $Amp6^{\circ}/Amp5^{\circ}$ ) estímulo.

La figura 4.32.C muestra que cuando no se aplicó bradiquinina, las neuronas registradas en solución control muestran una distribución normal de cocientes 6°/5° centrada alrededor de 0.8. En un grupo diferente de neuronas se estudió el efecto del HA empleando el mismo protocolo de estimulación (Figura 4.32.D) pero perfundiendo con la solución de HAHMW 400  $\mu$ g/ml después el 1° estímulo con capsaicina 100 nM (es decir desde el 2° hasta el 6° estímulo). Como muestra la figura 4.32.D se obtuvo la esperada inhibición gradual de la respuesta a capsaicina inducida por el HA.

Finalmente, en otro grupo de neuronas se estudió el efecto de la BK sobre la sensibilización de TRPV1 a capsaicina 100 nM en presencia de HA-HMW 400  $\mu$ g/ml. Como se había hecho en condiciones control, se añadió bradiquinina 2  $\mu$ M durante 2 min antes de aplicar el 6° estímulo, esta vez en presencia de HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (Figura 4.32.B). Bajo éstas condiciones, la sensibilización de la respuesta del canal TRPV1 debida a la aplicación de bradiquinina no fue tan evidente como la observada en situación control. En la figura 4.32.F se representa la distribución del porcentaje de células versus el cociente de las amplitudes de las respuestas obtenidas en el 6° y 5° estímulo ( $Amp6^{\circ}/Amp5^{\circ}$ ), mostrando que bajo las condiciones de HA-HMW 400  $\mu$ g/ml la bradiquinina no llega a tener el efecto de sensibilizador observado en el grupo tratado con solución control.

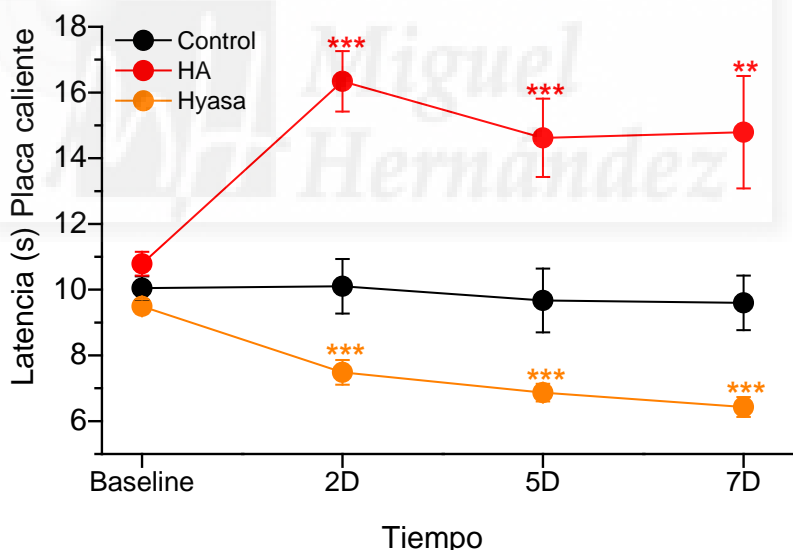
La figura 4.33 resume estos datos, presentando el promedio del cociente  $\text{Amp}6^{\circ}/\text{Amp}5^{\circ}$  en respuesta a capsaicina 100 nM en cada una de las condiciones estudiadas. Se puede observar que efectivamente la BK genera un efecto potenciador sobre la amplitud de la respuesta del canal iónico TRPV1 en presencia de solución control. Sin embargo, en neuronas previamente tratadas con HA el efecto de la BK sobre TRPV1 es mucho menor que en situación control, mantenido la amplitud de la respuesta a valores muy cercanos a los observados con perfusión continua de HA-HMW 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (sin bradiquinina), lo que sugiere que en alguna medida, el HA estaría previniendo la sensibilización generada por éste agente pro-inflamatorio. Los resultados que se muestran en este apartado dieron lugar a los resultados expuestos en el artículo que se adjunta, figura S4.



**Figura 4.33. Resumen del efecto del HA-HMW 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de las respuestas de TRPV1 sensibilizado por bradiquinina en neuronas sensoriales de DRG provenientes de ratón.** Promedio del valor la amplitud del cociente de la respuesta mediada por el canal iónico TRPV1, del 6<sup>to</sup> entre el 5<sup>to</sup> del estímulo de capsaicina 100 nM, en condición control (barra negra, n=101) y en presencia de HA (barra roja, n=80), y luego de la aplicación de bradiquinina en ambas condiciones (barra azul, n=174 y barra con líneas rojas, n=74), respectivamente. Prueba t de Student n.s  $p>0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

## 4.9 Efecto de la inyección de HA sobre la latencia de la respuesta nocifensiva a calor y a capsaicina en ratones despiertos.

Con el objetivo de conocer el efecto del HA sobre las terminales nociceptivas *in vivo*, se estudió la latencia de la primera respuesta nocifensiva en ratones, utilizando el test de la placa caliente ( $52 \pm 0.1$ ) °C. Se determinó el tiempo requerido para evocar la primera respuesta nocifensiva en respuesta al calentamiento de la planta de la pata antes y después de inyectar subcutáneamente diferentes sustancias. Se valoraron como conductas nocidefensivas las siguientes respuestas en el ratón: lamida, mordida, elevación, o sacudida de la pata trasera, e incluso salto, todas ellas consideradas como comportamiento en respuesta al dolor agudo por estímulos nocivos (Barrot 2012).

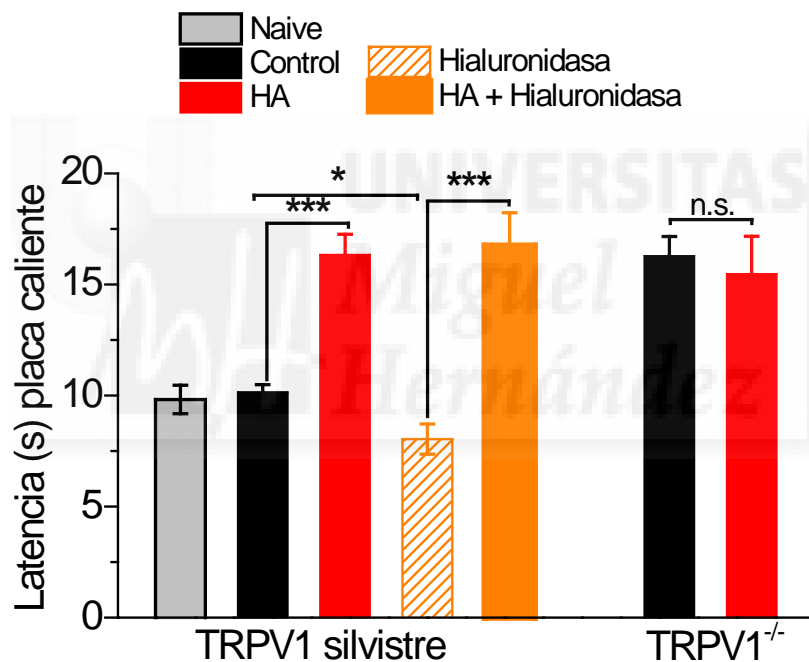


**Figura 4.34.** Curso temporal del efecto de la inyección intra-plantar en la pata trasera de ratones de 10  $\mu$ l de diferentes soluciones, sobre la latencia de la respuestas nocidefensiva en la prueba de la placa caliente. Las medidas se realizaron 2, 5 y 7 días después de la inyección. Símbolos negros, solución salina estéril. Símbolos rojos HA-HMW 400  $\mu$ g/ml. Símbolos naranja hialuronidasa 6 U. Prueba t de Student: n.s.  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Después de realizar la medida de la latencia control (*naive*) para cada ratón, en los animales de los diferentes grupos se inyectó en ambas patas

traseras, 10 µl de diferentes soluciones. Un primer grupo recibió solución salina estéril (control). Otro grupo de animales recibió hialuronidasa (Hyasa, 6 U), enzima que degrada el HA endógeno de la matriz extracelular (ECM). El tercer grupo de animales recibió solución de HA-HMW 400 µg/ml. Se realizaron medidas de la latencia en respuesta al calor producido por la placa caliente 2, 5 y 7 días después de la inyección.

Como se puede observar en la figura 4.34, la destrucción del HA nativo con hialuronidasa, disminuyó el tiempo requerido para que los ratones mostraran una respuesta nociceptiva en comparación con el grupo control, mientras que la inyección de HA-HMW 400 µg/ml aumentó dicha latencia.



**Figura 4.35. Efecto de la inyección intra-plantar en la pata trasera de ratones sobre la latencia a las respuestas nocidéfensivas mediadas por el canal TRPV1, mediante la utilización de la prueba de la placa caliente.** Promedio de la latencia a la primera respuesta nocifensiva en ratones silvestres y ratones TRPV1<sup>-/-</sup> luego de recibir una inyección intra-plantar en la pata trasera izquierda de 10 µl de solución salino estéril (barra negra), de 10 µl de HA (barra roja), de 10 µl de hialuronidasa 6 U (barra líneas naranja) o una primera inyección de 10 µl de hialuronidasa seguido por otra inyección de 10 µl de HA 5 días después (barra naranja). La barra gris representa el promedio del grupo *naive*, el cual no recibió ninguna inyección. El número de animales utilizados en el grupo silvestre: n = 6, 25, 12, 11 y 7, y en el grupo TRPV1<sup>-/-</sup>: n = 25, 18. Prueba t de Student: n.s. p > 0.05; \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001

Adicionalmente, y con el fin de conocer si la inyección intra-plantar de HA sería capaz de tener un efecto antagonista sobre el efecto obtenido en animales previamente inyectados con hialuronidasa, en los que teóricamente se había destruido el HA nativo alrededor de las terminaciones nociceptoras, se estudió la latencia en ratones previamente inyectados con 10  $\mu$ l de hialuronidasa (6 U). A un grupo de ratones se les inyectó hialuronidasa, y 5 días después se les inyectó 10  $\mu$ l de HA-HMW 400  $\mu$ g/ml y se realizó el test 2 días después de la inyección del polisacárido. En la figura 4.35, se muestran los valores promedio de las latencias en las diferentes condiciones.

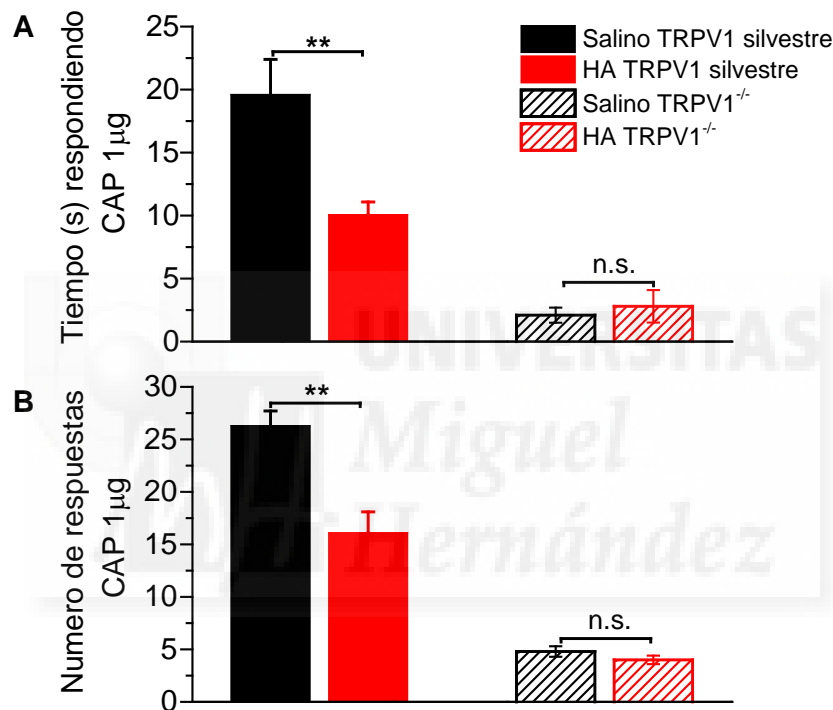
Como se puede ver en la figura 4.35, la inyección de HA-HMW a los animales previamente tratados con hialuronidasa (barra naranja) aumentó la latencia al estímulo nocivo de 8 a 16 s, recuperando valores de latencia similares a los de los animales tratados únicamente con HA. Como control de estos experimentos se realizó el mismo estudio en ratones TRPV1<sup>-/-</sup>, que no expresan TRPV1, y que no muestran respuestas a los compuestos vaniloides como la capsaicina, y además sus respuestas a calor nocivo se ve dañada (Caterina et al 2000, Davis et al 2000).

Por otro lado, se exploró si el efecto del HA sobre las respuestas del TRPV1 a capsaicina podía también observarse *in vivo*. Para ello se llevaron a cabo experimentos con animales a los que se realizó el test de la capsaicina, inyectando en la pata trasera izquierda 10  $\mu$ l de capsaicina (1  $\mu$ g) y registrando el tiempo en el que el ratón muestra respuestas nocidéfensivas, así como el número de éstas respuestas en una ventana de tiempo de 3 minutos (Figura 4.36). El grupo tratado había recibido dos días antes una inyección en la pata trasera izquierda 10  $\mu$ l de HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (n=8) o 10  $\mu$ l de salino estéril (n=7).

Como se puede observar en la figura 4.36, el grupo de animales que había sido tratado con HA mostró respuestas nocidéfensivas durante un tiempo más corto (51 % menor que en los animales en los que se inyectó salino estéril) (Figura 4.36.A). Igualmente, el número de respuestas se redujo en un 60 % en el grupo tratado con HA (figura 4.36.B). Como control de éstos experimentos se realizó el mismo estudio en animales nulos para el canal TRPV1, y tal como puede



observarse en figura 4.36, A y B (barras con líneas diagonales), estos ratones no mostraron diferencias significativas en las respuestas evocadas por la inyección de capsaicina en ninguna circunstancia. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el HA-HMW reduce la sensibilidad de las terminaciones nociceptoras a los estímulos nocivos traducidos por los canales iónicos TRPV1. Los resultados conductuales mostrados en este apartado dieron lugar a los resultados expuestos en el artículo que se adjunta, figura 5a y S5 A-B.



**Figura 4.36. Efecto del HA-HMW 400 µg/ml sobre la inyección intra-plantar de capsaicina sobre las respuestas nociceptivas mediadas por el canal TRPV1. A.** Promedio del tiempo (s) durante el cual el ratón permanece mostrando respuestas nociceptivas tras la inyección intra-plantar de 10 µl de capsaicina en la pata trasera izquierda (CAP) 1 µg. **B.** Promedio del número de respuestas nociceptivas realizadas luego de la inyección de intra-plantar capsaicina (CAP) 1 µg. Ambas graficas muestran los resultados obtenidos en animales previamente inyectados (48 h antes) con solución salina (barras negras) o con HA (barras rojas) en ratones silvestres. El grupo TRPV1<sup>-/-</sup> (n=4) se muestra con las barras de rayas. El número de animales silvestres utilizados: control, n=7 y HA, n=8. Prueba t de Student: n.s. p>0.05; \*\* p<0.01.

## 4.10 Efecto del HA sobre el canal TRPA1 en sistemas de expresión heterólogos y en neuronas sensoriales primarias.

Con el fin de determinar el grado de especificidad del HA sobre los canales TRPV1, se estudió el posible efecto del HA sobre otros canales iónicos miembros de la familia de los TRPs, como es el canal TRPA1. Como se ha mencionado anteriormente, el canal iónico TRPA1 es un canal implicado en nocicepción y asociado también al dolor y la inflamación.

Tipo celular	Estimulo ( $\mu\text{M}$ )	SC	HA-HMW 400 $\mu\text{g/ml}$	Efecto
CHO-mTRPA1	CA 50	2.02 $\pm$ 0.05 (n= 55)	2.36 $\pm$ 0.05 (n= 61) ***	Aumento 17%
Neuronas DRG	CA 50	0.35 $\pm$ 0.04 (n= 32)	0.31 $\pm$ 0.02 (n= 38) <sup>N.S</sup>	No efecto
HEK293-hTRPA1-GFP	AITC 20	0.72 $\pm$ 0.02 (n= 81)	0.63 $\pm$ 0.02 (n= 102) **	Reducción 13%
CHO-mTRPA1	AITC 20 $\mu\text{M}$	1.6 $\pm$ 0.1 (n= 141)	1.2 $\pm$ 0.1 (n= 177) **	Reducción 25%
HEK293-hTRPA1-GFP	Nif 10 $\mu\text{M}$	1.1 $\pm$ 0.1 (n= 325)	1.2 $\pm$ 0.1 (n= 331) <sup>N.S</sup>	No efecto
Neuronas DRG	Nif 10 $\mu\text{M}$	0.19 $\pm$ 0.01 (n= 96)	0.19 $\pm$ 0.01 (n= 81) <sup>N.S.</sup>	No efecto
CHO-mTRPA1	Frio	0.20 $\pm$ 0.01 (n=298)	0.19 $\pm$ 0.01 (n=442) <sup>N.S.</sup>	No efecto

**Tabla 4.12 Efecto del HA HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  sobre el canal iónico TRPA1 expresado en sistemas heterólogos y en neuronas sensoriales de ratón.** Resultados de diferentes experimentos realizados sobre el canal iónico TRPA1, el cual fue activado por diferentes estímulos, tales como: cinemaldehído (CA), alil-isotiocianato (AITC), nifedipina (NIF) o frío. Prueba t de Student: n.s  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

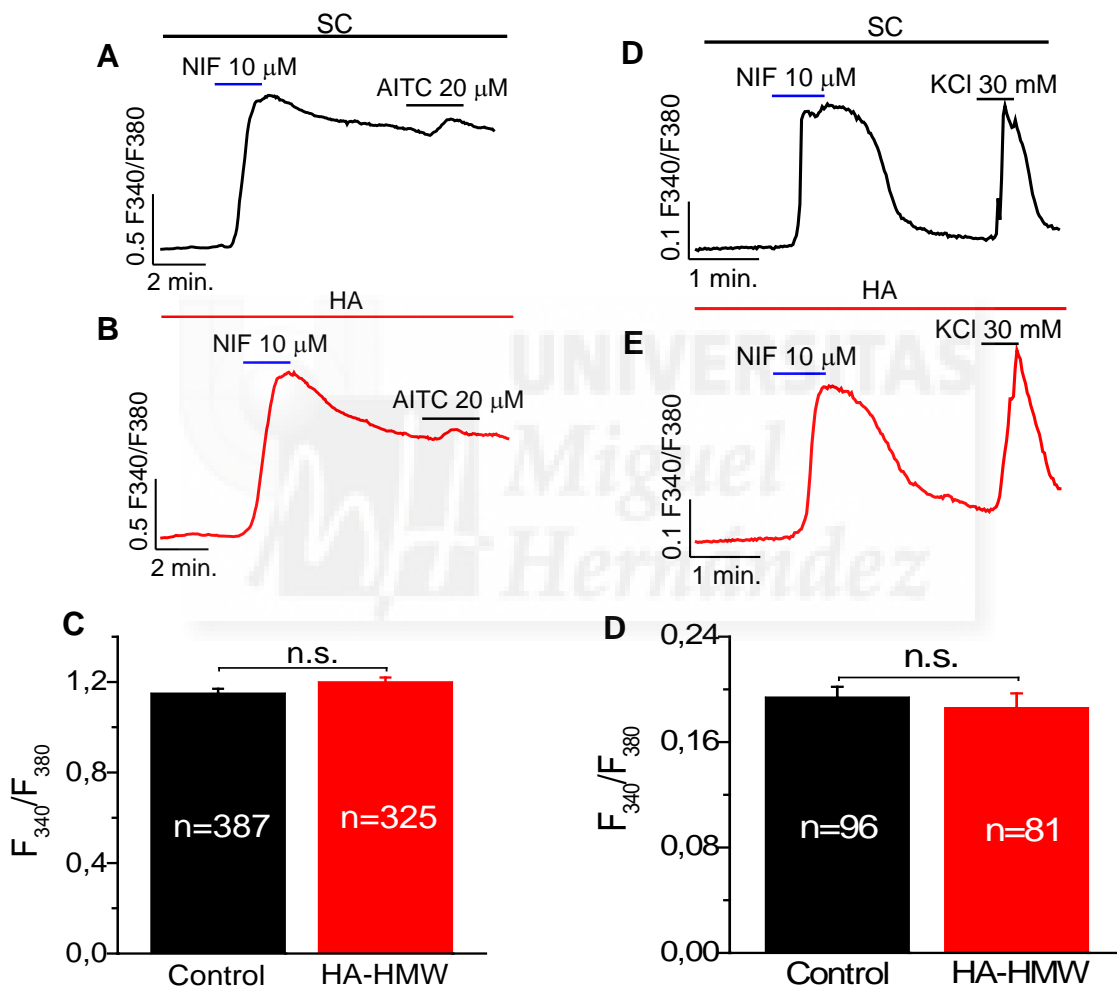
Para estudiar el posible efecto del HA-HMW 400 µg/ml sobre el canal TRPA1 se realizaron experimentos de imagen de calcio similares a los efectuados para TRPV1, en los que se midió la amplitud de la respuesta al agonista a través del incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . En este estudio se utilizaron diferentes tipos celulares y diferentes agonistas debido a que se observó de partida mucha variabilidad en las respuestas.

Se emplearon células HEK293 transfectadas transitoriamente con el plásmido hTRPA1-GFP, la línea estable de células CHO-mTRPA1 y también neuronas sensoriales primarias dissociadas, obtenidas de ganglios raquídeos de ratón adulto y neuronas del ganglio nodoso de ratón adulto, todas cargadas previamente con FURA-2AM. Se realizaron experimentos perfundiendo con alguno de los agonistas ensayados, en solución control o en solución de HA-HMW 400 µg/ml; en este último caso las células habían sido pre-tratadas con HA (30-60 minutos a 37 °C y a 5 % CO<sub>2</sub>).

Como agonistas se utilizaron cinemaldehído (CA) 50 µM, allil-isotiocianato (AITC) 20 µM y nifedipina 10 µM. En la tabla 4.12, se muestran los resultados obtenidos con cada uno de ellos. Como puede observarse, se encontró mucha variabilidad en la respuesta a cinemaldehído (CA) 50 µM y allil-isotiocianato (AITC) 20 µM. La figura 4.37 recoge además los resultados obtenidos utilizando la nifedipina 10 µM en células HEK293-hTRPA1-GFP y en neuronas en cultivo de DRG, registradas con la solución control o en HA-HMW 400 µg/ml. Los resultados presentados en la tabla 4.12, dan lugar a los resultados mostrados en el artículo adjunto, tabla 2 de Información suplementaria (S-tabla 2).

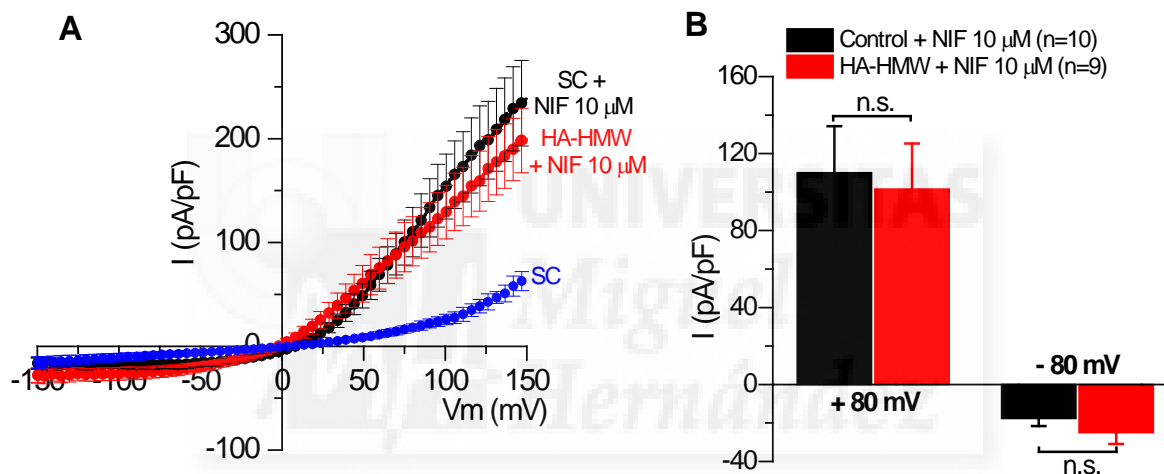
En la figura 4.37 A y B, se muestra el registro obtenido en cada condición de una célula HEK293-hTRPA1-GFP representativa. En C se representa el valor medio de la amplitud de respuesta al agonista, mostrando que ésta no se modifica por la exposición a HA ya que la amplitud de la respuesta a nifedipina es igual en el grupo control (n=387) y el grupo tratado con HA (n=331) ( $1.2 \pm 0.02$  y  $1.2 \pm 0.02$ , respectivamente). Tampoco hubo diferencias en el número de células que respondieron al estímulo (no se muestra el dato). En la figura 4.37.D, E y F se muestra el resultado obtenido en neuronas de DRG cultivadas. El valor medio de

amplitud de la respuesta a 10  $\mu\text{M}$  de nifedipina en las neuronas TRPA1 positivas, no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con HA, como puede verse en la figura 4.37.F. De igual modo, no hubo diferencias en el número de neuronas que respondieron al agonista de TRPA1 entre el grupo control y el tratado con HA. En todos los casos se aplicó AITC para asegurar que las neuronas expresaban TRPA1. Estos resultados dieron lugar a los resultados mostrados en el artículo adjunto, figura S A-B.



**Figura 4.37. Efecto del HA-HMW 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de las respuestas del canal TRPA1 activado por nifedipina 10  $\mu\text{M}$  en células HEK293-TRPA1-GFP y en neuronas sensoriales de ganglio raquídeo de ratón. A-B** Célula HEK293-TRPA1-GFP activada por nifedipina 10  $\mu\text{M}$  en presencia de solución control (A) y en HA (B). **D-E.** Neurona de DRG de ratón activada con nifedipina 10  $\mu\text{M}$  en presencia de solución control (D) o de HA (E). **C-F.** Promedio de la amplitud de la respuesta ( $\Delta F_{340}/F_{380}$ ) a nifedipina 10  $\mu\text{M}$  en solución control (barras negras) o en solución de HA (barras rojas), en células HEK293-hTRPA1-GFP (C) y en neuronas de DRG (F). Prueba t de Student, n.s.  $p > 0.05$ .

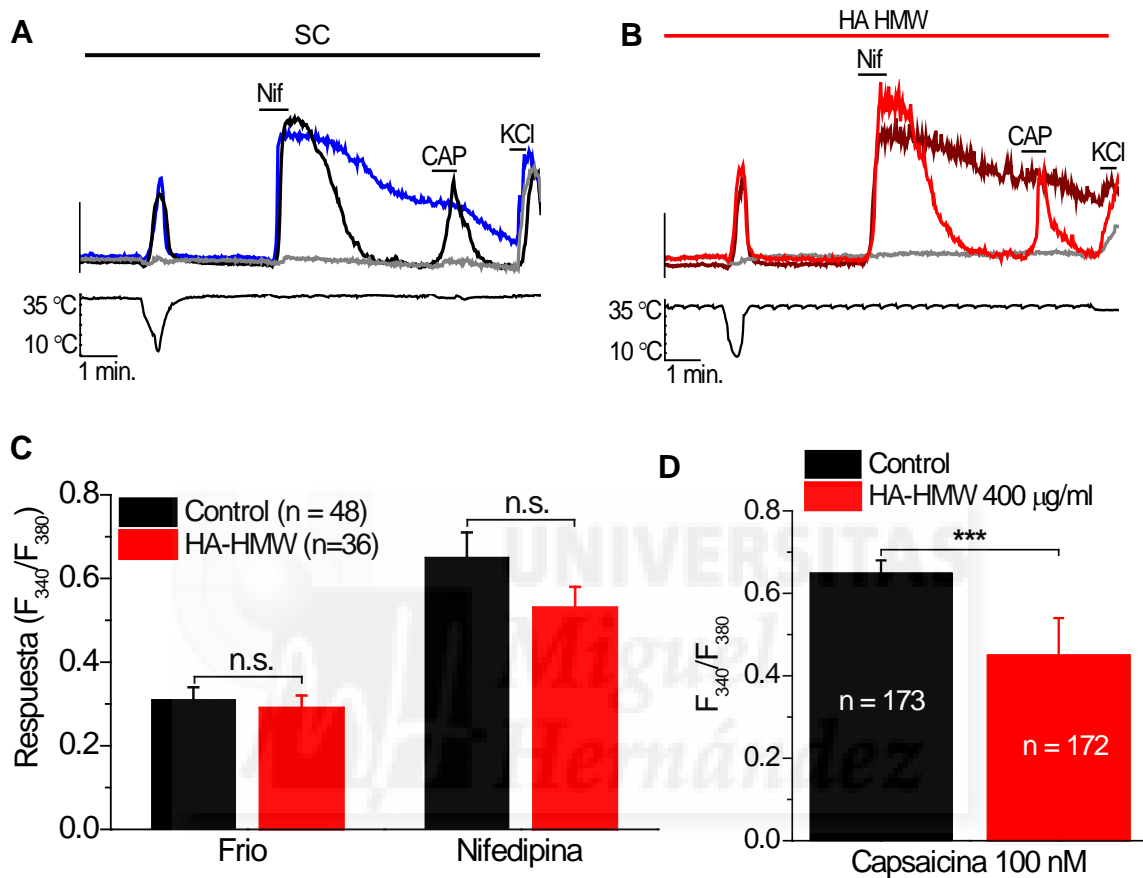
También se realizaron registros electrofisiológicos en células HEK293-hTRPA1-GFP, utilizando la nifedipina 10  $\mu\text{M}$  como agonista, con solución control o con solución HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$ . Los registros se realizaron en la modalidad de *patch-clamp* en la configuración de célula entera en fijación de voltaje (-60 mV), aplicando rampas desde -150mV a +150mV, cada 3 segundos. Como puede verse en la figura 4.38, no se observaron diferencias significativas en la amplitud de la corriente (pA/pF) activada por nifedipina 10  $\mu\text{M}$ , analizada a + 80 y - 80 mV, entre los dos grupos, control y HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$ , confirmando los resultados obtenidos en imagen de calcio.



**Figura 4.38. Efecto del HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  sobre la amplitud de las corrientes macroscópicas inducidas por nifedipina 10  $\mu\text{M}$  en células HEK293-hTRPA1-GFP. A** Promedio de las curvas corriente-voltaje obtenidas en la configuración de célula entera, de la corriente total sin el agonista (símbolos azules) y la corriente activada por nifedipina 10  $\mu\text{M}$ , en presencia de solución extracelular (símbolos negros) y en presencia de HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  (símbolos rojos). **B** Promedio de la densidad de corriente medida a + 80 y -80 mV, evocada por nifedipina 10  $\mu\text{M}$  en presencia de solución extracelular (barras negras, n=10) o de HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  (barras rojas, n=9). Prueba t de Student: n.s.  $p>0.05$ .

Como control positivo, se decidió realizar experimentos de imagen de calcio en células en las que se pudiera medir en el mismo experimento el efecto del HA-HMW sobre TRPA1 y sobre TRPV1, para confirmar que el HA-HMW modulaba la respuesta del canal iónico TRPV1 y no la del canal TRPA1. Para estos experimentos se utilizaron neuronas dissociadas del ganglio nodoso de ratón, en las cuales se expresa una variedad amplia de canales termosensibles, incluyendo

TRPV1 y TRPA1 (Ni et al 2006, Zhang et al 2004). Además, en las neuronas del nodoso la expresión de TRPA1 es mayor (30 - 50 %) en comparación con las de ganglio raquídeo (Fajardo et al 2008).



**Figura 4.39** Efecto del HA-HMW 400 µg/ml sobre los cambios en  $[Ca^{2+}]_i$  evocadas por activación del canal TRPA1 por nifedipina 10 µM, capsaicina 100 nM y frío, en neuronas disociadas de ganglio nodoso de ratón. **A-B.** Trazos representativos de neuronas de ganglio nodoso de ratón activadas con frío (10 °C), nifedipina 10 µM, capsaicina 100 nM y KCl 30 mM en solución control (**A**) y en HA-HMW 400 µg/ml (**B**). Promedio de la amplitud de la respuesta  $[Ca^{2+}]_i$  evocada por los estímulos de frío (10 °C), nifedipina 10 µM y capsaicina 100 nM en condiciones control (barras negras) y tras exposición a HA (barras rojas). **C.** Promedio de la amplitud de la respuesta en neuronas que habían respondido al estímulo de frío y de nifedipina. **D.** Promedio de la amplitud de la respuesta al estímulo con capsaicina 100 nM. La escala vertical corresponde a 0.4  $F_{340}/F_{380}$ . Prueba t de Student; n.s.  $p > 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Al igual que en experimentos anteriores, las neuronas fueron previamente incubadas en solución control o en solución de HA-HMW 400 µg/ml, aplicando luego la siguiente batería de estímulos: frío, nifedipina 10 µM y capsaicina 100 nM. Antes de finalizar el registro se aplicó KCl 30 mM para distinguir las células excitables de las no excitables, como se ha mencionado en puntos anteriores.

Analizando las neuronas que respondieron al estímulo de temperatura (10 °C) y al agonista de TRPA1 (nifedipina 10 µM), se pudo observar que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  evocado por cada uno de los estímulos aplicados, fue similar en el grupo control (n=48) y en el grupo tratado con HA-HMW 400 µg/ml (n=36), tal como se puede observar en la figura 4.39.C.

Está descrito por otros autores que el canal TRPV1 se expresa en las mismas neuronas del nodoso que expresan TRPA1. Por tanto, se analizaron las respuestas a capsaicina 100 nM en esas neuronas del nodoso confirmando que en ellas el HA inhibía la respuesta de TRPV1. Se obtuvieron diferencias significativas en la amplitud de la respuesta del grupo tratado con HA (n=172) en comparación con el grupo control (n=173) (Figura 4.39.D). Los resultados que se muestran en este apartado dieron lugar a los resultados mostrados en el artículo que se adjunta, figura S6 C-D.

En la tabla 4.13 se resumen los datos obtenidos en el estudio con el canal TRPA1 en las neuronas sensoriales:

	Neuronas de ganglio Nodoso - Amplitud promedio ( $F_{340}/F_{380}$ )		
	Frío	Nifedipina 10 µM	Capsaicina 100 nM
<b>S. Control</b>	0.31 ± 0.03	0.68 ± 0.06	0.65 ± 0.03
<b>HA-HMW</b>	0.30 ± 0.04	0.55 ± 0.06	0.45 ± 0.09
Test t de Student	N.S.	N.S.	***

**Tabla 4.13.** Resumen de los valores de amplitud de la respuesta evocada por frío, nifedipina 10 µM y capsaicina 100 nM en neuronas de ganglio nodoso de ratón, en solución control (SC) o en solución de HA-HMW 400 µg/ml. Prueba t de Student, n.s p>0.05; \*\*\*: p<0.001.

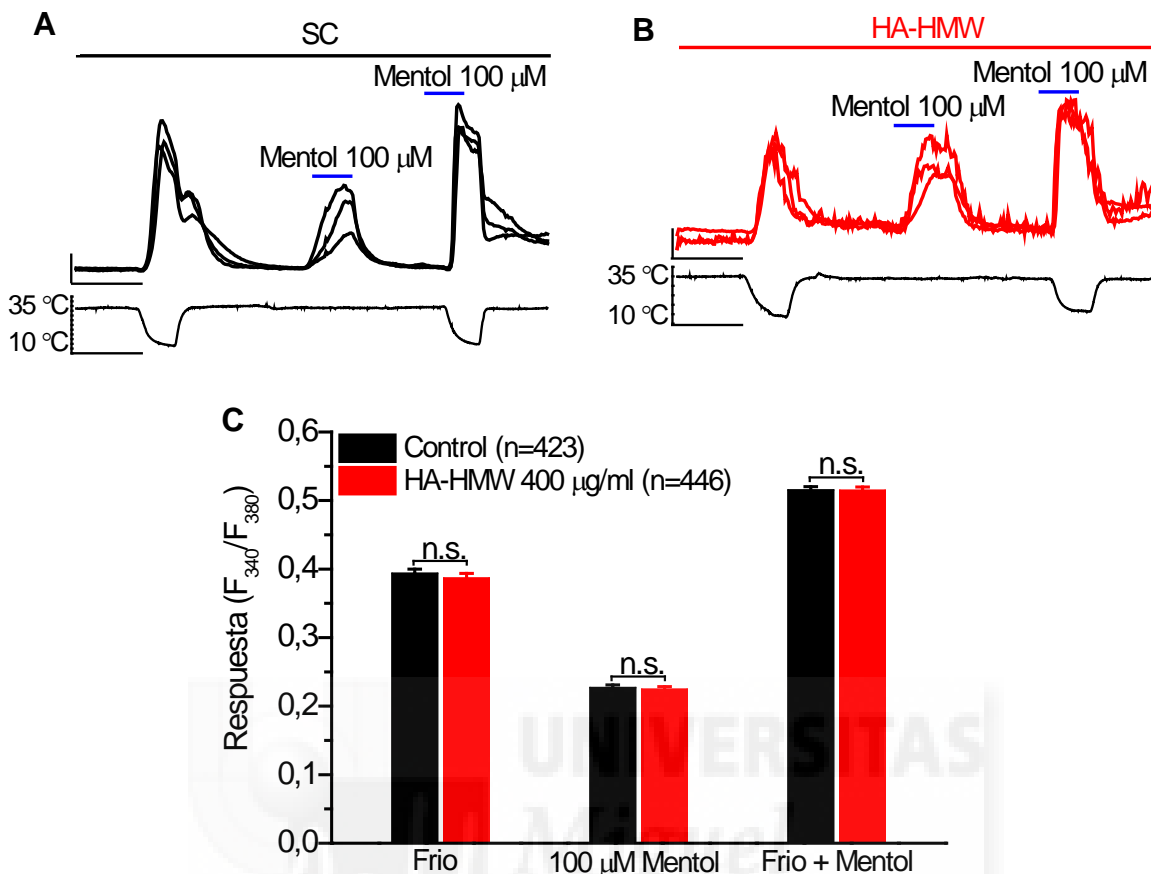
#### **4.11 Efecto del HA sobre el canal TRPM8 activado por frío y por mentol, en sistemas de expresión heterólogos y neuronas sensoriales primarias.**

Continuando con el estudio de la especificidad del efecto del HA sobre el canal TRPV1, se estudió el efecto del HA sobre las respuestas del canal TRPM8 a frío y a mentol. El canal iónico TRPM8 es una canal termosensible perteneciente a la familia de los TRP, presente en neuronas sensoriales primarias y esencial para la detección de frío moderado (Bautista et al 2007, Colburn et al 2007, Dhaka et al 2008). Se utilizó la línea celular estable HEK293-mTRPM8-YFP o neuronas sensoriales cultivadas durante 24 horas, obtenidas del ganglio raquídeo de ratones adultos. Mediante imagen de calcio se determinó en estas células el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a un estímulo de frío (rampa de 35 °C a 10 °C), a mentol 100  $\mu$ M y por último a frío junto con mentol, mientras se perfundía con solución control o en presencia de HA-HMWA.

En la figura 4.40 se muestra el protocolo seguido para las células HEK293-mTRPM8-YFP. Al igual que en experimentos anteriores, se realizó una pre-incubación en solución control o en solución con HA-HMW 400  $\mu$ g/ml durante 30 – 60 minutos, a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> (Figura 4.40 A y B).

Como se resume en la figura 4.40.C, no hubo diferencias en la amplitud promedio de la respuesta ( $F_{340}/F_{380}$ ) al estímulo de frío de las células HEK293-mTRPM8-YFP entre el grupo tratado con HA-HMW 400  $\mu$ g/ml (n=446) y el grupo control (n=423). Tampoco hubo diferencias entre el grupo control y el tratado con HA en la respuesta evocada por la aplicación de mentol 100  $\mu$ M, ni en la respuesta por la aplicación conjunta de frío y mentol 100  $\mu$ M. En la tabla 4.14 se resumen los datos obtenidos en las células HEK293-mTRPM8-YFP.



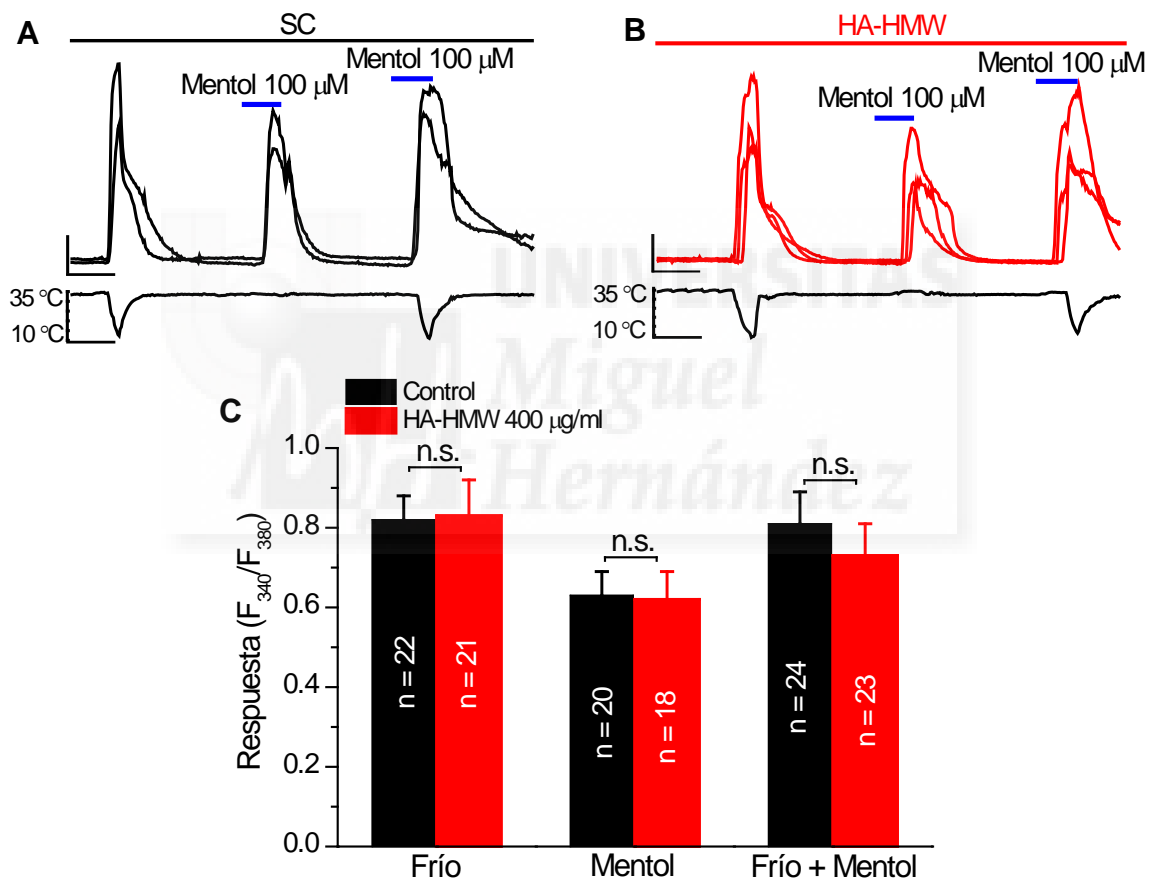


**Figura 4.40.** Efecto del HA-HMW 400 µg/ml sobre los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  por activación por frío y mentol del canal TRPM8 en células HEK293-mTRPM8-YFP. **A** Ejemplo del curso temporal de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta al estímulo de frío, mentol 100 µM y frío + mentol 100 µM en tres células HEK293-TRPM8-YFP pre-tratadas y perfundidas con solución control. **B** Ejemplo del curso temporal de las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta al estímulo de frío, mentol 100 µM y frío + mentol 100 µM en tres células HEK293-TRPM8-YFP pre-tratadas y perfundidas con HA HMW 400 µg/ml. **C** Promedio de la amplitud de la respuesta a los estímulos aplicados, en el grupo control (barras negras) y con HA (barras rojas). En los registros la escala vertical corresponde a 0.1  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal a 1 min. Prueba t de Student, n.s.  $p > 0.05$ .

	Células HEK293-mTRPM8-YFP - Amplitud promedio ( $F_{340}/F_{380}$ )		
	Frío	Mentol 100 µM	Frío + Mentol 100 µM
<b>S. Control</b>	0.39 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.52 ± 0.01
<b>HA-HMW</b>	0.39 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.51 ± 0.01
Test t de Student	N.S.	N.S.	N.S.

**Tabla 4.14.** Resumen de la amplitud de la respuesta evocada por frío, nifedipina 10 µM y capsaicina 100 nM en células HEK293-mTRPM8-YFP, en solución control (SC) o en solución de HA-HMW 400 µg/ml. Prueba t de Student, n.s.  $p > 0.05$ .

Cuando se realizó el mismo abordaje experimental, pero esta vez empleando neuronas sensoriales primarias de ganglio raquídeo, para estudiar el efecto del HA sobre canal iónico TRPM8 expresado de forma nativa, no se observó ningún efecto del HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  sobre las respuestas a frío, mentol y frío aplicado con mentol (Figura 4.41). En la tabla 4.15 se resumen los resultados obtenidos con TRPM8 en las neuronas cultivadas de DRG de ratón. Los resultados que se muestran en este apartado dieron lugar a los resultados que se muestran en el artículo adjunto, figura S6 E-F.



**Figura 4.41. Efecto del HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$  sobre los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  evocados por activación del canal TRPM8 por frío o mentol en neuronas de DRG. A.** Ejemplo del curso temporal de las variaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta al estímulo de frío, mentol 100  $\mu\text{M}$  y frío + mentol 100  $\mu\text{M}$  en tres neuronas de DRG en solución control. **B.** Ejemplo del curso temporal de las variaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta al estímulo de frío, mentol 100  $\mu\text{M}$  y frío + mentol 100  $\mu\text{M}$  en tres neuronas de DRG pre-tratadas y perfundidas con solución de HA-HMW 400  $\mu\text{g/ml}$ . **C.** Valor medio de la amplitud de la respuesta a los estímulos aplicados en condición control (barras negras) y con HA (barras rojas). La escala vertical de los registros corresponde a 0.4  $F_{340}/F_{380}$  y la horizontal a 1 min. Prueba t de Student, n.s.:  $p > 0.05$ .

<b>Neuronas DRG TRPM8 positivas - Amplitud promedio (<math>F_{340}/F_{380}</math>)</b>			
	<b>Frío</b>	<b>Mentol 100 <math>\mu</math>M</b>	<b>Frío + Mentol 100 <math>\mu</math>M</b>
<b>S. control</b>	0.83 $\pm$ 0.09 (n=21)	0.63 $\pm$ 0.06 (n=20)	0.81 $\pm$ 0.08 (n=24)
<b>HA-HMW</b>	0.82 $\pm$ 0.06 (n=22)	0.62 $\pm$ 0.07 (n=18)	0.73 $\pm$ 0.08 (n=23)
T de Student	N.S.	N.S.	N.S.

**Tabla 4.15.** Resumen de la amplitud de la respuesta evocada por frío, mentol 100  $\mu$ M y frío + mentol 100  $\mu$ M en cultivos de neuronas de DRG de ratón, en solución control (SC) o en solución de HA-HMW 400  $\mu$ g/ml. Prueba t de Student, n.s.,  $p > 0.05$ .

De estos resultados sobre el efecto del HA sobre el canal iónico TRPM8, puede concluirse que, en las condiciones estudiadas, el HA no tiene efecto sobre la actividad del canal TRPM8.



## 5. Discusión

El tratamiento intra-articular con HA de alto peso molecular (HA-HMW) en pacientes con osteoartritis (OA) reduce el dolor (Altman & Moskowitz 1998, Dixon et al 1988). Los estudios previos del grupo investigador con el que he desarrollado mi tesis doctoral, muestran también que el HA inyectado en la articulación de la rodilla en gato, rata y cobaya reduce la actividad de las fibras nerviosas que la inervan, en respuesta a estímulos mecánicos nocivos (Gomis et al 2004, Pozo et al 1997) y también que el HA es capaz de reducir la actividad de los canales mecanosensibles en ovocitos (De la Peña et al 2002). Sin embargo, el mecanismo por el cual el HA ejerce este efecto analgésico tras su inyección intra-articular es aún desconocido. La hipótesis prevalente hasta la ejecución del presente estudio era que el HA de alto peso molecular presente en las articulaciones, reducía la transmisión a las terminaciones nerviosas articulares de las fuerzas mecánicas desencadenadas por el movimiento y la fuerza gravitatoria, gracias a sus particulares propiedades viscoelásticas que le permiten actuar como un filtro elástico o viscoso en función de la frecuencia del estímulo. Así pues, la eficacia del HA se entendía como basada en su capacidad de reducir la magnitud del estímulo que llega a las terminaciones nerviosas articulares, sin interferir de modo directo sobre éstas.

La inyección intra-articular de HA de alto peso molecular, conseguiría, al restaurar las propiedades reológicas del líquido sinovial, amortiguar la intensidad de las fuerzas mecánicas que actúan sobre las distintas estructuras que componen las articulaciones, además de lubricarlas, lo que evitaría el rozamiento entre las superficies en contacto dentro de la articulación (Balazs 2004). Como se ha comentado en la introducción, en los casos de OA, las moléculas de HA presentes en el líquido sinovial tienen un menor tamaño, lo que determina una menor elasto-viscosidad (Bothner & Wik 1987). La inyección intra-articular con HA-HMW permite restaurar las condiciones bioquímicas y reológicas del HA propias de una articulación sana.

En este trabajo se utilizó inicialmente dos tipos de HA, uno de alto peso molecular y otro de bajo peso molecular a distintas concentraciones, estudiando TRPV1 activado con calor (48 °C). Se encontró un mayor efecto inhibitorio cuando se utilizó el HA de alto peso molecular (HA-HMW) a una concentración de 400 µg/ml y 800 µg/ml. Se utilizó para el estudio HA-HMW 400 µg/ml por ser más fácil trabajar con esta solución por su viscosidad. Cuando se registraron las corrientes macroscópicas con HA-HMW y HA-LMW a 400 µg/ml, estimulando con capsaicina, se obtuvieron resultados similares, siendo el efecto inhibitorio del HA a 400 µg/ml mayor con el HA-HMW.

La principal aportación de este trabajo ha sido el descubrimiento de que el HA de alto peso molecular reduce de modo directo la actividad el canal iónico TRPV1, desvelando el mecanismo molecular por el que tal efecto tiene lugar. Ello permite entender mejor la reducción del dolor articular por el HA en la osteoartritis, ya que además de su efecto de filtro mecánico, el HA disminuye la excitabilidad de los canales TRPV1 presentes en las terminaciones nociceptoras articulares, reduciendo su sensibilización por los mediadores de la inflamación liberados por la lesión articular.

Además, el TRPV1 es un canal iónico que participa en procesos dolorosos en otros muchos tejidos y constituye por ello, una diana importante para nuevos fármacos (Fernández-Ballester et al 2011). El presente estudio aporta una novedosa posibilidad de modular la actividad del canal a través de la reducción de su probabilidad de apertura por efecto del HA u otras moléculas que lleven a cabo un efecto similar al de esta sustancia.

## **5.1 Efecto Inhibitorio del HA sobre TRPV1**

En este estudio se muestra que el efecto inhibitorio del HA sobre TRPV1 tiene lugar tanto en células en cultivo en las que se sobre-expresó TRPV1, como en su entorno nativo, en las neuronas sensoriales primarias (neuronas en cultivo de ganglio raquídeo y nodoso).

La apertura del canal TRPV1 genera un flujo de entrada de cationes hacia el interior de la célula a favor del gradiente electroquímico, con una preferencia por

los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . En consecuencia, uno de los abordajes que se empleó para medir su actividad y la modificación de ésta por el HA-HMW, fue el análisis del cambio en la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) evocado por estímulos nocivos específicos del canal, tales como el calor (48 °C), el pH 4.1 o la capsaicina. Todos estos estímulos activan el canal TRPV1, por lo que se le conoce a este canal como polimodal.

La amplitud de las respuestas a estímulos repetidos de calor (48 °C) o capsaicina, evocadas en condición control por TRPV1, disminuyeron con los estímulos aplicados, fenómeno conocido como desensibilización o taquifilaxia (Caterina et al 1997, Tominaga et al 1998, Vellani et al 2001). Hay que tener en cuenta que en las neuronas sensoriales, este aumento en la concentración del calcio intracelular refleja el flujo general del catión divalente hacia adentro de la célula a través de la membrana plasmática, tanto a través del canal TRPV1 como de los canales de calcio voltaje-dependientes, lo cuales son activados por la despolarización generada por la apertura de TRPV1. El presente trabajo muestra que el HA es capaz de reducir significativamente la respuesta de calcio evocada por la apertura del canal TRPV1 por el calor, capsaicina o  $\text{H}^+$ . Los resultados de los experimentos de imagen de calcio prueban además que, en las neuronas sensoriales, la disminución de la entrada de calcio inducida por esos estímulos producida por el HA, se debe a una inhibición directa de TRPV1 y no de los canales  $\text{Ca}_v$ . Los datos que conducen a esta conclusión son: i) el HA no reduce el cambio en la concentración de calcio intracelular producida por la despolarización mediante aplicación de 30 mM KCl en solución control, y ii) en los experimentos de canal único se observa una disminución en la probabilidad de apertura del canal TRPV1 en presencia de HA (Figura 3, artículo adjunto). En cuanto a la inhibición de la respuesta a capsaicina hay que tener en cuenta que si bien las neuronas del DRG expresan canales TRPV1 tanto en la membrana plasmática como en la membrana del retículo endoplásmico, y que en ambos casos la aplicación de capsaicina produce aumentos de calcio en el citoplasma (Gallego-Sandin et al 2009), la concentración de capsaicina necesaria para activar los canales del retículo se encuentra entre 1-50  $\mu\text{M}$ , concentración mucho mayor a la utilizada en

este estudio, por ello puede concluirse que el efecto del HA tiene lugar sobre los canales TRPV1 presentes en la membrana plasmática.

Finalmente, cuando se analizaron los umbrales de activación por temperatura se observó que el HA modifica la respuesta del canal evocada por calor, pero el umbral de activación se mantenía igual en el grupo control y en el grupo con HA en las neuronas de ganglio raquídeo de ratones silvestres así como de los animales nulos para el canal TRPV1 (ver tabla suplementaria 1, artículo anexo).

En este trabajo también se muestra que el efecto inhibitorio del HA sobre TRPV1 se produce independientemente del estado en el que se encuentre el canal: desensibilizado por estimulación repetitiva (experimentos en los que se ha aplicado el estímulo de calor cuatro o nueve veces), o sensibilizado por la aplicación del agente pro-inflamatorio bradiquinina.

También se observa que el efecto inhibitorio del HA es independiente de la naturaleza del estímulo y que la inhibición del TRPV1 por HA se produce igualmente aunque sea activado con estímulos que ejercen su acción sobre diferentes sitios del canal. Así, se observó que el efecto inhibitorio en la respuesta al calor, estímulo que está descrito tiene lugar en aminoácidos localizados en los lazos extracelulares del canal (S5-P-S6) y en los segmentos transmembrana S5 y S6 (Szolcsanyi & Sandor 2012), también ocurre sobre la respuesta a capsaicina, sustancia liposoluble que activa al canal desde el lado intracelular, y finalmente, también tiene lugar sobre la respuesta evocada por pH 4.1, a pesar de que el sitio de acción de los protones se encuentra principalmente en el *loop* extracelular (S5-P-S6), con un par de sitios también en la parte intracelular del canal (Szolcsanyi & Sandor 2012). Todo esto permite pensar que el HA estaría actuando desde el lado extracelular, ya que estos activadores de TRPV1 tienen su sitio de acción principal en la cara externa del canal. Adicionalmente y teniendo en cuenta el gran tamaño de la molécula de HA, es más posible que dicha molécula actúe desde el lado externo, ya que no puede entrar a la célula para llevar a cabo su acción sobre el comportamiento del canal.

## 5.2 Mecanismo de acción del HA sobre TRPV1

El HA es una molécula compleja y de gran tamaño implicada en diversas funciones celulares mediadas por los distintos tipos de interacciones que dicho polisacárido puede tener con proteínas de membrana u otros GAGs de la ECM (Morgelin et al 1994). Se pueden plantear diversas alternativas para intentar explicar el mecanismo por el que el HA inhibe la actividad del canal iónico TRPV1, determinadas por las características propias del HA como la visco-elasticidad del polisacárido o su naturaleza aniónica, aunque hay que considerar también la posibilidad de algún tipo de unión específica.

Ahondando en la hipótesis de que la inhibición pudiese ser consecuencia de la visco-elasticidad del HA, éste, por sus propiedades reológicas, podría estar limitando la accesibilidad del estímulo activador (calor, capsaicina o pH ácido) a los canales transductores del estímulo, en este caso el canal TRPV1. Este efecto podría explicar sin duda la reducción observada en la actividad de los canales mecanosensibles en presencia de HA de alto peso molecular por atenuación de la transmisión de las fuerzas mecánicas. Experimentos realizados previamente en el laboratorio, donde demostraron mediante estudios *in vitro* en ovocitos que los canales mecanosensibles activados por estiramiento reducían su respuestas en presencia de soluciones visco-elásticas de alto peso molecular (De la Peña et al 2002). Igualmente, Gomis. A y colaboradores demostraron en experimentos con ratas anestesiadas, que la actividad de las terminales nociceptivas de la articulación de la rodilla activadas por el movimiento, disminuye en presencia de líquido sinovial rico en HA de alto peso molecular (Gomis et al 2004). Estos estudios son consistentes con la hipótesis planteada, sin embargo, hace difícil explicar la reducción de las respuestas evocadas por TRPV1 activado por calor observadas en este estudio, ya que la conductividad térmica en los aumentos de temperatura durante los estímulos de calor, es similar en la solución control (300 mOsm y pH 7.4) y en la solución de HA-HMWA 400 µg/ml (300 mOsm y pH 7.4). Asimismo, en los registros presentados en el artículo adjunto (Figura 3) en los que se estudiaba el efecto del HA en canal único en células HEK293-TRPV1-EYFP, se aplicaba capsaicina, la cual se encontraba dentro de la pipeta de manera



constante, tanto con la solución control como con la solución de HA-HMW, y el canal TRPV1 se activaba en ambos casos, aunque disminuyera su probabilidad de apertura. Esto habla en contra de una menor accesibilidad de la capsaicina al canal TRPV1.

Dada la naturaleza aniónica del HA, se podría pensar que su efecto inhibitorio sobre TRPV1, resulta de una interacción electrostática entre el HA y el TRPV1. Así, este polisacárido que está cargado negativamente, podría modificar el potencial de la superficie de la membrana plasmática, cambiando el voltaje de apertura del canal (Hille 2001) y desplazando la  $V_{1/2}$  a valores más altos, tal como ocurre con algunos otros canales TRP, como es el caso de los antagonistas SKF96365 y BCTC para el canal TRPM8, y el frío para el canal TRPA1 (Karashima et al 2009, Malkia et al 2007). Sin embargo, esta hipótesis quedó descartada, como se muestra en el artículo adjunto, con el análisis de ajuste de las curvas corriente–voltaje con la ecuación lineal de Boltzmann (Nilius et al 2006). En estos resultados, obtenidos en células HEK293-TRPV1-EYFP, se muestra que el HA no modifica el voltaje necesario para alcanzar el 50 % de la conductancia del canal ( $V_{1/2}$ ), ni tampoco la valencia del sensor de voltaje del canal ( $Z_g$ ), mientras que sí reduce la conductancia máxima del canal al 50 %.

Finalmente, en el presente trabajo se sugiere que el mecanismo que podría explicar de manera más adecuada el efecto del HA sobre la reducción de las respuestas del canal iónico TRPV1, es mediante la unión de manera específica entre TRPV1 y HA, que modularía la apertura del canal. Un mecanismo análogo de modulación del canal por interacción directa con el polisacárido, se ha observado con algunos vaniloides y toxinas que actúan sobre el canal TRPV1. Por ejemplo, la toxina de tarántula DkTx, se une a TRPV1 en los residuos del módulo de permeabilidad en S5-P-S6, anclándose al canal en su estado abierto. Es de destacar que los componentes proteicos de TRPV1 son conformacionalmente dinámicos y contribuyen directamente a la apertura del canal (Bohlen et al 2010).

El análisis de los resultados de electrofisiología en la configuración de canal único (Figura 3, artículo anexo), permite pensar que la inhibición del canal TRPV1 por el HA estaría mediada por la estabilización del canal en su estado cerrado. En

la publicación anexa (Figura 3) se muestra que, en presencia de HA, el canal permanece más tiempo en los estados cerrados de mayor duración, y que son éstos estados cerrados de mayor duración los que contribuyen en mayor proporción al estado cerrado general del canal en presencia de HA-HMW 400 µg/ml, confirmando la hipótesis de la estabilización del estado cerrado del canal. El efecto estabilizador del estado cerrado del canal ha sido señalado anteriormente para explicar los efectos de otras sustancias como los “tetra-amonios”: tetraetilamonio, tetrapropilamonio, tetrabutilamonio y tetrapentilamonio, que se ha visto que bloquean el canal TRPV1 por el lado intracelular, estabilizando al canal en su estado abierto, pero en este caso de forma voltaje-dependiente (Jara-Oseguera et al 2008). Un mecanismo de bloqueo similar ha sido propuesto para explicar la actividad inhibitoria de un anticuerpo policlonal sobre TRPV1, el cual se une al *loop* antes del poro, estabilizando los estados cerrados del canal, bloqueando la activación del canal por diferentes estímulos, como pH ácido, calor y capsaicina (Klionsky et al 2006). Se ha demostrado que hasta once anticuerpos se unen cerca del poro en diferentes canales iónicos, modificando su actividad (TRPV1, TRPC1, TRPC5, TRPM3, Kv1.2, Kv3.1, Eag1, Nav1.5, Cav2.1, Cav2.2) (Naylor 2009). El incremento en el número de eventos cerrados de larga duración provocados por HA-HMW, propone un mecanismo posible y apropiado para explicar la reducción de la probabilidad de apertura del canal y con ello, la reducción de las respuestas de TRPV1 ante los estímulos que lo activan.

### **5.3 Interacción del HA y TRPV1**

Mediante aproximaciones bioquímicas se intentó inmunoprecipitar el HA junto con TRPV1. Para ello en el laboratorio del Dr. Ferrer-Montiel se utilizaron células HEK293 transfectadas con TRPV1-EYFP que fueron tratadas con la solución de HA-HMW para luego biotinar el HA. Sin embargo, en estos experimentos no se consiguió una buena inmunoprecipitación, ya que si bien alguno de ellos sugerían que HA y TRPV1 inmuprecipitaban juntos, no se logró una respuesta consistente. La explicación de ello sería que la unión HA-TRPV1 es una unión electrostática débil, por lo que los lavados experimentales eliminarían

con facilidad esta interacción. No obstante, esto no parece encajar con la observación (apartado de resultados, sección 4.2.1, Figura 4.24) de que el efecto inhibitorio del HA sobre TRPV1 se mantuvo pesar de lavar prolongadamente con solución control. Hay que destacar que en los experimentos se utilizó HA de alto peso molecular, moléculas muy largas que permiten la interacción entre cada molécula de HA con otras adyacentes, o con distintos canales TRPV1 expresados en diferentes partes de la membrana, y por tanto establecer una red entrelazada que permitiría estabilizar aún más el canal en su estado cerrado. Sin embargo, en nuestros experimentos bioquímicos, las limitaciones experimentales no nos permitieron utilizar moléculas largas, lo que obligó a emplear una molécula de HA pequeña (tetrascárido de HA).

Adicionalmente y utilizando HA unido a fluoresceína, se intentó visualizar la unión del HA al canal TRPV1, pero no se logró ver diferencias entre las células controles y las que sobre-expresaban TRPV1 (datos no mostrados). Esto probablemente se debió a que la membrana celular tiene moléculas de HA con las que interaccionan las del HA agregado experimentalmente, ya que es usual que las moléculas de HA establezcan entre sí enlaces por puente de hidrógeno.

Como se describe en el artículo que se adjunta, los análisis de acoplamiento *in silico* realizados en el laboratorio del Dr. Ferrer-Montiel, evidenciaron que existe una alta probabilidad de interacción electrostática entre el HA y una secuencia corta, cargada positivamente y localizada en el el *loop* extracelular S5-P-S6 de TRPV1. Esta secuencia corta está formada por los siguientes aminoácidos: **HK+RG** (Figura 6, artículo anexo). La secuencia EDGKNNSLPMESTPHKCRGSACKP se solapa con la región que contiene el epítipo de unión de los anticuerpos policlonales como se comentó anteriormente, y que son capaces de modificar la actividad del canal TRPV1 (Klionsky et al 2006). Esto apoya la posibilidad de un mecanismo común para el bloqueo de TRPV1 producido por el HA y por anticuerpos policlonales, e identifica además una región esencial para la modulación del canal iónico. Vale la pena señalar que la secuencia **HK+RG** se conserva en diferentes especies tales como rata, ratón,

caballo y lo que es más interesante, en la especie humana (Figura 6a, artículo anexo).

Este mismo análisis, fue realizado también para el canal TRPA1 por el laboratorio del Dr. Ferrer-Montiel, donde no se identificó una región específica con probabilidad de interacción con el HA, y tampoco se encontró una secuencia de aminoácidos similar a la anteriormente descrita para TRPV1 (Figura 6a, artículo adjunto). Estas observaciones son consistente con los datos experimentales obtenidos en nuestro trabajo, demostrando que el HA no tiene efecto alguno sobre TRPA1.

Un modelo estructural propuesto por Cao y colaboradores para los estados abiertos y cerrados de TRPV1 (Cao et al 2013), sugiere que la parte más externa del poro (S5-P-S6) es conformacionalmente dinámica y contribuye de forma directa a la apertura del canal. Cuando TRPV1 es activado, la hélice del poro se desplaza y ocurre un reajuste en el *loop* del poro más externo que permite la apertura del canal. Con este modelo, y a la vista de los resultados mostrados en el presente trabajo, se sugiere para el efecto modulador del HA sobre TRPV1, un mecanismo similar al descrito por Cao y cols. De acuerdo con éste, el polímero podría inmovilizar el *loop* más externo del poro, impidiendo su cambio conformacional y evitando de esta manera el movimiento asociado que necesita la hélice del poro para abrir la puerta externa, bloqueando así el canal en el estado cerrado. Tal bloqueo evitaría el flujo de iones hacia el interior de la célula, dando así lugar a una disminución de las respuestas evocadas por activación de TRPV1.

Teniendo en cuenta también la magnitud de la molécula de HA es posible también que ésta interactúe simultáneamente con distintas regiones de los dominios extracelulares (S5-P-S6) de las subunidades adyacentes, e incluso de otros canales TRPV1 que se encuentren cerca, conectando entre sí a los canales. Esta agrupación de canales, formaría una compleja red o agregados macromoleculares en la superficie de la membrana, que promoverían la inhibición del canal TRPV1 (Lainez et al 2010).

Finalmente, los datos electrofisiológicos obtenidos en las células HEK293 transfectadas con el canal TRPV1 mutado (TRPV1- K615A/R617A), en el que los

aminoácidos K y R de la secuencia **HK+RG** del *loop* extracelular S5-P-S6, fueron sustituidos por A, aminoácido sin carga, confirman que esta región es importante para la interacción entre HA y TRPV1, debido a que el HA no tuvo efecto sobre las células que expresaban el canal TRPV1 mutado, supuestamente al no poder interactuar con TRPV1. Así pues, los resultados funcionales junto con el análisis *in silico* presentados en este trabajo, aportan evidencia de una interacción entre HA y TRPV1 capaz de modular la actividad del canal.

## **5.4 Comparación del efecto producido por el HA-LMW y el HA-HMW sobre TRPV1**

Los resultados obtenidos en la línea celular SH-SY5Y-TRPV1 sugieren un efecto de inhibitorio del HA sobre las respuestas del canal iónico TRPV1 activado por calor, tanto con el polisacárido de bajo peso molecular (LMW-HA) como con el de alto peso molecular (HMW-HA). En las concentraciones estudiadas se comenzó a ver un efecto significativo a partir de los 20 minutos de exposición en HA, siendo este efecto más robusto en todas las concentraciones utilizadas, luego de los 30 minutos de exposición. Analizando los dos HA utilizados de acuerdo a su peso molecular, se observó un efecto inhibitorio que fue mayor cuando se utilizó el HA-HMW, y con éste HA, las respuestas a calor evocadas por TRPV1 fueron menores cuando se empleó la concentración de 400 µg/ml.

El efecto del HA-HMW muestra una correlación entre la concentración de HA y su efecto inhibitorio sobre las respuestas de Ca<sup>2+</sup> evocadas por TRPV1 activado por calor (IC<sub>50</sub>: 135 ± 3 µg/ml, artículo anexo). Por otro lado, el estudio del HA en neuronas de DRG, sugiere un efecto más robusto con el HA-HMW en comparación con el LMW, así como un mayor efecto con la concentración de 400 µg/ml, que a las otras dos concentraciones estudiadas, confirmando los resultados obtenidos en la línea celular SH-SY5Y-TRPV1. A diferencia del HA-HMW, algunos estudios han sugerido un efecto contrario para moléculas de HA de pequeño tamaño (Babasola et al 2014), ya que su presencia promueve la activación de citoquinas pro-inflamatorias, efecto contrario al observado por el HA-HMW, el cual reduce las respuestas nocidéfensivas evocadas por TRPV1.

Los experimentos de comportamiento mostraron también un efecto inhibitorio significativo por parte del HA-HMW en la reducción de las respuestas nocidéfensivas evocadas por el canal TRPV1 por la activación del canal mediante calor (test de la placa caliente) así como por capsaicina, en los animales silvestres; mientras que en los animales nulos para TRPV1 no hubo efecto del HA sobre la respuesta dolorosa al estímulo de calor. En este caso no se realizaron experimentos con HA-LMW.

Con estos resultados, se demuestra que TRPV1 es un “target” para la molécula de HA, aportando evidencia de que en presencia de HA-HMW el canal iónico TRPV1 reduce su capacidad de respuesta ante el estímulo nocivo y disminuye su probabilidad de apertura, reduciendo de esta manera la excitabilidad de las terminales nerviosas nociceptivas periféricas. Todo esto sugiere que el HA es capaz de modular la actividad del canal iónico TRPV1. Por el contrario, la actividad de los canales TRPA1 y TRPM8 no se vio afectada por la presencia del HA. Por tanto, esta inhibición indica que este constituyente tan importante de la ECM, el hialuronato sódico (HA), juega un papel estabilizador sobre los canales TRPV1, modulando su excitabilidad en las neuronas que expresan dicho canal.

## **5.5 Significado funcional del efecto del HA sobre TRPV1**

Los canales TRPV1 están implicados en una variedad de funciones fisiológicas y se encuentran ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central y periférico, así como en tejidos no nerviosos (Birder et al 2002, Cavanaugh et al 2011, Inoue et al 2002). En el sistema nervioso periférico, el canal TRPV1 es principalmente un detector molecular de estímulos térmicos y químicos, a los que convierte en señales eléctricas despolarizantes en las terminaciones de las neuronas sensoriales en las que se expresa, generando una descarga de impulsos nerviosos propagados que acaban produciendo sensaciones de dolor. El dolor que aparece en patologías como la osteoartritis (OA), es la principal causa de discapacidad física en los pacientes que padecen esta enfermedad (Zhang et al 2010). Existen estudios que demuestran una

relación directa entre la expresión de TRPV1 y el dolor en las articulaciones en la osteoartritis crónica en humanos (Valdes et al 2011).

Como ya se ha mencionado, desde hace años se vienen empleando las inyecciones intra-articulares de HA para reducir el dolor de la OA en humanos (Bellamy et al 2006, Modawal et al 2005, Moreland 2003b, Pozo et al 1997). El artículo que se adjunta muestra que el HA-HMW inyectado intra-articularmente, reduce gradualmente la descarga de impulsos nerviosos en los nervios que inervan la articulación de la rodilla en respuesta a estímulos dolorosos (Figura 5d, artículo anexo). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se sugiere que el HA del líquido sinovial juega un papel importante en la modulación de la actividad de las fibras nociceptivas de la articulación, además de actuar como un amortiguador mecánico. De ese modo, el HA-HMW del líquido sinovial intacto, además de reducir la magnitud de los estímulos mecánicos, modularía la actividad del canal TRPV1 y disminuiría la excitabilidad de los nociceptores, y cuando es inyectado intra-articularmente en circunstancias patológicas en las que el HA se ha degradado, restauraría las propiedades del líquido sinovial sano. Si se tiene en cuenta que el efecto inhibitorio se observaba también sobre los canales TRPV1 sensibilizados por un agente pro-inflamatorio, como la bradiquinina, no es arriesgado concluir que la acción del HA sobre TRPV1 contribuye a los efectos anti-nociceptivos de las inyecciones intra-articulares de HA y abre nuevas posibilidades terapéuticas del HA en otros tejidos.

Se ha sugerido que el tratamiento con sustancias antagonistas de TRPA1 atenúa en ratas la hiperalgesia que aparece en la osteoartritis (OA) inducida por monoyodoacetato. Esto sugiere que este canal iónico contribuye a la génesis del dolor presente en dicha patología (McGaraughty et al 2010, Okun et al 2012). Por otra parte, nuestros resultados con HA y TRPA1, han puesto en evidencia la incapacidad del HA para reducir la actividad de TRPA1, posiblemente por carecer de una zona de interacción para la unión de HA al canal iónico como la encontrada para TRPV1. Así pues, el efecto analgésico directo del HA sobre las terminaciones nociceptoras articulares quedaría restringido al canal TRPV1, que constituiría una

diana terapéutica para la acción del HA, que disminuiría la actividad nociceptora periférica a través de una reducción de su probabilidad de apertura.







## 6. Conclusiones

1. El HA de alto peso molecular (HA-HMW), un componente mayoritario de la matriz extracelular y del líquido sinovial de las articulaciones sanas, disminuye las respuestas celulares mediadas por activación del canal iónico TRPV1 por calor, capsaicina o pH ácido, tanto en sistemas heterólogos de expresión como en neuronas sensoriales primarias en cultivo, que expresan el canal de forma nativa, así como también reduce la sensibilización de TRPV1 por bradiquinina. El HA de alto peso molecular (HA-HMW) produjo un efecto más robusto que el HA de bajo peso molecular (HA-LMW).
2. En experimentos conductuales en ratón, el HA de alto peso molecular reduce las respuestas nocidéfensivas evocadas por calor o capsaicina en ratones silvestres, lo que no ocurre en ratones carentes del canal TRPV1.
3. El HA reduce la probabilidad de apertura del canal iónico TRPV1 a través de la estabilización del estado cerrado del canal, reduciendo así la excitabilidad de las fibras nerviosas nociceptoras que expresan este canal.
4. El estudio *in silico* de las posibles interacciones entre las moléculas de TRPV1 y de HA pone en evidencia una alta probabilidad de interacción electrostática entre la molécula de HA y la secuencia rica en aminoácidos con carga positiva, "H+xRG", localizada en el *loop* extracelular S5-P-S6 del canal.
5. Los registros de corrientes en células que expresaban el canal mutado TRPV1-K615A/R617A, demuestran la ausencia de una modulación por HA de la actividad del canal en éstas células, sugiriendo que la interacción electrostática entre TRPV1 y HA ha sido eliminada.

6. El HA-HMW no afectó la actividad de otros canales de la familia TRP, como TRPA1 y TRPM8.
7. La modulación directa de la excitabilidad del canal TRPV1 por el HA podría explicar mecánicamente una parte del efecto analgésico que se obtiene con la inyección intra-articular de HA de alto peso molecular en pacientes de osteoartritis (visco-suplementación).
8. El HA-HMW fue capaz de reducir la frecuencia de disparo de los potenciales de acción en respuesta a capsaicina en neuronas sensoriales provenientes del ganglio raquídeo en cultivo y en las fibras del nervio safeno que inervan la articulación de la rodilla en ratas anestesiadas (artículo anexo).



## 7. Bibliografía

- Abramson SB, Attur M. 2009. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 11: 227
- Almaraz L, Manenschijn JA, de la Pena E, Viana F. 2014. TRPM8. *Handbook of experimental pharmacology* 222: 547-79
- Altman RD, Moskowitz R. 1998. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. Hyalgan Study Group. *The Journal of rheumatology* 25: 2203-12
- Appendino G, Szallasi A. 1997. Euphorbium: modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancient medicine. *Life sciences* 60: 681-96
- Arranz AM, Perkins KL, Irie F, Lewis DP, Hrabe J, et al. 2014. Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 6164-76
- Babasola O, Rees-Milton KJ, Bebe S, Wang J, Anastassiades TP. 2014. Chemically modified N-acylated hyaluronan fragments modulate proinflammatory cytokine production by stimulated human macrophages. *The Journal of biological chemistry* 289: 24779-91
- Balazs EA. 2004. *Viscoelastic properties of hyaluronic acid and its therapeutic use. In: Chemistry and Biology of Hyaluronan.* pp. 415-455.
- Balazs EA, Denlinger JL. 1985. Sodium hyaluronate and joint function. *Journal of Equine Veterinary Science* 5: 222-28
- Balazs EA, Freeman MI, Kloti R, Meyer-Schwickerath G, Regnault F, Sweeney DB. 1972. Hyaluronic acid and replacement of vitreous and aqueous humor. *Modern problems in ophthalmology* 10: 3-21
- Balazs EA, Sundblad L. 1959. Viscosity of hyaluronic acid solutions containing proteins. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis* 64: 137-46
- Bandell M, Dubin AE, Petrus MJ, Orth A, Mathur J, et al. 2006. High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nature neuroscience* 9: 493-500
- Barrot M. 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* 211: 39-50
- Barton NJ, McQueen DS, Thomson D, Gauldie SD, Wilson AW, et al. 2006. Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. *Experimental and molecular pathology* 81: 166-70
- Baumann TK, Martenson ME. 2000. Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin- gated channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20: RC80
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, et al. 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-82
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, et al. 2005. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12248-52
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, et al. 2007. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448: 204-08

- Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R. 2004. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 141: 737-45
- Belmonte C, Viana F. 2008. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Molecular pain* 4: 14
- Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. 2006. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *The Cochrane database of systematic reviews*: Cd005321
- Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. 2005. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 64: 1263-7
- Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt. 2002. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35: 721-31
- Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ. 2007. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* 449: 607-10
- Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, et al. 2002. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nature neuroscience* 5: 856-60
- Bohlen CJ, Priel A, Zhou S, King D, Siemens J, Julius D. 2010. A Bivalent Tarantula Toxin Activates the Capsaicin Receptor, TRPV1, by Targeting the Outer Pore Domain. *Cell* 141: 834-45
- Bonnington JK, McNaughton PA. 2003. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *The Journal of physiology* 551: 433-46
- Bork P, Downing AK, Kieffer B, Campbell ID. 1996. Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Quarterly reviews of biophysics* 29: 119-67
- Bothner H, Wik O. 1987. Rheology of Hyaluronate. *Acta Oto-Laryngologica* 104: 25-30
- Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R. 2006. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 4835-40
- Brecht M, Mayer U, Schlosser E, Prehm P. 1986. Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *The Biochemical journal* 239: 445-50
- Brierley SM, Hughes PA, Page AJ, Kwan KY, Martin CM, et al. 2009. The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli. *Gastroenterology* 137: 2084-95 e3
- Cabedo H, Carteron C, Ferrer-Montiel A. 2004. Oligomerization of the sensory and motor neuron-derived factor prevents protein O-glycosylation. *The Journal of biological chemistry* 279: 33623-9
- Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. 2013. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504: 113-8
- Carulli D, Rhodes KE, Fawcett JW. 2007. Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *The Journal of comparative neurology* 501: 83-94
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, et al. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science (New York, N.Y.)* 288: 306-13
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. 1999. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-41

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.
- Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, et al. 2011. Trpv1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arteriolar smooth muscle cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 5067-77
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA. 1999a. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 23: 617-24
- Cesare P, McNaughton P. 1996. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 15435-9
- Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA. 1999b. Ion channels gated by heat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7658-63
- Clapham DE. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517-24
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. 2005. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological reviews* 57: 427-50
- Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Jr., Wang Y, Lawrence D, et al. 2007. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54: 379-86
- Comper WD, Laurent TC. 1978. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiological reviews* 58: 255-315
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, et al. 2004. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432: 723-30
- Cosens DJ, Manning A. 1969. Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant.
- Cui Y, Yang F, Cao X, Yarov-Yarovoy V, Wang K, Zheng J. 2012. Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *The Journal of general physiology* 139: 273-83
- Chang EJ, Kim HJ, Ha J, Kim HJ, Ryu J, et al. 2007. Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4. *Journal of cell science* 120: 166-76
- Chavez AE, Chiu CQ, Castillo PE. 2010. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nature neuroscience* 13: 1511-8
- Chen W, Abatangelo G. 1999. Functions of hyaluronan in wound repair.
- Cho WG, Valtschanoff JG. 2008. Vanilloid receptor TRPV1-positive sensory afferents in the mouse ankle and knee joints. *Brain research* 1219: 59-65
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, et al. 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-62
- Daley WP, Peters SB, Larsen M. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of cell science* 121: 255-64
- Damann N, Voets T, Nilius B. 2008. TRPs in our senses. *Current biology : CB* 18: R880-9
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, et al. 2000. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405: 183-7
- Day RM, Mascarenhas MM. 2004. Chemistry and Biology of Hyaluronan. In *Elsevier*, ed. HG Garg, CA Hales, pp. 153-72
- De la Peña E, Sala S, Rovira JC, Schmidt RF, Belmonte C. 2002. Elastoviscous substances with analgesic effects on joint pain reduce stretch-activated ion channel activity in vitro. *Pain* 99: 501-8



- Devesa I, Planells-Cases R, Fernandez-Ballester G, Gonzalez-Ros JM, Ferrer-Montiel A, Fernandez-Carvajal A. 2011. Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. *Journal of inflammation research* 4: 67-81
- Dhaka A, Earley TJ, Watson J, Patapoutian A. 2008. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 566-75
- Diogenes A, Akopian AN, Hargreaves KM. 2007. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. *Journal of dental research* 86: 550-5
- Dixon AS, Jacoby RK, Berry H, Hamilton EB. 1988. Clinical trial of intra-articular injection of sodium hyaluronate in patients with osteoarthritis of the knee. *Current medical research and opinion* 11: 205-13
- Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, et al. 1998. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer research* 58: 1515-20
- Engler A, Aeschlimann A, Simmen BR, Michel BA, Gay RE, et al. 2007. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochemical and biophysical research communications* 359: 884-8
- Engstrom-Laurent A. 1989. Changes in hyaluronan concentration in tissues and body fluids in disease states. *Ciba Foundation symposium* 143: 233-40; discussion 40-7, 81-5
- Erler I, Al-Ansary DM, Wissenbach U, Wagner TF, Flockerzi V, Niemeyer BA. 2006. Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel. *The Journal of biological chemistry* 281: 38396-404
- Esko JD, Kimata K, Lindahl U. 2009. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans In *Essentials of Glycobiology*, ed. A Varki, RD Cummings, JD Esko, HH Freeze, P Stanley, et al. Cold Spring Harbor NY: The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California
- Everett KV. 2011. Transient receptor potential genes and human inherited disease. *Advances in experimental medicine and biology* 704: 1011-32
- Faber V, Rosendal K. 1954. Streptococcal hyaluronidase. II. Studies on the production of hyaluronidase and hyaluronic acid by representatives of all types of hemolytic streptococci belonging to group A. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 35: 159-64
- Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. 2008. TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin, Tex.)* 2: 429-38
- Felson DT. 2005. The sources of pain in knee osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* 17: 624-8
- Fernandez-Ballester G, Fernandez-Carvajal A, Gonzalez-Ros JM, Ferrer-Montiel A. 2011. Ionic channels as targets for drug design: a review on computational methods. *Pharmaceutics* 3: 932-53
- Fernández-Ballester G, Fernández-Carvajal A, González-Ros JM, Ferrer-Montiel A. 2011. Ionic Channels as Targets for Drug Design: A Review on Computational Methods. *Pharmaceutics* 3: 932
- Fernihough J, Gentry C, Bevan S, Winter J. 2005. Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neuroscience letters* 388: 75-80
- Fischer MJ, Balasuriya D, Jeggle P, Goetze TA, McNaughton PA, et al. 2014. Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466: 2229-41

- Fuki IV, Kuhn KM, Lomazov IR, Rothman VL, Tuszynski GP, et al. 1997. The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro. *The Journal of clinical investigation* 100: 1611-22
- Gallego-Sandin S, Rodriguez-Garcia A, Alonso MT, Garcia-Sancho J. 2009. The endoplasmic reticulum of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels. *The Journal of biological chemistry* 284: 32591-601
- Gees M, Colsoul B, Nilius B. 2010. The role of transient receptor potential cation channels in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: a003962
- Gingerich DA, Auer JA, Fackelman GE. 1981. Effect of exogenous hyaluronic acid on joint function in experimentally induced equine osteoarthritis: dosage titration studies. *Research in veterinary science* 30: 192-7
- Gomis A, Miralles A, Schmidt RF, Belmonte C. 2007. Nociceptive nerve activity in an experimental model of knee joint osteoarthritis of the guinea pig: effect of intra-articular hyaluronan application. *Pain* 130: 126-36
- Gomis A, Pawlak M, Balazs EA, Schmidt RF, Belmonte C. 2004. Effects of different molecular weight elastoviscous hyaluronan solutions on articular nociceptive afferents. *Arthritis and rheumatism* 50: 314-26
- Grigg P, Schaible HG, Schmidt RF. 1986. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *Journal of neurophysiology* 55: 635-43
- Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC. 2010. Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nature neuroscience* 13: 1519-25
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260: 3440-50
- Hardie RC, Minke B. 1992. The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* 8: 643-51
- Hartig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, et al. 1999. Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain research* 842: 15-29
- Hartig W, Singer A, Grosche J, Brauer K, Ottersen OP, Bruckner G. 2001. Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain research* 899: 123-33
- Hascall V, Esko JD. 2009. Hyaluronan In *Essentials of Glycobiology*, ed. A Varki, RD Cummings, JD Esko, HH Freeze, P Stanley, et al. Cold Spring Harbor NY: The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California
- Hayashi T, Kondo T, Ishimatsu M, Yamada S, Nakamura K, et al. 2009. Expression of the TRPM8-immunoreactivity in dorsal root ganglion neurons innervating the rat urinary bladder. *Neuroscience research* 65: 245-51
- Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. 1989. CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunology today* 10: 423-8
- Helliwell RJ, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bevan S, McIntyre P. 1998. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neuroscience letters* 250: 177-80
- Hille B. 2001. *Ion channels of excitable membranes*.
- Howard J, Bechstet S. 2004. Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Current biology : CB* 14: R224-6



- Huang J, Zhang X, McNaughton PA. 2006. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Seminars in cell & developmental biology* 17: 638-45
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, et al. 2002. 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: 8400-5
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, et al. 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6155-60
- IASP. 1979. In *The Need of Taxonomy. Pain*, ed. I Editorial, pp. 250: 6
- Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Denda M. 2002. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 291: 124-9
- Ioi H, Kido M, Zhang J-Q, Yamaza T, Nakata S, et al. 2006. Capsaicin receptor expression in the rat temporomandibular joint. *Cell Tissue Res* 325: 47-54
- Jahnel R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurreck J, Hucho F. 2001. Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *European journal of biochemistry / FEBS* 268: 5489-96
- Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. 1999. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 274: 7325-33
- Jara-Oseguera A, Llorente I, Rosenbaum T, Islas LD. 2008. Properties of the inner pore region of TRPV1 channels revealed by block with quaternary ammoniums. *The Journal of general physiology* 132: 547-62
- Jeske NA, Por ED, Belugin S, Chaudhury S, Berg KA, et al. 2011. A-kinase anchoring protein 150 mediates transient receptor potential family V type 1 sensitivity to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 8681-8
- Jin X, Morsy N, Winston J, Pasricha PJ, Garrett K, Akbarali HI. 2004. Modulation of TRPV1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-Src kinase. *American journal of physiology. Cell physiology* 287: C558-63
- Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, et al. 2014. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32: 1254-66
- Jordt SE, Julius D. 2002. Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to "Hot" Chili Peppers.
- Jordt SE, McKemy DD, Julius D. 2003. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Current opinion in neurobiology* 13: 487-92
- Julius D. 2013. TRP channels and pain. *Annual review of cell and developmental biology* 29: 355-84
- Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-10
- Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, et al. 1999. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 529-38
- Kalia J, Swartz KJ. 2013. Exploring structure-function relationships between TRP and Kv channels. *Scientific reports* 3: 1523
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, et al. 2009. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 1273-8

- Kendall FE, Heidelberger M, Dawson MH. 1937. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group a hemolytic *Streptococcus*.
- Klionsky L, Tamir R, Holzinger B, Bi X, Talvenheimo J, et al. 2006. A polyclonal antibody to the prepore loop of transient receptor potential vanilloid type 1 blocks channel activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319: 192-8
- Koch M, Kreutz S, Bottger C, Grabiec U, Ghadban C, et al. 2011. The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB1 receptors and modulated by TRPA1 and Cav 2.2 channels. *Hippocampus* 21: 554-64
- Kochlamazashvili G, Henneberger C, Bukalo O, Dvoretzkova E, Senkov O, et al. 2010. The extracellular matrix molecule hyaluronic acid regulates hippocampal synaptic plasticity by modulating postsynaptic L-type Ca(2+) channels. *Neuron* 67: 116-28
- Kochukov MY, McNearney TA, Fu Y, Westlund KN. 2006. *Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes*. C424-C32 pp.
- Kohda D, Morton CJ, Parkar AA, Hatanaka H, Inagaki FM, et al. 1996. Solution structure of the link module: a hyaluronan-binding domain involved in extracellular matrix stability and cell migration. *Cell* 86: 767-75
- Koppe G, Bruckner G, Hartig W, Delpech B, Bigl V. 1997. Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *The Histochemical journal* 29: 11-20
- Kuner R. 2010. Central mechanisms of pathological pain. *Nature medicine* 16: 1258-66
- Kwok JC, Carulli D, Fawcett JW. 2010. In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of neurochemistry* 114: 1447-59
- Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW. 2011. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental neurobiology* 71: 1073-89
- Lainez S, Valente P, Ontoria-Oviedo I, Estevez-Herrera J, Camprubi-Robles M, et al. 2010. GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24: 1958-70
- Langford LA, Schmidt RF. 1983. Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. *The Anatomical record* 206: 71-8
- Laurent T, Laurent UBG, Fraser R. 1996. The structure and function of hyaluronan: An overview.
- Leach JB, Schmidt CE. 2004. Hyaluronan. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering, edited by Wnek GE, Bowlin GL, Eds*: 1421-31
- Lee G, Abdi K, Jiang Y, Michaely P, Bennett V, Marszalek PE. 2006. Nanospring behaviour of ankyrin repeats. *Nature* 440: 246-9
- Lee SM, Cho YS, Kim TH, Jin MU, Ahn DK, et al. 2012. An ultrastructural evidence for the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in astrocytes in the rat trigeminal caudal nucleus. *Journal of chemical neuroanatomy* 45: 45-9
- Li ZC, Cheng GQ, Hu KZ, Li MQ, Zang WP, et al. 2011. Correlation of synovial fluid HMGB-1 levels with radiographic severity of knee osteoarthritis. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale* 34: E298
- Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504: 107-12
- Lilja J, Laulund F, Forsby A. 2007. Insulin and insulin-like growth factor type-I up-regulate the vanilloid receptor-1 (TRPV1) in stably TRPV1-expressing SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of neuroscience research* 85: 1413-9

- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R. 2007. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54: 905-18
- Liu L, Lo Y, Chen I, Simon SA. 1997. The responses of rat trigeminal ganglion neurons to capsaicin and two nonpungent vanilloid receptor agonists, olvanil and glyceryl nonamide. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17: 4101-11
- Liu L, Simon SA. 1996. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *Journal of neurophysiology* 76: 1858-69
- Lukacs V, Thyagarajan B, Varnai P, Balla A, Balla T, Rohacs T. 2007. Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 7070-80
- Madrid R, de la Pena E, Donovan-Rodriguez T, Belmonte C, Viana F. 2009. Variable Threshold of Trigeminal Cold-Thermosensitive Neurons Is Determined by a Balance between TRPM8 and Kv1 Potassium Channels. *Journal of Neuroscience* 29: 3120-31
- Madrid R, Donovan-Rodriguez T, Meseguer V, Acosta MC, Belmonte C, Viana F. 2006. Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 12512-25
- Malkia A, Madrid R, Meseguer V, de la Pena E, Valero M, et al. 2007. Bidirectional shifts of TRPM8 channel gating by temperature and chemical agents modulate the cold sensitivity of mammalian thermoreceptors. *The Journal of physiology* 581: 155-74
- McCarthy GM, McCarty DJ. 1992. Effect of topical capsaicin in the therapy of painful osteoarthritis of the hands. *The Journal of rheumatology* 19: 604-7
- McGaraughty S, Chu KL, Perner RJ, Didomenico S, Kort ME, Kym PR. 2010. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Molecular pain* 6: 14
- McKemy DDea. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation.
- McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. 2005. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *British Journal of Pharmacology* 144: 781-90
- Meyers JR, MacDonald RB, Duggan A, Lenzi D, Standaert DG, et al. 2003. Lighting up the senses: FM1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 4054-65
- Miao HQ, Fritz TA, Esko JD, Zimmermann J, Yayon A, Vlodavsky I. 1995. Heparan sulfate primed on beta-D-xylosides restores binding of basic fibroblast growth factor. *Journal of cellular biochemistry* 57: 173-84
- Minke B, Wu C, Pak WL. 1975. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258: 84-7
- Modawal A, Ferrer M, Choi HK, Castle JA. 2005. Hyaluronic acid injections relieve knee pain. *The Journal of family practice* 54: 758-67
- Mohapatra DP, Nau C. 2003. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* 278: 50080-90
- Montell C. 2011. The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 461: 499-506
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, et al. 2002. A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels.

- Montell C, Rubin GM. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-23
- Moore ED, Becker PL, Fogarty KE, Williams DA, Fay FS. 1990. Ca<sup>2+</sup> imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell calcium* 11: 157-79
- Moreland LW. 2003a. *Arthritis Res Ther* 5: 54
- Moreland LW. 2003b. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther* 5: 54-67
- Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Garcia-Sanz N, Ferrer-Montiel A. 2004. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *The Journal of biological chemistry* 279: 25665-72
- Morgelin M, Heinegard D, Engel J, Paulsson M. 1994. The cartilage proteoglycan aggregate: assembly through combined protein-carbohydrate and protein-protein interactions. *Biophysical chemistry* 50: 113-28
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, et al. 2005. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular pain* 1: 3
- Mouw JK, Ou G, Weaver VM. 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 771-85
- Munns CH, Chung MK, Sanchez YE, Amzel LM, Caterina MJ. 2015. Role of the outer pore domain in transient receptor potential vanilloid 1 dynamic permeability to large cations. *The Journal of biological chemistry* 290: 5707-24
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. 2005. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 4052-61
- Naylor JaB, D.J. 2009. Extracellular Ion Channel Inhibitor Antibodies. *The Open Drug Discovery Journal* 1, 36-42
- Ni D, Gu Q, Hu HZ, Gao N, Zhu MX, Lee LY. 2006. Thermal sensitivity of isolated vagal pulmonary sensory neurons: role of transient receptor potential vanilloid receptors. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291: R541-50
- Nilius B. 2007. TRP channels in disease. *Biochimica et biophysica acta* 1772: 805-12
- Nilius B, Mahieu F, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, et al. 2006. The Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The EMBO journal* 25: 467-78
- Nilius B, Owsianik G. 2011. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology* 12: 218
- Novakova-Tousova K, Vyklicky L, Susankova K, Benedikt J, Samad A, et al. 2007. Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience* 149: 144-54
- Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8002-6
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. 2002. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *The Journal of biological chemistry* 277: 13375-8
- Ogston AG, Stainer JE. 1953. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties.pdf>.



- Oh U, Hwang SW, Kim D. 1996. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 1659-67
- Okun A, Liu P, Davis P, Ren J, Remeniuk B, et al. 2012. Afferent Drive Elicits Ongoing Pain in a Model of Advanced Osteoarthritis. *Pain* 153: 924-33
- Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, et al. 2013. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation* 95: 1535-41
- Palmer M. 1934. Hyaluronan name.
- Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, et al. 2010. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nature medicine* 16: 1396-9
- Patwardhan AM, Akopian AN, Ruparel NB, Diogenes A, Weintraub ST, et al. 2010. Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate TRPV1 and produce pain in rodents. *The Journal of clinical investigation* 120: 1617-26
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, et al. 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108: 705-15
- Peterlin Z, Chesler A, Firestein S. 2007. A painful trp can be a bonding experience. *Neuron* 53: 635-8
- Peyron JG, Balazs EA. 1974. Preliminary clinical assessment of Na-hyaluronate injection into human arthritic joints. *Pathologie-biologie* 22: 731-6
- Phelps CB, Gaudet R. 2007. The role of the N terminus and transmembrane domain of TRPM8 in channel localization and tetramerization. *The Journal of biological chemistry* 282: 36474-80
- Pozo MA, Balazs EA, Belmonte C. 1997. Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative. *Experimental brain research* 116: 3-9
- Premkumar LS, Ahern GP. 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408: 985-90
- Premkumar LS, Qi Z-H, Van Buren J, Raisinghani M. 2004. *Enhancement of Potency and Efficacy of NADA by PKC-Mediated Phosphorylation of Vanilloid Receptor*. 1442-49 pp.
- Prescott ED, Julius D. 2003. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science (New York, N.Y.)* 300: 1284-8
- Rains C, Bryson HM. 1995. Topical capsaicin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis. *Drugs & aging* 7: 317-28
- Reid G, Babes A, Pluteanu F. 2002. A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *The Journal of physiology* 545: 595-614
- Rydell N, Balazs EA. 1971. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation. *Clinical orthopaedics and related research* 80: 25-32
- Salazar H, Llorente I, Jara-Oseguera A, Garcia-Villegas R, Munari M, et al. 2008. A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nature neuroscience* 11: 255-61
- Schaible HG, Grubb BD. 1993. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55: 5-54
- Schaible HG, Schmidt RF. 1983. Activation of groups III and IV sensory units in medial articular nerve by local mechanical stimulation of knee joint. *Journal of neurophysiology* 49: 35-44

- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. 2006. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177: 1272-81
- Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K. 1995. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82: 271-8
- Scholz J, Woolf CJ. 2002. Can we conquer pain? *Nature neuroscience* 5 Suppl: 1062-7
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, et al. 2002. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10150-5
- Shin JB, Adams D, Paukert M, Siba M, Sidi S, et al. 2005. Xenopus TRPN1 (NOMPC) localizes to microtubule-based cilia in epithelial cells, including inner-ear hair cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 12572-7
- Sidi S, Friedrich RW, Nicolson T. 2003. NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science (New York, N.Y.)* 301: 96-9
- Skoglund S. 1956. Anatomical and physiological studies of knee joint innervation in the cat. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum* 36: 1-101
- Smith MM, Ghosh P. 1987. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatology international* 7: 113-22
- Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE. 2006. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *The Journal of general physiology* 128: 509-22
- Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, Hayashi Y, Minnery BS, et al. 2004. Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *The Journal of urology* 172: 1175-8
- Stokes A, Wakano C, Koblan-Huberson M, Adra CN, Fleig A, Turner H. 2006. TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cellular signalling* 18: 1584-94
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, et al. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-29
- Studer M, McNaughton PA. 2010. Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *The Journal of physiology* 588: 3743-56
- Sugiuar T, Bielefeldt K, Gebhart GF. 2004. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 9521-30
- Sun M, Goldin E, Stahl S, Falardeau JL, Kennedy JC, et al. 2000. Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Human molecular genetics* 9: 2471-8
- Szabo A. 2005. Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors in Adjuvant-Induced Chronic Arthritis: In Vivo Study Using Gene-Deficient Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314: 111-19
- Szallasi A, Blumberg PM. 1999. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological reviews* 51: 159-212
- Szallasi A, Blumberg PM. 2007. *Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids*
- TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.* Boca Raton FL: Taylor & Francis Group, LLC.

- Szolcsanyi J, Joo F, Jancso-Gabor A. 1971. Mitochondrial changes in preoptic neurons after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermodetectors in rats. *Nature* 229: 116-7
- Szolcsanyi J, Sandor Z. 2012. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. *Trends in pharmacological sciences* 33: 646-55
- Takashima Y, Daniels RL, Knowlton W, Teng J, Liman ER, McKemy DD. 2007. Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 14147-57
- Tarbell JM, Pahakis MY. 2006. Mechanotransduction and the glycocalyx. *Journal of Internal Medicine* 259: 339-50
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, et al. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-43
- Tominaga M, Tominaga T. 2005. Structure and function of TRPV1. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 451: 143-50
- Toole BP. 2002. Hyaluronan promotes the malignant phenotype.
- Tsavaler L, Shaperro MH, Morkowski S, Laus R. 2001. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer research* 61: 3760-9
- Tsuruda PR, Julius D, Minor DL, Jr. 2006. Coiled coils direct assembly of a cold-activated TRP channel. *Neuron* 51: 201-12
- Turley EA, Austen L, Moore D, Hoare K. 1993. Ras-transformed cells express both CD44 and RHAMM hyaluronan receptors: only RHAMM is essential for hyaluronan-promoted locomotion. *Experimental cell research* 207: 277-82
- Valdes AM, De Wilde G, Doherty SA, Lories RJ, Vaughn FL, et al. 2011. The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 70: 1556-61
- Valenzano KJ, Grant ER, Wu G, Hachicha M, Schmid L, et al. 2003. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carboxamide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. in vitro characterization and pharmacokinetic properties. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306: 377-86
- Varki A, Lowe JB. 2009. Biological Roles of Glycans In *Essentials of Glycobiology*, ed. A Varki, RD Cummings, JD Esko, HH Freeze, P Stanley, et al. Cold Spring Harbor NY: The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California
- Vay L, Gu C, McNaughton PA. 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 165: 787-801
- Veldhuis NA, Lew MJ, Abogadie FC, Poole DP, Jennings EA, et al. 2012. N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor. *The Journal of biological chemistry* 287: 21765-72
- Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. 2001. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *The Journal of physiology* 534: 813-25
- Vlachova V, Teisinger J, Susankova K, Lyfenko A, Etrich R, Vyklicky L. 2003. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23: 1340-50
- Voets T. 2012. Quantifying and modeling the temperature-dependent gating of TRP channels. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 162: 91-119

- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430: 748-54
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B. 2002. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277: 47044-51
- Watson CP. 1994. Topical capsaicin as an adjuvant analgesic. *Journal of pain and symptom management* 9: 425-33
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. 1995. TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9652-6
- Wilson IB. 2004. The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61: 794-809
- Williams DA, Fogarty KE, Tsien RY, Fay FS. 1985. Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* 318: 558-61
- Wisniewski HG, Maier R, Lotz M, Lee S, Klampfer L, et al. 1993. TSG-6: a TNF-, IL-1-, and LPS-inducible secreted glycoprotein associated with arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151: 6593-601
- Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, et al. 1998. Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93: 177-88
- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, et al. 2002. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418: 181-6
- Yang B, Yang BL, Savani RC, Turley EA. 1994. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *The EMBO journal* 13: 286-96
- Yasuhara O, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. 1994. Immunohistochemical localization of hyaluronic acid in rat and human brain. *Brain research* 635: 269-82
- Yingsung W, Zhuo L, Morgelin M, Yoneda M, Kida D, et al. 2003. Molecular heterogeneity of the SHAP-hyaluronan complex. Isolation and characterization of the complex in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of biological chemistry* 278: 32710-8
- Yokoyama T, Ohbuchi T, Saito T, Sudo Y, Fujihara H, et al. 2011. Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats. *European journal of pharmacology* 655: 31-7
- Zhang D, Pan L, Yang LH, He XK, Huang XY, Sun FZ. 2005. Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors, and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. *Human reproduction* 20: 3053-61
- Zhang L, Jones S, Brody K, Costa M, Brookes SJ. 2004. Thermosensitive transient receptor potential channels in vagal afferent neurons of the mouse. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 286: G983-91
- Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, et al. 2010. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 18: 476-99
- Zhang X, Li L, McNaughton PA. 2008. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron* 59: 450-61



- Zhuo L, Hascall VC, Kimata K. 2004. Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *The Journal of biological chemistry* 279: 38079-82
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, et al. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-7



## 8. Anexo



ARTICLE

Received 5 Nov 2014 | Accepted 17 Jul 2015 | Published 27 Aug 2015

DOI: 10.1038/ncomms9095

OPEN

# Hyaluronan modulates TRPV1 channel opening, reducing peripheral nociceptor activity and pain

Rebeca Caires<sup>1</sup>, Enoch Luis<sup>1</sup>, Francisco J. Taberner<sup>2</sup>, Gregorio Fernandez-Ballester<sup>2</sup>, Antonio Ferrer-Montiel<sup>2</sup>, Endre A. Balazs<sup>3</sup>, Ana Gomis<sup>1</sup>, Carlos Belmonte<sup>1</sup> & Elvira de la Peña<sup>1</sup>

Hyaluronan (HA) is present in the extracellular matrix of all body tissues, including synovial fluid in joints, in which it behaves as a filter that buffers transmission of mechanical forces to nociceptor nerve endings thereby reducing pain. Using recombinant systems, mouse-cultured dorsal root ganglia (DRG) neurons and *in vivo* experiments, we found that HA also modulates polymodal transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) channels. HA diminishes heat, pH and capsaicin (CAP) responses, thus reducing the opening probability of the channel by stabilizing its closed state. Accordingly, in DRG neurons, HA decreases TRPV1-mediated impulse firing and channel sensitization by bradykinin. Moreover, subcutaneous HA injection in mice reduces heat and capsaicin nocifensive responses, whereas the intra-articular injection of HA in rats decreases capsaicin joint nociceptor fibres discharge. Collectively, these results indicate that extracellular HA reduces the excitability of the ubiquitous TRPV1 channel, thereby lowering impulse activity in the peripheral nociceptor endings underlying pain.

<sup>1</sup>Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, San Juan de Alicante, 03550 Alicante, Spain. <sup>2</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Elche, 03202 Alicante, Spain. <sup>3</sup>Matrix Biology Institute, 1040 Arcadian Way, Fort Lee, New Jersey 07024, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.B. (email: carlos.belmonte@umh.es) or to E.d.l.P. (email: elvirap@umh.es).

**H**yaluronan (HA) is an anionic linear polymer that is ubiquitously expressed in the extracellular matrix (ECM) of mammalian tissues, where it forms loose and elastic matrices<sup>1,2</sup>. HA is a space filling molecule that makes the ECM an appropriate environment for cell movement and proliferation and confers elastoviscous biomechanical properties to the tissues<sup>3,4</sup>. In addition, HA interacts with specific proteins, such as TSG-6, inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor, pentraxin and trombospondin 1, and with membrane receptors, such as CD44, RHAMM, HAHARE and Toll-like receptor 4/2, thereby modulating the development, morphogenesis, cell migration, apoptosis, cell survival, and inflammation and tumorigenesis<sup>5,6</sup>. In addition, HA modulates stretch-activated channels<sup>7</sup>, and Ca(v)1.2 channels in neurons<sup>8</sup>.

In joints, HA is continuously secreted by the lining cells of the synovial membranes and provides a protective rheological buffer that reduces the force transmitted by joint movements to joint tissues, including nociceptive nerve endings<sup>9–11</sup>. In chronically injured and/or inflamed arthritic joints, elastoviscosity of the synovial fluid becomes abnormally low because of the dilution and degradation of HA<sup>12,13</sup>. The presence of small size HA molecules in the synovial fluid not only alters its rheological properties but also facilitates the production of pro-inflammatory cytokines<sup>14</sup>, thereby contributing to sensitize nociceptive terminals and enhancing spontaneous and movement-evoked joint pain<sup>15</sup>. Notably, intra-articular injection of HA alleviates pain in osteoarthritic patients<sup>16–18</sup>, attenuates lameness in natural and experimentally induced osteoarthritis in horses<sup>19</sup>, and decreases the augmented movement-induced nerve impulse activity in sensitized joint nociceptor fibres<sup>10,11</sup>. However, the molecular mechanisms underlying HA anti-nociceptive activity remain poorly understood.

Here, we explored the hypothesis that the analgesic effects of HA in joints are partially mediated through the modulation of TRPV1 channel activity in nociceptive terminals. TRPV1 is a non-selective cationic channel preferentially expressed by primary nociceptive neurons that has been implicated in arthritic pain<sup>20–23</sup>. Accordingly, the pharmacological modulation of TRPV1 has been shown to produce anti-nociception in arthritis animal models<sup>24,25</sup>. We observed that HA inhibits TRPV1 channel activity and reduces action potential firing in nociceptive neurons and that it shows a previously unknown molecular mechanism that explains the attenuation by HA of peripheral nociceptor activity and pain.

## Results

**HA reduces calcium responses to heat and capsaicin.** We analysed the effects of HA on TRPV1-EYFP channels expressed in HEK293 cells and in dissociated DRG primary sensory neurons. We measured changes in intracellular calcium concentration  $[Ca^{2+}]_i$  evoked by brief noxious heat stimuli (48 °C) applied during perfusion with a control solution (CS) or HA (Fig. 1a,b). Repeated heat pulses (P1–P4) under a CS perfusion induced an amplitude decay of the  $[Ca^{2+}]_i$  response (desensitization, 30% at P3 and 50% at P4,  $n = 55$ ) that was significantly larger in the presence of HA (60% at P3 and 70% at P4,  $n = 74$ ) (Fig. 1a–c) and consistent with the inhibitory activity of HA. Inhibition persisted after a 50-min washout of the cells with the CS (Supplementary Fig. 1).

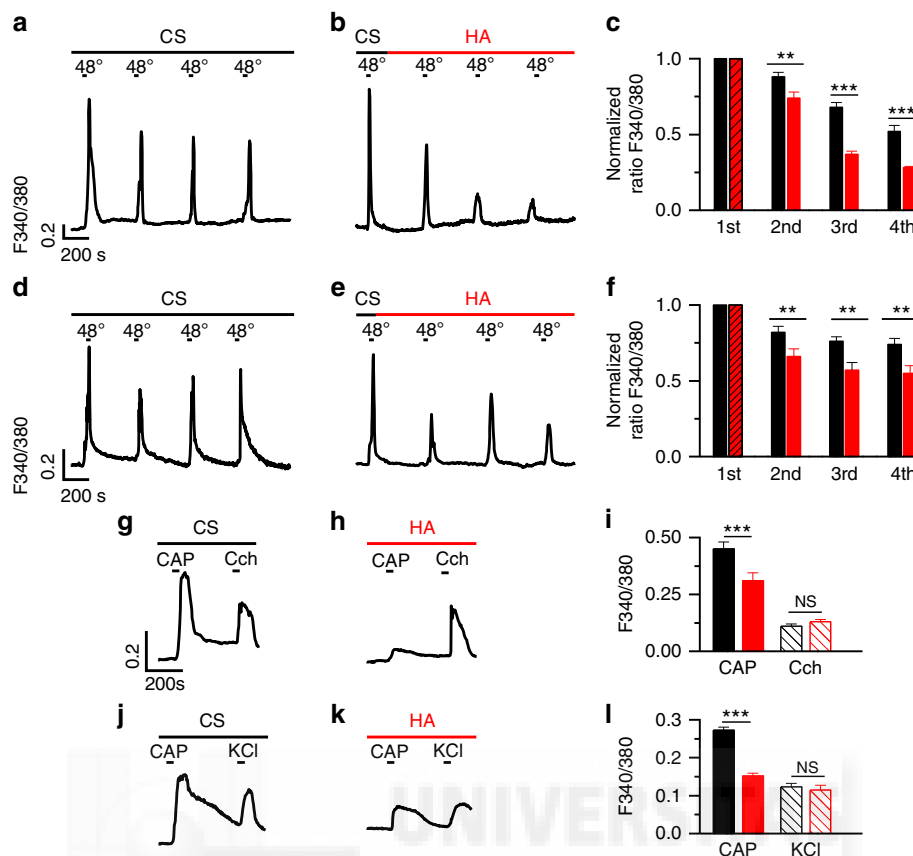
Using a similar protocol, we further investigated whether HA also inhibited  $[Ca^{2+}]_i$  nociceptive DRG neuron responses to heat in culture (Fig. 1d–f). Desensitization during P3 and P4 in DRG neurons responding to noxious heat during perfusion with the CS was 25% (Fig. 1d,f;  $n = 92$ ), whereas under exposure to HA, the amplitude of the response to P3 and P4 was 44% lower on average than P1 (Fig. 1e,f;  $n = 34$ ). This result indicates that HA significantly inhibited heat-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  rises in nociceptor

neurons in culture. In HEK-TRPV1-EYFP (+) cells and DRG neurons, we observed that HA also inhibited CAP-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  elevations (Fig. 1g–i). In the CS, 92% ( $n = 121$ ) of the TRPV1-EYFP (+) cells responded to 100 nM capsaicin (CAP). By contrast, this percentage decreased to 63% ( $n = 175$ ) with exposure to HA; furthermore, the amplitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  rise in HA was 31% lower than in the CS (Fig. 1i). Similar results were obtained using a low pH as the TRPV1 stimulus (Supplementary Fig. 2). Similarly, the CAP-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  increase in DRG neurons was significantly affected by HA (Fig. 1j,k). In the CS conditions, 68% of DRG neurons ( $n = 276$ ) responded to 100 nM CAP, decreasing to 37% ( $n = 360$ ) in the presence of HA. In addition, the amplitude of the response to CAP in HA-treated DRG neurons was 44% lower than in those exposed to CS (Fig. 1l). We also used DRG neurons from TRPV1 null mice as controls. These neurons were unresponsive to capsaicin but remained heat activated. Supplementary Table 1 shows that HA reduced the heat response amplitude in wild-type (WT) sensory neurons by 63% but only by 26% in TRPV1<sup>-/-</sup> DRGs. The effect of HA on the heat response was, on average, 2.4 times larger in WT sensory neurons than in TRPV1<sup>-/-</sup> neurons. The residual response to heat observed in DRG-TRPV1<sup>-/-</sup> sensory neurons was attributable to the activation of other thermo-sensitive channels. All DRG heat-sensitive neurons from WT animals responded to CAP, as expected, whereas no neurons in TRPV1<sup>-/-</sup> mice were activated by the vanilloid, although they responded to 30 mM KCl, thus confirming the absence of TRPV1 channels in TRPV1<sup>-/-</sup> mice DRG neurons. A thermal threshold to heat was not modified by HA in TRPV1-EYFP-HEK293 cells or in DRG neurons of WT and TRPV1<sup>-/-</sup> individuals, although it decreased the amplitude of the calcium response to 48 °C. HA also reduced the rate of the heat-induced calcium rise in TRPV1-EYFP-HEK293 cells and DRG neurons of WT mice but not TRPV1 null mice. This result is consistent with the tenet that sensitivity of the TRP channels to temperature appears whenever the activation energies associated with the opening and closing transitions are sufficiently different and not governed by a single characteristic thermal threshold<sup>26</sup>.

Finally, we determined the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of HA using SHSY5Y-TRPV1 cells that express stable levels of TRPV1 channels and measured  $[Ca^{2+}]_i$  increases evoked by 48 °C pulses, under the CS and increasing HA concentrations (50, 200, 400 and 800  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). The dose-response relationship showed a correlation between HA concentration and its inhibitory effect on the  $Ca^{2+}$  response with an IC<sub>50</sub> of  $135 \pm 3 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

**HA inhibits capsaicin-evoked TRPV1 ionic currents.** We performed whole-cell voltage-clamp recordings in HEK-TRPV1-EYFP (+) cells to define the influence of HA on membrane currents induced by the activation of TRPV1 channels. CAP was applied to activate TRPV1 in the absence and presence of HA (Fig. 2a). We calculated the value of the EC<sub>50</sub> for the CAP response in cells perfused with the CS or pretreated with 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$  HA (5.2 MDa) for 30 min before CAP (0.1, 0.25, 0.5, 1 and 10  $\mu\text{M}$ ) was instilled. The EC<sub>50</sub> was similar in both conditions ( $0.33 \pm 0.05 \mu\text{M}$  in CS and  $0.36 \pm 0.01 \mu\text{M}$  in HA) with a Hill coefficient  $n_H > 1$  in both cases, thus supporting the tenet that HA does not act as a competitive capsaicin antagonist. TRPV1 current density was reduced by 70% in the presence of HA at +80 mV (Fig. 2b) and by 64% at -60 mV (Fig. 2c,d).

Although HA has a negative charge, N-glycosylation of TRPV1 did not affect polymer inhibitory activity (Supplementary Fig. 3). Analysis of the activation slope (Fig. 2c) showed a value of  $92 \pm 9 \text{ pA ms}^{-1}$  in the CS that HA reduced to  $15 \pm 3 \text{ pA ms}^{-1}$ , which indicated that HA slowed the channel current activation.



**Figure 1 | Inhibition by HA of intracellular calcium responses to heat (48°C) and 100 nM CAP in HEK-TRPV1-EYFP (+) cells and DRG primary sensory neurons.** (a) Intracellular calcium rises evoked in a HEK-TRPV1-EYFP (+) cell by temperature elevations of the bathing solution to 48°C repeated at 10 min intervals. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increases are represented as the ratio of the emission fluorescence intensities at 340 and 380 nm. Notice the development of desensitization. (b) The same experiment as in a but with a HA perfusion, at the end of the first heating stimulus. (c) The normalized ratio of average amplitude between responses evoked by successive heat pulses (indicated in the abscissae axis) in the control solution (CS, black bars) and during perfusion with HA (red bars). Striped red bar represents the average amplitude of the response in the control saline solution for cells treated with HA immediately afterwards. Notice that the inhibition was maximal at 30 min after the onset of the HA perfusion. (d-f) The same protocol as in a-c but performed in cultured adult DRG primary sensory neurons. The inhibitory effect was maximal after 20 min of HA perfusion (third versus first stimuli). (g,h) Intracellular calcium change in a HEK-TRPV1-EYFP (+) cell in response to 100 nM CAP and to 100  $\mu\text{M}$  carbachol (Cch), a compound that activates endogenous muscarinic receptors in HEK293 cells, applied in CS (g) and after exposure to HA initiated 30–60 min earlier (h). (i) The average amplitude of the response to CAP (filled bars) and Cch (striped bars) under perfusion with CS (black,  $n=68$ ) and in the presence of HA (red,  $n=100$ ). (j-k) Intracellular calcium responses of DRG adult cultured sensory neurons to 100 nM CAP and to 30 mM KCl during perfusion with the control solution (j) and with HA (k). (l) The average amplitude of the intracellular calcium responses of DRG neurons to CAP (filled bars) or 30 mM KCl (striped bars) in control solution (black) and in the presence of HA (red). Note that the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase evoked by membrane depolarization of CAP-sensitive neurons with 30 mM KCl was not altered by HA. The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m. Student's  $t$ -test: \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.05$ ;  $^{\text{NS}}P > 0.5$ .

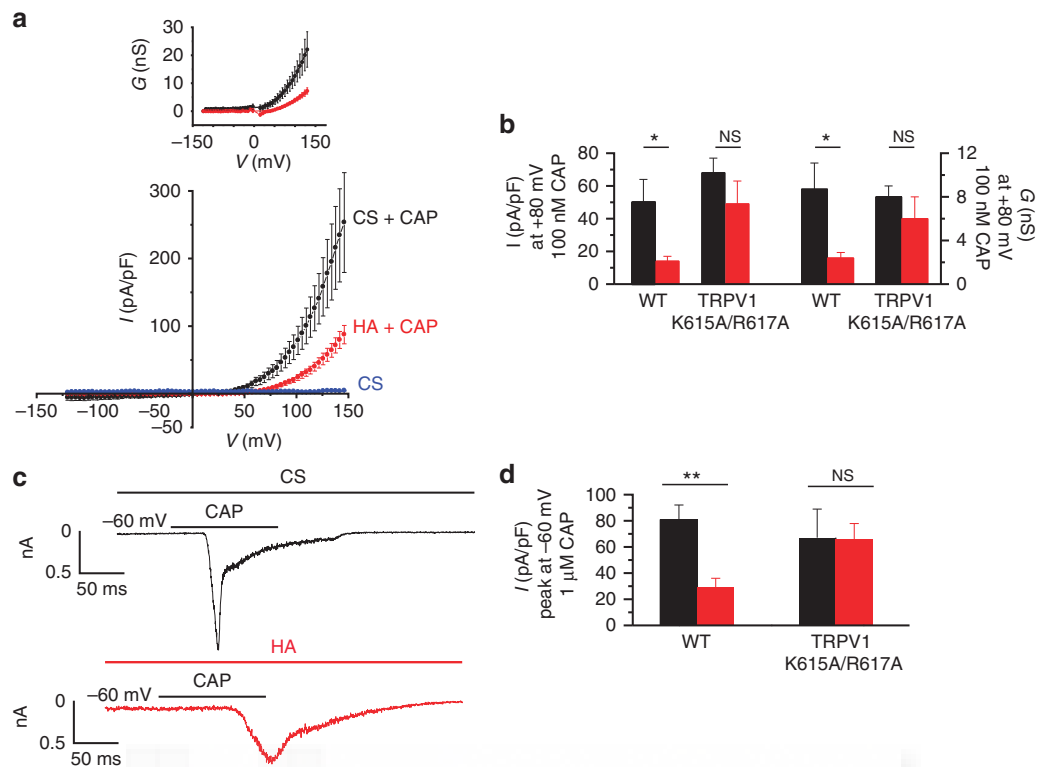
We then analysed the voltage dependency of TRPV1 gating in CS and the presence of HA by fitting the  $I$ - $V$  relationships (Fig. 2a) to a Boltzmann-linear function<sup>27</sup>. HA did not alter the voltage required to activate 50% of the maximal conductance ( $V_{1/2}$ ) or the gating valence of channel activation ( $z_g$ ). By contrast, HA reduced the maximal channel conductance ( $g$ ) by  $\approx 50\%$ . Altogether, these data implied that HA inhibited TRPV1 by affecting the channel's current flow and activation kinetics.

#### HA reduces the opening probability of TRPV1 channels.

To further obtain a mechanistic insight on the HA inhibitory effects on TRPV1, we recorded TRPV1 single-channel activity in HEK-TRPV1-EYFP(+) cells. TRPV1 channel activity in response to CAP was observed in all control patches ( $n=7$ ); by contrast, this response was absent in 3 of the 11 patches of cells recorded in the presence of HA. The current amplitude histogram in the CS showed two obviously separated current peaks representing the open and closed states (Fig. 3a, black inset).

HA reduced the area of the open state (Fig. 3b, red inset), which resulted in a 60% decrease of the open probability (Fig. 3e). By contrast, single-channel  $I$ - $V$  relationships (Fig. 3c,d) indicated that HA did not affect the single-channel conductance.

Single-channel kinetics was further evaluated comparing dwell time histograms for the open and closed channel times in the CS ( $n=5$ ) and HA ( $n=4$ ; Fig. 3f-i). Inhibition of channel activity by HA became apparent from the increase in the number of long duration events in the closed time histograms (Fig. 3g,i). Fitting dwell time histograms to multiexponential density functions (3 to open events and 4 to closed)<sup>28</sup> indicated a significant and prominent effect of HA on the time constant of the longest closed state and its percent contribution to the total time that increased twofold in the presence of HA without any effect on open states. The values from dwell time fitted to multiexponential functions were CS ( $n=7$ ): in ms  $\tau_{o1} = 0.8 \pm 0.2$ ,  $\tau_{o2} = 7 \pm 2$ ,  $\tau_{o3} = 41 \pm 8$ ; in %  $A_{o1} = 39 \pm 3$ ,  $A_{o2} = 43 \pm 3$ ,  $A_{o3} = 18 \pm 3$ ; in ms  $\tau_{c1} = 0.3 \pm 0.1$ ,  $\tau_{c2} = 2.5 \pm 0.6$ ,  $\tau_{c3} = 28 \pm 10$ ,  $\tau_{c4} = 343 \pm 119$ ; in %  $A_{c1} = 55 \pm 6$ ,



**Figure 2 | Inhibition by HA of CAP-evoked currents in HEK-TRPV1 cells.** (a) Average *I*-*V* relationships before (blue symbols, CS) and after the application of 100 nM CAP (black symbols, CS + CAP; *n* = 19) and after the application of HA + 100 nM CAP (red symbols; *n* = 18) in HEK-TRPV1-EGFP(+) cells preincubated with HA for 30–60 min. Inset, *G*-*V* curves obtained from the *I*-*V* relationships. The values of different parameters were measured from the *I*-*V* ramps fit with the Boltzmann function  $I = gx(V - E_R)/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/S))$ . In control,  $G_{max} = 45 \pm 7$  nS,  $V_{1/2} = 151 \pm 12$  mV,  $z_g = 0.6$ , (*n* = 19), in the presence of HA:  $G_{max} = 22 \pm 2$  nS,  $V_{1/2} = 147 \pm 10$  mV,  $z_g = 0.7$  (*n* = 18). (b) The average current (left axis) and average conductance (right axis) at +80 mV obtained from the *I*-*V* relationship shown in a in the WT and TRPV1 K615A/R617A mutated channel. (c) Whole-cell currents at -60 mV in response to 1 μM CAP in CS (black trace) and cells preincubated with HA for 30–60 min (red trace). (d) The average values of peak currents evoked by 1 μM CAP at -60 mV in the WT and TRPV1 K615A/R617A mutated channel, in CS (black, *n* = 8) and in the presence of HA (red, *n* = 6). The data are represented as the mean ± s.e.m., Student's *t*-test: \*\**P* < 0.01; \**P* < 0.05; <sup>NS</sup>*P* > 0.5.

$A_{c2} = 20 \pm 3$ ,  $A_{c3} = 14 \pm 2$ ,  $A_{c4} = 8 \pm 1$ . HA (*n* = 6); in ms  $\tau_{o1} = 0.6 \pm 0.3$ ,  $\tau_{o2} = 4 \pm 1$ ,  $\tau_{o3} = 36 \pm 12$ , in %;  $A_{o1} = 36 \pm 7$ ,  $A_{o2} = 41 \pm 3$ ,  $A_{o3} = 23 \pm 4$ ; in ms  $\tau_{c1} = 0.8 \pm 0.2^*$ ,  $\tau_{c2} = 7 \pm 1^{**}$ ,  $\tau_{c3} = 76 \pm 20^*$ ,  $\tau_{c4} = 1023 \pm 188^*$ ; in %  $A_{c1} = 35 \pm 2^{**}$ ,  $A_{c2} = 28 \pm 2^*$ ,  $A_{c3} = 2 \pm 2^*$ ,  $A_{c4} = 14 \pm 2^*$ . No differences could be observed in the incidence of open states between the conditions (Student's *t*-test: \*\**P* < 0.01; \**P* < 0.05; <sup>NS</sup>*P* > 0.5).

Collectively, these data suggest that HA inhibited TRPV1 activity by stabilizing the channel in the closed state, thus reducing the open probability and lengthening the macroscopic activation rate.

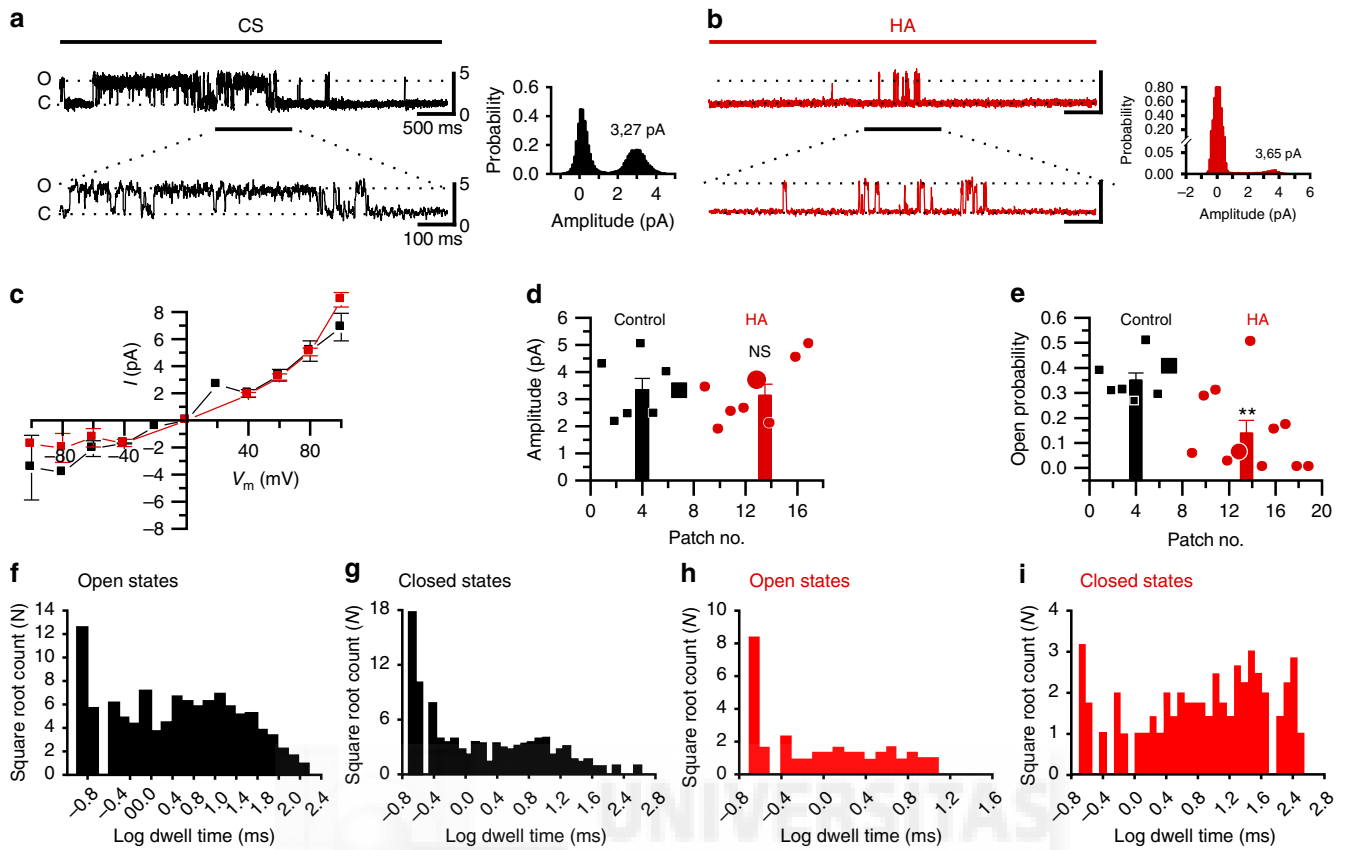
#### HA reduces capsaicin-evoked impulse firing in DRG neurons.

The observation that HA inhibits TRPV1 channels prompted us to investigate whether HA also influenced CAP-evoked action potential firing, which we recorded using the cell-attached mode in DRG neurons previously identified as TRPV1 positive by their  $[Ca^{2+}]_i$  response to heat (48 °C). All TRPV1-expressing neurons (*n* = 8) perfused with CS fired action potentials when treated with 1 μM CAP (Fig. 4a). The firing frequency of this CAP impulse discharge was reduced in DRG neurons exposed to HA (Fig. 4b). Four out of 10 heat-sensitive neurons did not fire action potentials in response to CAP despite their intact excitability, shown by the preserved responsiveness to 60 mM KCl (Fig. 4c,d). Therefore, these data demonstrated that the inhibition of TRPV1 activity by HA attenuated receptor-induced impulse firing in nociceptive neurons.

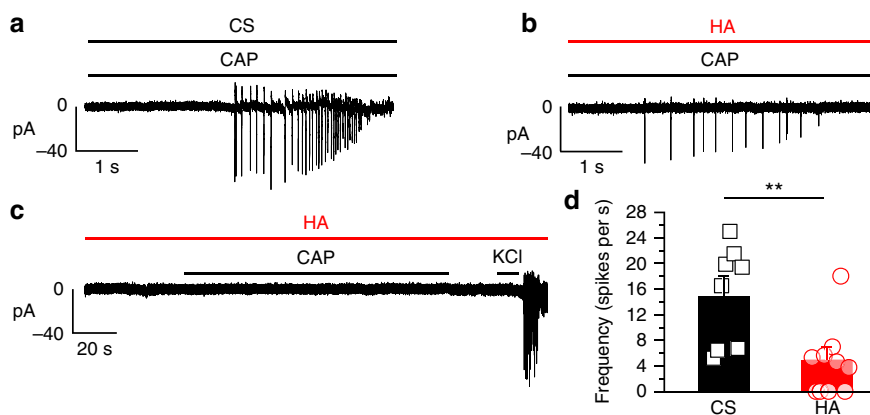
**HA prevents TRPV1 sensitization by bradykinin.** The sensitization of TRPV1 channels is a critical step in chronic pain<sup>29</sup>. Repetitive, short applications of 100 nM CAP to DRG neurons reached a stable amplitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  at approximately the 5th or 6th stimuli (Supplementary Fig. 4a,e). The application of 2 μM bradykinin 2 min before the 6th CAP pulse resulted in a significant increment of  $[Ca^{2+}]_i$ , showing TRPV1 potentiation by bradykinin<sup>23,30</sup> (Supplementary Fig. 4b,e,g). Notably, neuron exposure to HA inhibited such TRPV1 potentiation (Supplementary Fig. 4c), thus reflecting a decrease in bradykinin-induced channel sensitization (Supplementary Fig. 4d,f,g). These results confirm a direct action of HA on TRPV1 channels of sensitized peripheral sensory terminals.

#### HA reduced behavioural nocifensive responses to noxious heat.

To determine the effect of HA on nociceptive nerve terminals *in vivo*, we tested the latency of the pain response of mice to the hot plate test (52 °C) after subcutaneous injection in the paw of different solutions. In animals injected with saline solution, latency was significantly lower than in animals receiving HA (Fig. 5a). The increment in latency time promoted by HA was not observed in TRPV1 null mice (Fig. 5a). Similar results were obtained with subcutaneous CAP injection in the hind paw (Supplementary Fig. 5). Hyaluronidase (HyaSA), an enzyme that digests HA of the ECM around pain nerve terminals, caused a significant reduction in latency. Notably, the injection of HA into

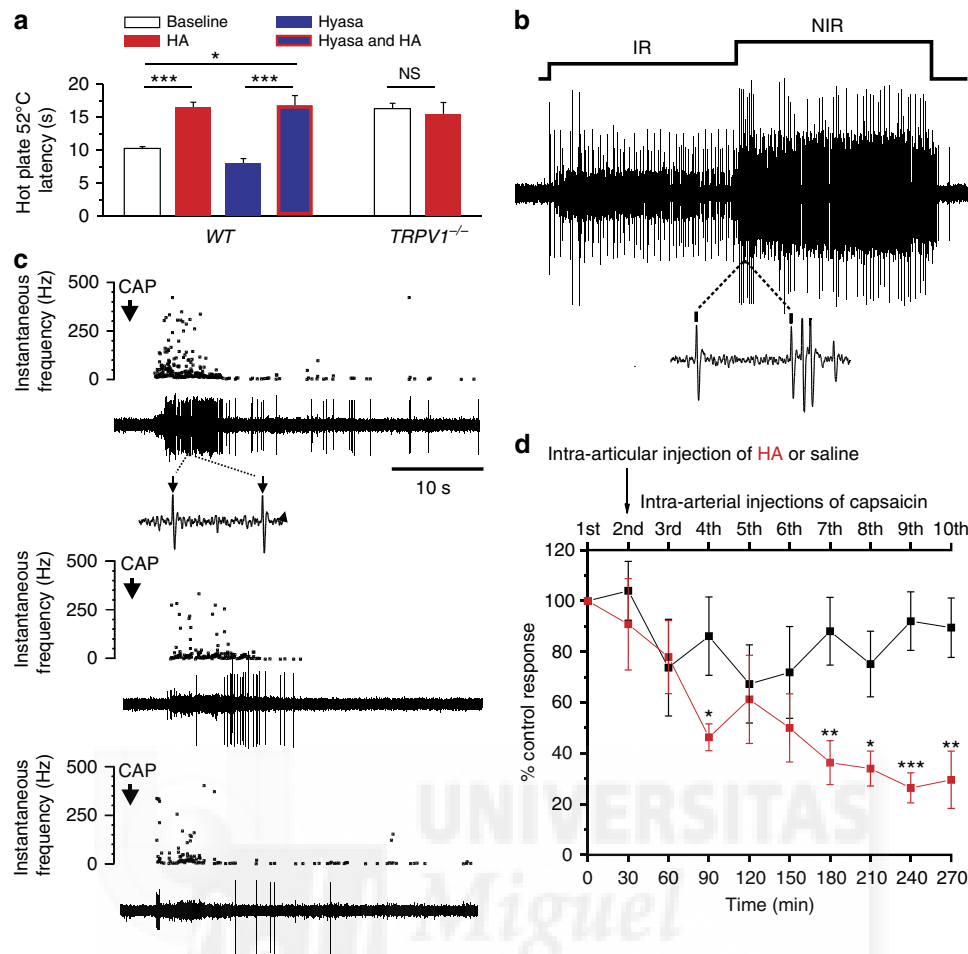


**Figure 3 | Modulation of TRPV1 single-channel activity by HA.** Recording in cell-attached patches of HEK-TRPV1-EFYP (+) cells of the single-channel activity evoked by 0.25  $\mu$ M CAP in the recording pipette. **(a)** A sample recording of TRPV1 single-channel activity under perfusion with CS. **(b)** A sample recording of single-channel activity from a cell preincubated 30–60 min in HA and recorded under perfusion with HA solution. Insets, single-channel amplitude probability histogram of each recording: black, control; red, in a patch treated with HA. The same scale bar values for **a** apply to **b**. **(c)** *I*-*V* curves obtained in CS (black symbols, *n* = 7) and after exposure to HA (red symbols, *n* = 8). **(d)** Single-channel amplitudes obtained from individual patches. The bars correspond to the mean values of single-channel amplitudes  $\pm$  s.e.m in each condition. **(e)** The open probability of different patches in CS (*n* = 7) in HA (*n* = 8). In **d** and **e** larger symbols represent the data from the measures performed in the traces shown in **a** and **b**. The bars represent the mean values of single-channel open probability  $\pm$  s.e.m. **(f–i)** The open and closed states dwell time distributions from the traces shown in **a** and **b**. Black, control; red, after treatment with HA. Long closing states that were infrequent in CS but increased their frequency in HA. All data were obtained at +60 mV. The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m., Student's *t*-test: \*\**P* < 0.01; <sup>NS</sup>*P* > 0.5.



**Figure 4 | Reduction of the impulse response of DRG neurons to CAP during HA exposure.** Electrophysiological recordings of adult cultured DRG neurons performed in the cell-attached configuration during the application of 1  $\mu$ M CAP, HP = –60 mV. **(a)** A sample record of the response to CAP in a single DRG neuron perfused with the control solution with a mean firing frequency of the response: 16 spikes per s **(b)** Sample record of CAP stimulation in a DRG neuron treated with HA and recorded under HA with a mean frequency of the response: 5 spikes per s. **(c)** A sample record of a DRG neuron treated and recorded in HA, in which no response to CAP was observed but an impulse discharge could be evoked with 60 mM KCl. **(d)** The mean firing frequency (columns) and individual data (symbols) of DRGs under CS, black (*n* = 8), and after exposure to HA, red (*n* = 10). Neurons that did not fire in response to KCl were excluded. Data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m., Student's *t*-test: \*\**P* < 0.01.





**Figure 5 | Effect of HA on behavioural nocifensive responses to noxious heat in mice and on nerve impulse activity of sensory nerve fibres innervating the rat knee joint.** (a) The latency of the first nocifensive response (licking, biting, lifting, guarding, shaking or jumping) obtained in wild-type or *TRPV1*<sup>-/-</sup> null mice in control conditions (baseline) or after receiving a 10  $\mu$ l injection of HA or Hyasa in the left paw or after receiving an injection of Hyasa followed by another injection of HA in WT ( $n = 25, 12, 11, 7$ ) and *TRPV1*<sup>-/-</sup> ( $n = 25, 18$ ). (b) Recording of the multiunit nerve impulse activity in a filament of the saphenous nerve, evoked by an inward rotation of the knee joint in the non-noxious (IR) and the noxious range (NIR) (10 s each). The dotted lines indicate an expanded recording during the marked time interval in which units of different amplitudes have been selected with an amplitude filter. (c) Nerve impulse activity evoked by the intra-arterial injection of 100  $\mu$ l of 10  $\mu$ M CAP (arrows) performed at 30 min intervals, in the same multiunit filament shown in b. In each panel, the instantaneous frequency is represented in the top and original nerve impulse recording, below. Separate units were identified by their amplitude and shape, CAP-evoked discharge started a few seconds after the onset of injection and lasted, on average,  $22 \pm 2$  s ( $n = 7$ ). The upper panel corresponds to the control CAP injection and includes an expanded view of the impulse firing during the time indicated between the dotted lines. Notice that this unit evoked by CAP has a similar spike morphology as one of the units recruited by joint rotation in b. Middle and lower panels depict the nerve impulse discharge evoked by intra-arterial injection of 10  $\mu$ M CAP 1 and 2.5 h, respectively, after intra-articular injection of 100  $\mu$ l of 1% HA. (d) The average values of the total number of CAP-evoked impulses over the period of time shown expressed as a percentage of the mean number of impulses evoked by the first (control) intra-arterial injection of CAP (100%). The arrow indicates the time at which either saline (black symbols,  $n = 7$ ) or HA (red symbols,  $n = 8$ ) were injected intra-articularly into knee joints. The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m., Student's *t*-test: \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ; NS $P > 0.5$ .

animals previously treated with Hyasa restored latency values to normal levels (Fig. 5a). Altogether, these results supported the hypothesis that HA reduces the sensitivity of nociceptor endings to noxious stimuli transduced by TRPV1 channels.

#### HA inhibits CAP-evoked activity in joint nociceptor fibres.

Nociceptor nerve fibres innervating the knee joint synovial membrane, express TRPV1 channels<sup>31</sup>. To explore the possibility that the modulation of nerve impulse activity by HA of the synovial fluid involves TRPV1 channels, we recorded nerve impulse activity in saphenous nerve filaments of anaesthetized rats, selecting polymodal units that responded to noxious rotations of the joint and also to a close intra-arterial, bolus

injection of CAP (Fig. 5b,c). In a thin nerve filament, CAP typically recruited 1–6 separate units, responding to CAP with an irregular nerve impulse discharge that started a few seconds after the onset of injection (Fig. 5c). In control experiments, in which intra-articular sterile saline solution was injected immediately after the first intra-arterial CAP injection, the number of impulses evoked by successive CAP injections decayed by a maximum of  $\leq 20\%$  of the impulse discharge produced by the first CAP injection, taken as 100% (control response, black symbols, Fig. 5d). By contrast, when HA was injected intra-articularly, the discharge evoked by serial CAP injections decayed gradually and was  $\geq 60\%$  (Fig. 5c,d). Collectively, these results confirmed that intra-articular HA significantly decreased TRPV1-mediated responsiveness of joint nociceptor fibres.



**HA does not modify TRPA1 or TRPM8 channel activity.** To explore the selectivity of HA inhibition on TRPV1 channels, we investigated its effects on TRPA1 and TRPM8, two thermo-sensory, polymodal TRP channels also expressed by primary sensory neurons<sup>32,33</sup>. For TRPA1 channels, we measured  $[Ca^{2+}]_i$  in recombinant systems and mouse-cultured DRG and nodose neurons perfused with CS or HA using nifedipine or cold (35–10 °C) to activate TRPA1 (ref. 34). HA did not affect TRPA1 activity (Supplementary Fig. 6 and Supplementary Table 2). In nodose sensory neurons, HA reduced by 30% CAP-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  elevations (Supplementary Fig. 6d) presumably mediated by TRPV1 without affecting responses to noxious cold (10 °C) or nifedipine (Supplementary Fig. 6c). Similarly, HA did not affect TRPM8 responses evoked with cold (20 °C), menthol, or cold combined with menthol application (Supplementary Fig. 6e,f). Thus, these data demonstrate that HA does not modulate TRPA1 or TRPM8 channels.

**A putative HA-interacting site in TRPV1 channels.** To bio-chemically isolate the complex between HA and TRPV1, we used biotin-conjugated HA and anti-TRPV1 to pull-down the (biotin)HA–TRPV1 complex. Notably, although with the obvious evidence of a functional interaction between both molecules, we could not isolate the complex, plausibly because it dissociates while washing non-specific binding. Alternatively, we used molecular modelling as a strategy to learn about the interaction between HA and TRPV1. HA binds to several extracellular membrane proteins through various hyaluronan-binding domains<sup>35</sup> and short linear sequences containing basic amino acids termed BX<sub>7</sub>B motifs<sup>36</sup>. To model the interaction of TRPV1 with hyaluronate, a global docking process between the extracellular loops of TRPV1, and a HA tetrasaccharide molecule was performed. A tetrasaccharide sufficed to show HA–receptor interactions, as evidenced by the crystal structure of the complex between HA and the CD44 hyaluronan-binding protein<sup>37</sup>.

The preferred location for putative HA binding in TRPV1 is a patch of positively charged amino acids (sequence 614–HKCRG-618 in rat, consensus [H(K/R)XRG]), located in the extracellular S5-pore helix loop and thus exposed to the solvent (Fig. 6a). Residues involved in the interaction, His614, Lys615 and Arg617, make prominent H-bond contacts with HA (Fig. 6b). In addition, interaction with Lys615 and Arg617 from the contiguous subunit, complete the contact map of HA (Fig. 6b). This putative binding site is consistent with HA receptor selectivity because TRPA1 does not have a positively charged signature in the extracellular domain (Fig. 6a) and thus shows a lower surface electrostatic potential in the external loops and poorer interaction with HA (Supplementary Fig. 7). Furthermore, mutation of K615 and R617 to Alanine (TRPV1 K615A/R617A) produced a mutant channel whose current density was not significantly reduced by HA (Fig. 2b,d). Moreover, the activation slope of this mutant was not affected by HA ( $42 \pm 22 \text{ pA ms}^{-1}$ ,  $n = 8$  and  $24 \pm 9 \text{ pA ms}^{-1}$ ,  $n = 10$ , respectively). Therefore, although we could not isolate the HA–TRPV1 complex, our mutagenesis strategy indicated the presence of an HA-binding site in the extracellular channel domain, which was consistent with the major effect of HA modulating the channel open probability and the activation kinetics.

## Discussion

The salient contribution of this study is the demonstration that TRPV1 channels are molecular targets of HA. We provide evidence that in the presence of HA, TRPV1 opens less frequently, thereby decreasing the excitability of peripheral

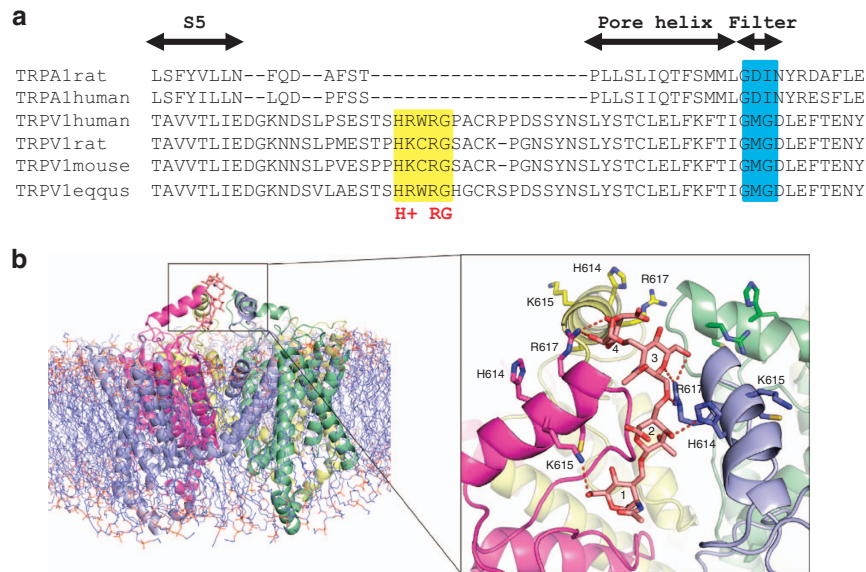
nociceptive neurons and reducing their responsiveness to noxious stimuli. Notably, HA selectively modulated TRPV1 channel function, whereas the activity of related TRP channels, also associated with sensory transduction of noxious and thermal stimuli such as TRPA1 and TRPM8, was not consistently affected by HA.

The inhibitory effect of HA on TRPV1 channels was shown using  $[Ca^{2+}]_i$  increases evoked by physical (heating to 48 °C) and chemical (CAP, low pH) stimulation of TRPV1. However, it should be noted that intracellular  $Ca^{2+}$  increased in sensory neurons reflect the overall inflow of calcium through membrane channels, namely TRPV1, directly opened by the stimuli but also  $Ca_v$  channels activated by TRPV1-induced membrane depolarization. We concluded that the HA inhibition of heat, low pH and CAP-evoked  $Ca^{2+}$  influx in sensory neurons appears to be mediated by an action on TRPV1 channels, rather than  $Ca_v$  channels: (i) HA did not block the  $Ca^{2+}$  influx induced by membrane depolarization with 60 mM KCl; (ii) reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  increase by HA was also observed when TRPV1 channels were expressed in HEK293 cells; (iii) electrophysiological measurements of TRPV1 channel activity showed that HA reduced the current flow by decreasing the open probability of channel gating; and (iv) the mutagenesis of the putative HA-binding site abrogated HA-mediated TRPV1 antagonism. We further showed that the HA inhibitory activity is independent of the stimulating conditions because HA blocked TRPV1 channels both when they are partially inactivated by repeated noxious stimulation or after being sensitized by bradykinin.

The most likely mechanism underlying HA inhibitory effects is that HA binds to the TRPV1 channel protein and modulates its gating. Our results indicate that HA inhibition of TRPV1 is mediated by a stabilization of the channel closed state. A similar blockade mechanism has been proposed for the inhibitory activity of a polyclonal antibody that binds to the pre-pore loop of TRPV1 (ref. 38). Eleven antibodies, targeting the pore domain of different channels have been identified<sup>39</sup>; our *in silico* docking analysis showed a high probability for an electrostatic-type interaction between HA and a short positively charged sequence 'H + xRG' located in the external pore domain. This sequence overlaps with the receptor region that holds the binding epitope in TRPV1 of polyclonal functional antibodies<sup>38</sup>. This concurrence supports a common mechanism for HA and polyclonal antibody blockade of TRPV1 channels and identifies a pivotal site for TRPV1 channel modulation. Altogether, our functional results, along with the *in silico* analysis, suggest a direct HA–TRPV1 interaction that downregulates channel activity.

The question arises on how HA could modulate TRPV1 gating. A reasonable molecular explanation according to the most recent structural model of TRPV1 (ref. 40) is that the polymer, by immobilizing the outer pore loop, obstructs this conformational change preventing the associated movement of the pore helix necessary to open the external gate, thereby locking the channel in the closed state. It is also plausible that HA additionally bridges distinct regions on the extracellular domains (S5–P–S6 loop) of the adjacent subunits and even between near TRPV1 channels, clustering the channels and building a complex net or a macromolecular aggregate on the membrane surface. Noteworthy, clustering of TRPV1 receptors in the cell surface inhibits channel activity<sup>41</sup>.

TRPV1 is widely distributed in peripheral and central nervous system neurons and in non-neural tissues<sup>42,43</sup> and has been implicated in a variety of functions, including thermo- and osmoregulation, memory processes or smooth muscle contraction<sup>44,45</sup>. Still, the best established role for TRPV1 is to be a molecular detector of thermal and chemical stimuli that



**Figure 6 | Atomic interactions of hyaluronan tetrasaccharide docked to TRPV1 model.** (a) Details of the TRPV1 multiple sequence alignment of four species, showing the conservation of the positive patch predicted to interact with HA. Additionally, detail of the multiple sequence alignment between TRPV1 and TRPA1 in different species. A large deletion in TRPA1 S5-pore helix loop losing positively charges could be observed. (b) TRPV1 channel model inserted in a lipid bilayer. The proteins are drawn as a ribbon and coloured differently for each subunit. The cytosolic C and N termini have been removed for simplicity. The black square delimits the extracellular loops of TRPV1 and the docked HA. Hyaluronan tetrasaccharide is drawn as sticks and coloured in pastel pink. The numbers indicate the sugar rings, starting from the non-reducing end. The loop side chains involved in the interaction are shown as sticks and coloured accordingly to the colour of its subunit. The dotted lines in red denote hydrogen bonds between atoms closer than 3.2 Å.

activate the sensory neurons to produce acute or persistent pain and inflammation<sup>29</sup>.

Pain in osteoarthritis, the leading cause of physical disability in industrialized nations<sup>46</sup> is the main symptom in the disease and appears to be associated with TRPV1 expression in humans<sup>47</sup> and animal models of chronic osteoarthritis<sup>22,48–50</sup>. Intra-articular injection of HA decreases joint nociceptor activity in animals and reduces osteoarthritis pain in humans<sup>9,16–18</sup>. The current explanation for HA effects on joint nociception is that in intact joints synovial fluid HA acts as an elastoviscous filter for mechanical forces and selectively reduced the transmission during movement of potentially injurious forces to joint structures and nociceptor nerve terminals<sup>51</sup>. When healthy high molecular weight HA (HMW-HA) is broken into its smaller size HA, this elastoviscous filtering capacity decreases. Accordingly, HMW-HA solutions reduce the opening probability of stretch-activated channels in oocytes *in vitro*<sup>7</sup> and cause a pronounced reduction of movement-induced nociceptor activity when injected intra-articularly in experimentally injured and inflamed knee joints of rats and guinea pigs<sup>10,11</sup>. Our results show that synovial fluid HA seems to play additional roles in the modulation of joint nociceptor fibres activity in addition to mechanical filtering. Our results show that healthy HA antagonizes TRPV1 activity and significantly decreases nociceptor excitability also in channels sensitized by the pro-algesic agent bradykinin, thus adding an additional mechanistic explanation to the anti-nociceptive effects of intra-articular HA injections and the possibility of new therapeutic uses of HA. Finally, TRPV1 expression also occurs in other joint cell types, as chondrocytes, osteoclasts, osteoblasts and synovial fibroblasts<sup>42</sup>. Hence, synovial HA, through its inhibitory action on TRPV1 channels in these cells, may also modulate other important biological processes (degeneration, healing) triggered by joint injury and inflammation<sup>52</sup>.

There is emerging evidence that ECM molecules surrounding neurons, which include HA as a major biochemical component, regulate synaptic plasticity in the adult brain<sup>8,53,54</sup>. TRPV1 has been

recently identified in neurons and glial cells of various areas of the central nervous system and is associated with a wide array of functions and behaviours<sup>55,56</sup>. For instance, TRPV1 channels in hippocampal neurons contribute to modulate neuronal excitability and their stimulation with CAP enhances 4-AP-induced epileptiform activity *in vitro* and triggers bursting, seizure-like activity *in vivo*<sup>57</sup>. Furthermore, it has been proposed that TRPV1 plays a regulatory role on cortical excitability as well<sup>58</sup>. Hence, it is tempting to speculate that HA of the perineuronal ECM modulates TRPV1 channel activity of hippocampal cells thereby contributing to the control of brain excitability.

## Methods

**Animals.** The studies were performed in neonatal and adult C57BL/6J OlaHsd male mice and in adult (1–3 months) *TRPV1*<sup>-/-</sup> mice (Jackson Laboratory) and Wistar male adult (3–4 months) rats. All experimental procedures were performed according to the Spanish Royal Decree 1201/2005 and the European Community Council directive 2010/63/EU. The Ethics Committee from Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain, approved this study.

**Culture of cells and neurons.** The experiments were performed on primary cultures of TRPV1-, TRPM8-, and TRPA1-expressing DRG or Nodose neurons. Previously described culture methods were used for DRG neurons from P1 to P4 and adult mice (1 month)<sup>59</sup> and nodose ganglion neurons from adult mice (1 month)<sup>34</sup>. The HEK293 cell line (Sigma-Aldrich) transfected with TRPV1 + EYFP fusion protein<sup>60</sup>, N604T-TRPV1-EYFP, K615A/R617A-TRPV1 or hTRPA1 cloned in pAGGS-IRES-GFP (Karel Talavera, Department of Cellular and Molecular Medicine, KU Leuven, Belgium) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or the CHO-TRPA1 stable cell line (Ardem Patapoutian, The Scripps Research Institute, USA) or HEK293-mTRPM8-YFP cell line (Felix Viana, Instituto de Neurociencias, Alicante, Spain) were used. In some experiments, we used the human neuroblastoma cell line SHSY5Y stably expressing TRPV1 kindly provided by J. Lilja and A. Forsby (Department of Neurochemistry, Stockholm University, Sweden).

TRPV1 mutagenesis: mutations were introduced in the rat TRPV1 construct (from D. Julius) using the Site Directed Mutagenesis (Quick Change II, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Mutants were confirmed by DNA sequencing.

**Fluorimetric Ca<sup>2+</sup> measurements.** The intracellular Ca<sup>2+</sup> measurements were performed in single cells loaded with FURA-2AM (Life Technologies, Carlsbad,

CA, USA) for 45 min at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. The recordings were performed in a low-volume chamber with a complete solution exchange. Bath control solution contained (in mM) 140 NaCl, 3 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES and 10 Glucose adjusted to pH 7.4 with Na(OH). Fluorescence measurements were conducted with a Nikon (Nikon Eclipse TE2000-U) inverted microscope. FURA-2 was excited at 340 and 380 nm with a high-speed monochromator (TILL Photonics, Germany), and the emitted fluorescence was long-pass filtered at 510 nm. The images were acquired using an Andor camera (Oxford Instruments, UK). Acquisition and analysis were performed with TILL vision software (TILL Photonics GmbH, Germany). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases are presented as the ratio of the emission intensities of 340 and 380 nm ( $F_{340/380}$ : fluorescence arbitrary units). The DRG and nodose ganglion neurons were measured at 37 °C. The cell lines were measured at 20–22 °C, unless otherwise indicated.

**Temperature stimulation.** The coverslip pieces with cultured cells were placed in a micro-chamber and continuously perfused (0.5 ml min<sup>-1</sup>) with solutions warmed at 35 ± 1 °C for neurons and 21 ± 1 °C for cell lines. Temperature stimulation was adjusted with a water-heated peltier device placed at the inlet of the chamber and controlled by a feedback device (Warner instruments, Hamden, USA). Heat sensitivity was investigated with fast increase of temperature to 48 °C (ramp of temperature 5 s per °C).

**Electrophysiology in cultured cells.** For whole-cell recordings, the bath solution contained (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES and 10 glucose adjusted to pH 7.4 with Na(OH) and a pipette solution containing (in mM) CsCl, 5 EGTA and 10 HEPES, adjusted to pH 7.2 with Cs(OH). DRG action currents were recorded using a pipette solution with a concentration of (in mM) 140 KCl, 10 NaCl, 4 Mg-ATP, 0.4 Na-GTP, 10 Hepes pH 7.2 adjusted with KOH, external solution contained (in mM) 140 NaCl, 3 KCl, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose and 10 HEPES, adjusted to pH 7.4 with Na(OH). For single-channel cell-attached configuration, recordings were performed with a bath solution containing (in mM): 140 K-gluconate, 2.5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 1.5 EGTA, adjusted to pH 7.4 with K(OH), the pipette solution contained (in mM) Na-gluconate 140, NaCl 10, MgCl<sub>2</sub> 1, 5 HEPES, 1.5 EGTA adjusted pH 7.2 with Na(OH). Measurements in neurons were performed at 37 °C. Measurements in the cell lines were performed at 20–22 °C, unless otherwise indicated.

Membrane currents in whole cell and action currents in cell-attached configurations were recorded using 5–8 MΩ borosilicate glass capillary patch pipettes. Current signals were recorded with a Multiclamp 700B amplifier and voltage clamp commands were applied using pCLAMP software and a Digidata 1322A digitizer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Single-channel, cell-attached recordings were obtained using 10–15 MΩ borosilicate glass capillary patch pipettes in cell-attached configuration maintaining the signalling pathways. The cells were fixed at 0 mV with high-K<sup>+</sup> extracellular solution. Capsaicin was applied via the patch pipette at 0.25 μM concentration to prevent activation of channels elsewhere in the cell, which may have increased the noise of recording<sup>28</sup>. Current signals were recorded using Axopatch 2B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) patch-clamp amplifier and voltage clamp commands were applied using pCLAMP10 software and a Digidata 1400A digitizer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Data were collected with the filter set at 2 kHz and sampling frequency 50 kHz.

**Electrophysiological data analysis.** Electrophysiological analysis were performed using pCLAMP10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), WinASCD software (G. Droogmans, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium), and Origin 7.5, OriginLab Corp., Northampton MA, USA). In whole-cell configuration, to estimate whether there was a shift in the voltage dependence of activation of TRPV1 in HEK 293 cells, the current–voltage (*I*–*V*) relationships obtained from repetitive (0.2 Hz) voltage ramps from –120 to +150 mV with a duration of 350 ms applied every 3 s were fitted with a function that combines a linear conductance multiplied by a Boltzmann activation term<sup>27</sup>:

$$I = \frac{g \times (V - E_R)}{1 + e^{(V_{1/2} - V)/\text{Slope}}}$$

where *g* is the whole-cell conductance, *E<sub>R</sub>* is the reversal potential of the current, *V*<sub>1/2</sub> is the potential for half-maximal activation and Slope is the slope factor, which related to the effective gating valence *z<sub>g</sub>* of channel gating by *z<sub>g</sub>* = 25.60 mV per slope.

Single-channel data analysis was performed on patches that contain 1–2 channels. The recordings were analysed with the pCLAMP10.2 Clampfit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The mean open probability (*oP*) was measured as from the average *noP*, where *n* is the number of channels in the patch.

To determinate the distribution of channel open and closed times, dwell time histograms were created, where the square root of number of events *N* was plotted against the dwell time binned on a logarithmic time scale (10 bins per decade).

Dwell time distributions of the open and closed times were fitted to multiexponential density function of the form:

$$Y = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i}$$

where, *τ<sub>i</sub>* is the time constant of the *i*-th equilibrium and *A<sub>i</sub>* is its amplitude.

All data were expressed as the means (± s.e.m.). Statistical tests included a one-way analysis of variance, the Z-test for comparing proportions and Student's *t*-test, as indicated. Differences were regarded as statistically significant with <sup>NS</sup>*P* > 0.05, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001.

**Behavioural nociception assays.** Adult (3 months) male mice were housed with a 12-h light/dark cycle at 21 °C with food and water *ad libitum*. The mice were habituated to the test environment for 24 h in Plexiglas chambers before the nociception assays and the testing chambers for at least 1 h before testing. The same investigator performed the scoring in all of the behavioural tests, which were blind with respect to the different solutions injected.

We performed intra-plantar injections (into the hind pad of both paws) of hyaluronidase (Sigma-Aldrich) dissolved in physiological control saline (Hyasa (6U)) or 10 μl of HA solution of high molecular weight HA (average MW = 5.2 MDa) at 400 μg ml<sup>-1</sup> using a 30-G needle. A separate group of animals received a vehicle injection alone. To measure sensitivity to noxious heat, the hot plate test was performed. The temperature of the hot plate was maintained at 52 ± 0.5 °C by a feedback-controlled Peltier device (LE7406Hot Plate, Harvard Apparatus). The latency time to the onset of one of the following nociceptive behaviours was measured: licking, biting, lifting, guarding or shaking of the hind paws, or jumping. Once a score was determined, the heating was switched off. A cut-off time of 30 s was established to avoid tissue injury. The hot plate test was performed every 4, 12, 24 and 72 h and 7–14 days after injection. Capsaicin (1 μg per 10 μl) was injected intradermally into the hind pad, and the duration and score of nociceptive behavior was recorded. In a separate group of mice, these previously (48 h) received an injection of 10 μl HA (average molecular weight = 5.2 MDa).

**Electrophysiological recordings in rat knee joint fibres.** The experiments were performed in 16 Wistar adult (3–4 months) male rats (mean body weight: 366 ± 10 g) as previously described<sup>61</sup>. Briefly, the animals were initially anaesthetized with ketamine (75 mg kg<sup>-1</sup>) and xylazine (10 mg kg<sup>-1</sup>) (i.p.) followed by an injection of 40 mg kg<sup>-1</sup> (i.p.) of sodium pentobarbital for deep anaesthesia. Supplementary doses of anaesthetic were injected through a venous catheter when required. The trachea, the left femoral vein and femoral artery were cannulated. Body temperature and CO<sub>2</sub> were maintained at physiological levels. Heart frequency and blood pressure values were continuously monitored to evaluate the anaesthesia level. An additional catheter was inserted into the right saphenous artery for close intra-arterial injection of substances into the joint area. The right femur was fixed by a special grip, and a pool was formed by skin flaps and filled with warm paraffin oil. The saphenous nerve from the right leg was dissected, and fine filaments were sub-dissected from the peripheral end and placed over a silver wire electrode for extracellular recording.

**Molecular modelling.** A TRPV1 model derived from electron microscopy<sup>61</sup> was used as the starting point to model the absent external loops (604–626) located between the TM S5 and pore helix. TRPA1 was modelled by homology using the spatial coordinates of TRPV1 homology model. The homology models were performed in the Swiss-Model Protein Modelling Server<sup>62</sup> at ExPASy Molecular Biology site (<http://kr.expasy.org/>). The assembly of the channels and construction of the missing external loops were performed using DeepView v4.1 (ref. 63), and Yasara<sup>64</sup> (<http://www.yasara.org>). The side chains were optimized in two steps: first, residues with van der Waals clashes were selected and fitted with 'Quick and Dirty' algorithms (DeepView); second, the model was energy minimized. This process involved an initial short steepest descent minimization to remove bumps and a simulated annealing minimization<sup>65</sup>. The model was evaluated using PROCHECK to show residues in the allowed regions of the Ramachandran plots<sup>66</sup>. In addition, the model was tested in terms of energy with FoldX<sup>67</sup> at the CRG site (<http://foldx.crg.es>). The force field of FoldX evaluated the properties of the structure, such as its atomic contact map, the accessibility of the atoms and residues, the backbone dihedral angles, and the hydrogen bond and electrostatic networks of the protein.

TRPV1- and TRPA1-carbohydrate complexes were built using the homology models and the hyaluronan molecule (CID 24847767) obtained from the PubChem Compounds database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>). A global docking procedure was accomplished with AutoDock 4 (Morris, 2008) implemented in Yasara, where a total of 500 flexible docking runs were established and clustered around the putative binding sites. Using the implemented AMBER 99 force field, the programme then performed a simulated annealing minimization of the complexes that moved the structure to a nearby stable energy minimum<sup>68</sup>. Binding energy was obtained by calculating the energy at an infinite distance between the ligand and channel tetramer and subtracting the energy of the entire complex. The more positive the binding energy, the more favourable the interaction was in the context of the force field. The best binding energy complex in each cluster was stored, analysed and used to select the best orientation of the interacting partners. Figures were drawn with Pymol v1.6 (DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA; <http://www.pymol.org>).

**Reagents.** Sodium hyaluronate solution 400 μg ml<sup>-1</sup>, high molecular weight (≈ 5.2 MDa; Matrix Biology Institute, Edgewater, NJ, USA), Hyaluronidase,



capsaicin, bradykinin, cinnamaldehyde, nifedipine, mustard oil and carbachol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), and menthol from Sharlau (Spain).

Data are reported as the mean  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m). Statistical significance \*\*\* $P$ <0.001, \*\* $P$ <0.01, \* $P$ <0.05 was assessed by Student's  $t$ -test.

## References

- Fraser, J. R., Laurent, T. C. & Laurent, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **242**, 27–33 (1997).
- Dicker, K. T. *et al.* Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater.* **10**, 1558–1570 (2014).
- Balazs, E. A. The viscoelastic intercellular matrix and control of cell function by hyaluronan. in *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*. (ed. Laurent, T. C.) 185–204 (Portland Press, 1998).
- Evanko, S. P., Tammi, M. I., Tammi, R. H. & Wight, T. N. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1351–1365 (2007).
- Scheibner, K. A. *et al.* Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.* **177**, 1272–1281 (2006).
- Garg, H. G. & Hales, C. A. *Chemistry and Biology of Hyaluronan* 1st edition (Elsevier, 2004).
- De la Peña, E., Sala, S., Rovira, J. C., Schmidt, R. F. & Belmonte, C. Elastoviscous substances with analgesic effects on joint pain reduce stretch-activated ion channel activity *in vitro*. *Pain* **99**, 501–508 (2002).
- Kochlamazashvili, G. *et al.* The extracellular matrix molecule hyaluronan acid regulates hippocampal synaptic plasticity by modulating postsynaptic L-type Ca(2+) channels. *Neuron* **67**, 116–128 (2010).
- Pozo, M. A., Balazs, E. A. & Belmonte, C. Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative. *Exp. Brain Res.* **116**, 3–9 (1997).
- Gomis, A., Pawlak, M., Balazs, E. A., Schmidt, R. F. & Belmonte, C. Effects of different molecular weight elastoviscous hyaluronan solutions on articular nociceptive afferents. *Arthritis Rheum.* **50**, 314–326 (2004).
- Gomis, A., Miralles, A., Schmidt, R. F. & Belmonte, C. Nociceptive nerve activity in an experimental model of knee joint osteoarthritis of the guinea pig: effect of intra-articular hyaluronan application. *Pain* **130**, 126–136 (2007).
- Balazs, E. A. in *Disorders of the Knee* (ed. Helfet, A.) 61–74 (J.B. Lippincott, 1982).
- Balazs, E. A. & Denlinger, J. L. Clinical uses of hyaluronan. *Ciba Found. Symp.* **143**, 265–275 discussion 275–280, 281–265 (1989).
- Sampson, P. M., Rochester, C. L., Freundlich, B. & Elias, J. A. Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic acid) production. Evidence for cytokine-regulated hyaluronan (hyaluronic acid) degradation and human lung fibroblast-derived hyaluronidase. *J. Clin. Invest.* **90**, 1492–1503 (1992).
- Natura, G. *et al.* Neuronal prostaglandin E2 receptor subtype EP3 mediates antinociception during inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 13648–13653 (2013).
- Bert, J. M. & Waddell, D. D. Viscosupplementation with hylan g-f 20 in patients with osteoarthritis of the knee. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* **2**, 127–132 (2010).
- Chevalier, X. *et al.* Single, intra-articular treatment with 6 ml hylan G-F 20 in patients with symptomatic primary osteoarthritis of the knee: a randomised, multicentre, double-blind, placebo controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 113–119 (2010).
- Ayhan, E., Kesmezacar, H. & Akgun, I. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World J. Orthop.* **5**, 351–361 (2014).
- Gingerich, D. A., Auer, J. A. & Fackelman, G. E. Effect of exogenous hyaluronic acid on joint function in experimentally induced equine osteoarthritis: dosage titration studies. *Res. Vet. Sci.* **30**, 192–197 (1981).
- Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824 (1997).
- Gauldie, S. D., McQueen, D. S., Pertwee, R. & Chessell, I. P. Anandamide activates peripheral nociceptors in normal and arthritic rat knee joints. *Br. J. Pharmacol.* **132**, 617–621 (2001).
- Szabo, A. *et al.* Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: *in vivo* study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 111–119 (2005).
- Huang, J., Zhang, X. & McNaughton, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr. Neuropharmacol.* **4**, 197–206 (2006).
- Honore, P. *et al.* A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 410–421 (2005).
- Reilly, R. M. *et al.* Pharmacology of modality-specific transient receptor potential vanilloid-1 antagonists that do not alter body temperature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **342**, 416–428 (2012).
- Voets, T. *et al.* The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748–754 (2004).
- Nilius, B. *et al.* The Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *EMBO J.* **25**, 467–478 (2006).
- Studer, M. & McNaughton, P. A. Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *J. Physiol.* **588**, 3743–3756 (2010).
- Julius, D. TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 355–384 (2013).
- Cesare, P. & McNaughton, P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 15435–15439 (1996).
- Fernihough, J., Gentry, C., Bevan, S. & Winter, J. Regulation of calcitonin gene-related peptide and TRPV1 in a rat model of osteoarthritis. *Neurosci. Lett.* **388**, 75–80 (2005).
- Story, G. M. *et al.* ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819–829 (2003).
- Bautista, D. M. *et al.* The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* **448**, 204–208 (2007).
- Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C. & Viana, F. TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J. Neurosci.* **28**, 7863–7875 (2008).
- Bost, F., Diarra-Mehrpour, M. & Martin, J. P. Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family—a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. *Eur. J. Biochem.* **252**, 339–346 (1998).
- Yang, B., Yang, B. L., Savani, R. C. & Turley, E. A. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. *EMBO J.* **13**, 286–296 (1994).
- Banerji, S. *et al.* Structures of the Cd44-hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 234–239 (2007).
- Klionsky, L. *et al.* A polyclonal antibody to the prepore loop of transient receptor potential vanilloid type 1 blocks channel activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 192–198 (2006).
- Naylor, J. & Beech, D. J. Extracellular ion channel inhibitor antibodies. *Open Drug Discov. J.* **1**, 36–42 (2009).
- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. & Julius, D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* **504**, 113–118 (2013).
- Lainez, S. *et al.* GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *FASEB J.* **24**, 1958–1970 (2010).
- Engler, A. *et al.* Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 884–888 (2007).
- Menigoz, A. & Boudes, M. The expression pattern of TRPV1 in brain. *J. Neurosci.* **31**, 13025–13027 (2011).
- Bevan, S., Quallo, T. & Andersson, D. A. Trpv1. *Handb. Exp. Pharmacol.* **222**, 207–245 (2014).
- Fernandes, E. S., Fernandes, M. A. & Keeble, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 510–521 (2012).
- Zhang, W. *et al.* OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 476–499 (2010).
- Valdes, A. M. *et al.* The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1556–1561 (2011).
- Schaible, H. G., Ebersberger, A. & Von Banchet, G. S. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.* **966**, 343–354 (2002).
- Cho, W. G. & Valtchanoff, J. G. Vanilloid receptor TRPV1-positive sensory afferents in the mouse ankle and knee joints. *Brain Res.* **1219**, 59–65 (2008).
- Kelly, S. *et al.* Increased function of pronociceptive TRPV1 at the level of the joint in a rat model of osteoarthritis pain. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 252–259 (2013).
- Balazs, E. A. Viscoelastic properties of hyaluronan acid and its therapeutic use. In: *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. (eds Grag, H. G. & Hales, C. A.) 415–455 (Elsevier, 2004).
- Gavenis, K. *et al.* Expression of ion channels of the TRP family in articular chondrocytes from osteoarthritic patients: changes between native and *in vitro* propagated chondrocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **321**, 135–143 (2009).
- Dityatev, A., Schachner, M. & Sonderegger, P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 735–746 (2010).
- Hylin, M. J., Orsi, S. A., Moore, A. N. & Dash, P. K. Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning. *Learn. Mem.* **20**, 267–273 (2013).
- Martins, D., Tavares, I. & Morgado, C. ‘Hotheaded’: the role OF TRPV1 in brain functions. *Neuropharmacology* **85**, 151–157 (2014).

56. Edwards, J. G. TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. *Prog. Drug Res.* **68**, 77–104 (2014).
57. Gonzalez-Reyes, L. E., Ladas, T. P., Chiang, C. C. & Durand, D. M. TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity in vitro and electrographic seizures in vivo. *Exp. Neurol.* **250**, 321–332 (2013).
58. Mori, F. *et al.* TRPV1 channels regulate cortical excitability in humans. *J. Neurosci.* **32**, 873–879 (2012).
59. Viana, F., de la Pena, E., Pecson, B., Schmidt, R. F. & Belmonte, C. Swelling-activated calcium signalling in cultured mouse primary sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 722–734 (2001).
60. Cabedo, H., Carteron, C. & Ferrer-Montiel, A. Oligomerization of the sensory and motor neuron-derived factor prevents protein O-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 33623–33629 (2004).
61. Gomis, A. *et al.* Blockade of nociceptive sensory afferent activity of the rat knee joint by the bradykinin B2 receptor antagonist fasisitabant. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 1346–1354 (2013).
62. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3381–3385 (2003).
63. Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723 (1997).
64. Krieger, E., Darden, T., Nabuurs, S. B., Finkelstein, A. & Vriend, G. Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space. *Proteins* **57**, 678–683 (2004).
65. Fernandez-Ballester, G. & Ferrer-Montiel, A. Molecular modeling of the full-length human TRPV1 channel in closed and desensitized states. *J. Membr. Biol.* **223**, 161–172 (2008).
66. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486 (1996).
67. Schymkowitz, J. *et al.* The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* **33**, W382–W388 (2005).
68. Duan, Y. *et al.* A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* **24**, 1999–2012 (2003).

## Acknowledgements

We thank E. Quintero, A. Miralles, V.J. Rodriguez and C. Pérez for technical assistance and S. Ingham for illustrations. We also acknowledge the help of Salvador Sala in initiating EP in the technique of single-channel recordings and providing the set-up. We also thank Felix Viana, for critical comments and Janet Denlinger for useful

suggestions and support. This work was supported by funds from the Matrix Biology Institute (USA); grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness BFU2008-04425 (CB), SAF2014-545.18-C3-2-R (CB), BFU2012-39092-C02-01 (AFM) and SAF2013-45608-R (AG), CONSOLIDER-INGENIO 2010, and CSD2008-00005 (AFM); PROMETEO/2014/011 from the Generalitat Valenciana (AFM and CB); and a fellowship from the Generalitat Valenciana to RC. The Instituto de Neurociencias is a 'Centre of Excellence Severo Ochoa.'

## Author contributions

R.C. performed and analysed most of the calcium imaging experiments and behavioural studies; E.L. contributed to the calcium-imaging experiments; F.J.T. performed immunopurification and mutagenesis; G.F.-B. performed modelling and docking studies; A.F.-M. designed the biochemical and docking experiments; E.A.B. inspired the study of HA effects on nociceptors, discussed results and provided the HA; A.G. and E.d.l.P. conceived, performed and analysed whole-cell patch-clamp, single-channel and extracellular recordings in nerve fibres and contributed to the calcium-imaging experiments; E.d.l.P. and C.B. planned the study and coordinated the project. E.d.l.P., C.B. and A.F.-M. wrote the manuscript.

## Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** E.A.B. and C.B. are members of the Board of the Matrix Biology Institute (MBI), a non-profit organization that provided partial support to this study. Both are co-inventors of a patent on the analgesic effects of hyaluronan filed and owned by the MBI. The remaining authors of this paper do not have financial interests related to this work.

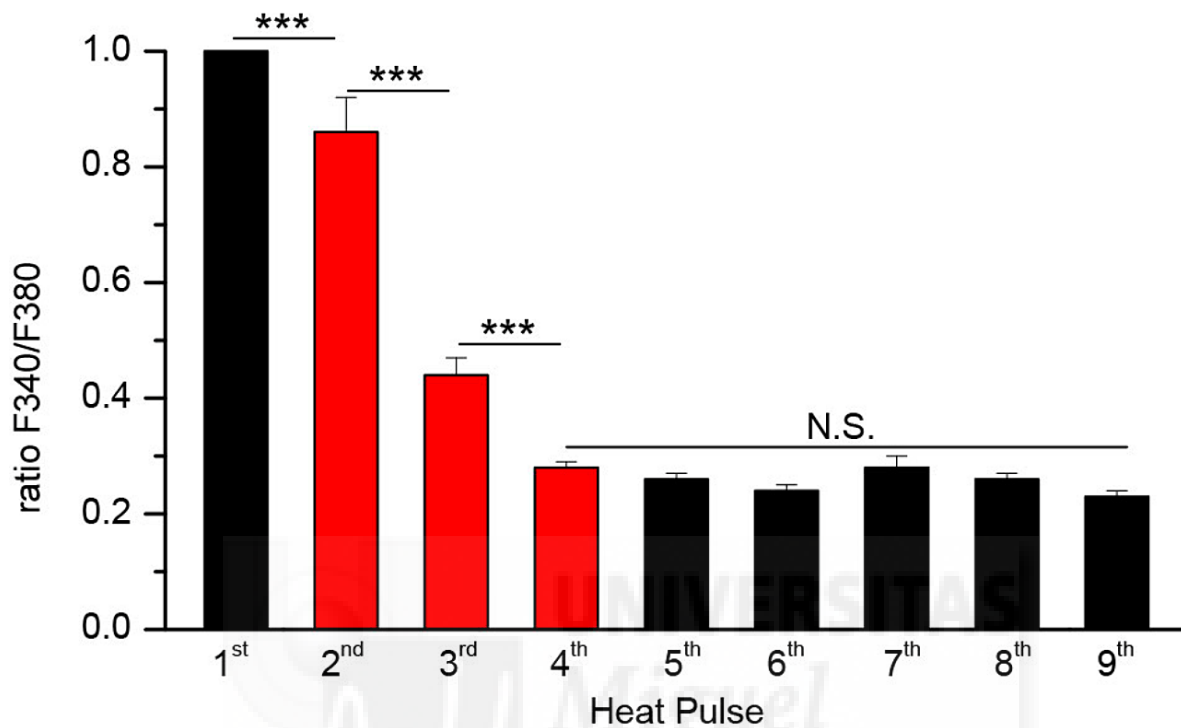
**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Caires, R. *et al.* Hyaluronan modulates TRPV1 channel opening, reducing peripheral nociceptor activity and pain. *Nat. Commun.* **6**:8095 doi: 10.1038/ncomms9095 (2015).



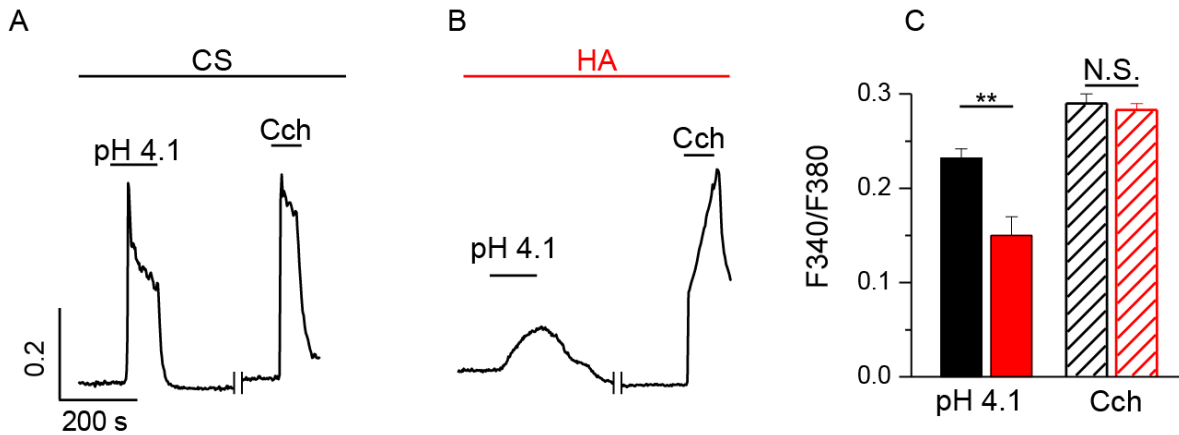
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## Supplementary Figure 1



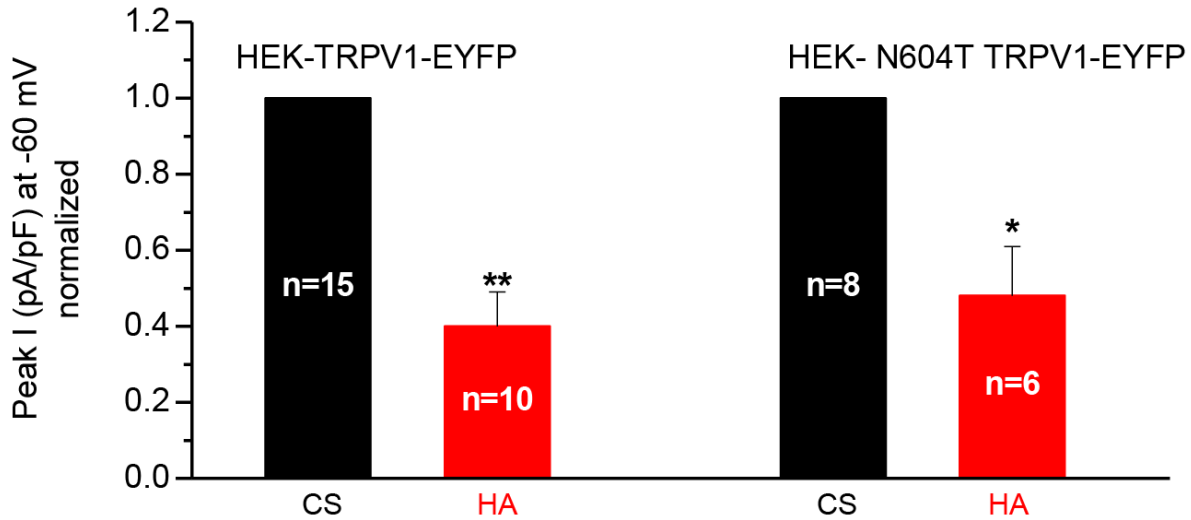
**Supplementary Figure 1. Washing does not reverse the inhibitory effect HA on intracellular calcium responses to heat in HEK-TRPV1-EYFP (+) cells.** The average amplitude change of responses to successive heat pulses (48 °C) applied at 10 min intervals in cells (n=49) perfused with CS (black bars) and with a HA solution (red, bars). The maximal inhibitory effect was reached 30 min after the onset of perfusion with HA (4<sup>th</sup> pulse) and persisted after re-perfusion with CS. The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m., Student's t-test \*\*\* $P < 0.001$ , <sup>N.S.</sup>  $P > 0.05$ .

## Supplementary Figure 2



**Supplementary Figure 2. Intracellular calcium change in a HEK-TRPV1-EYFP (+) cells in response to pH=4.1 .A**, in cells perfused with CS and **B**, after exposure to HA initiated 30-60 min earlier. **C**. The average amplitude of the response to pH=4.1 (filled bars) and 100  $\mu$ M Carbachol (Cch, striped bars, n=100) under perfusion with CS (black, n=74) and HA (red, n=10). The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m., (Student's t-test \*\* $P$ <0.01, <sup>N.S.</sup>  $P$ >0.05

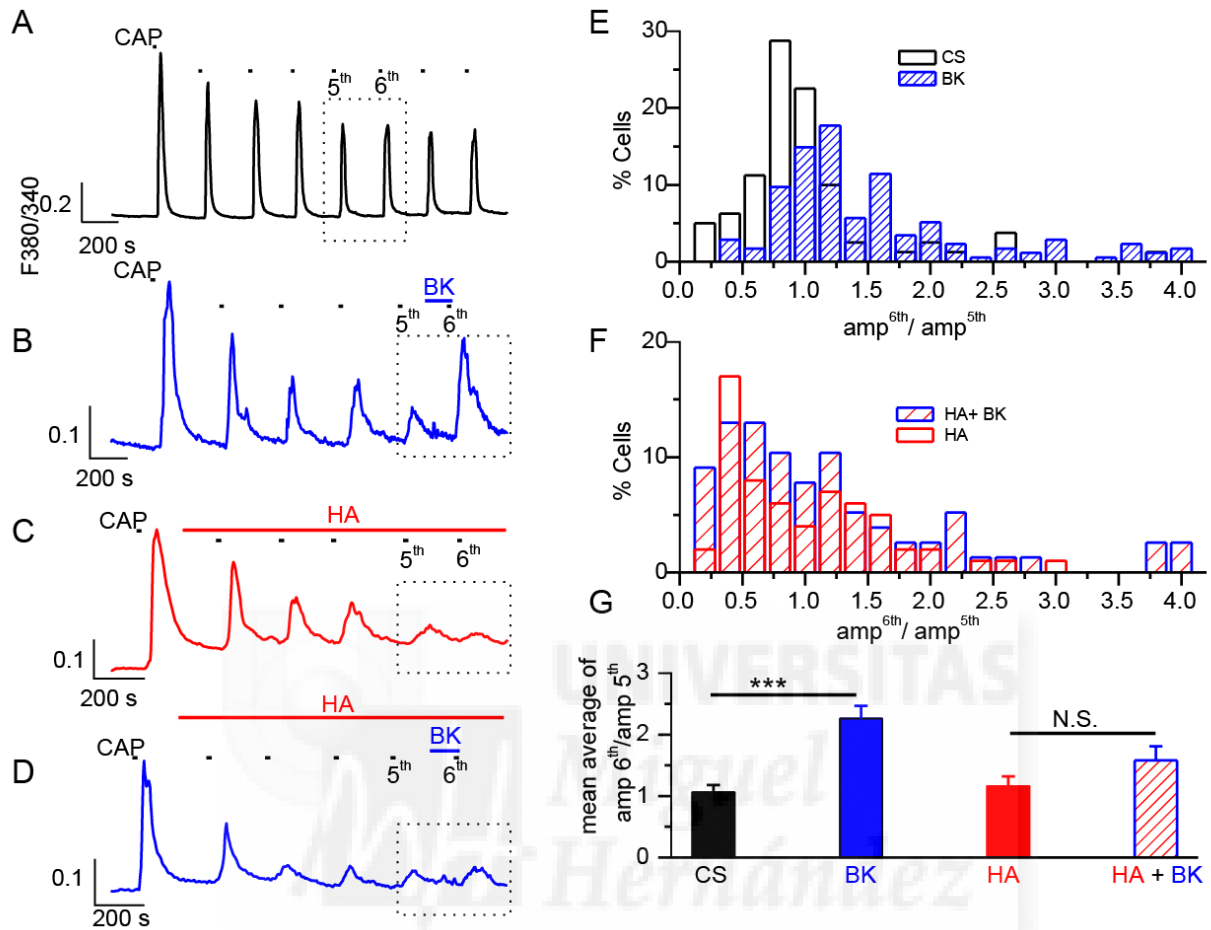
**Supplementary Figure 3**



**Supplementary Figure 3. Inhibitory effect of HA on HEK-N604T-TRPV1-EYFP (+) and TRPV1-EYFP HEK cells.** The normalized peak amplitude of density current at -60 mV in response to 1  $\mu$ M CAP in CS (black column) and in the presence of HA (red column). No differences in the response to CAP under HA were observed between both types of cells. The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m. (Student's t-test: \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ ).

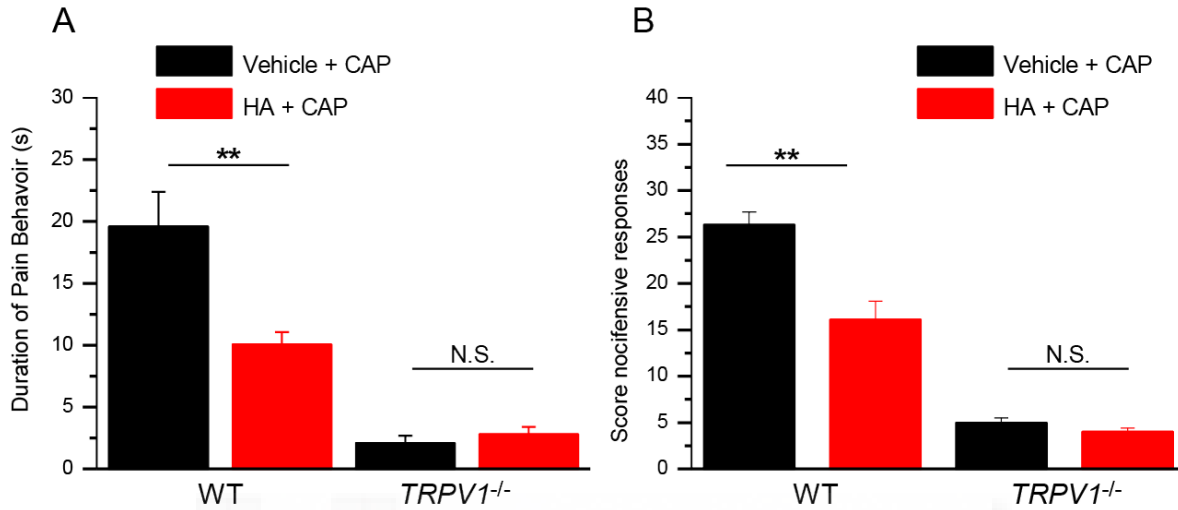


## Supplementary Figure 4



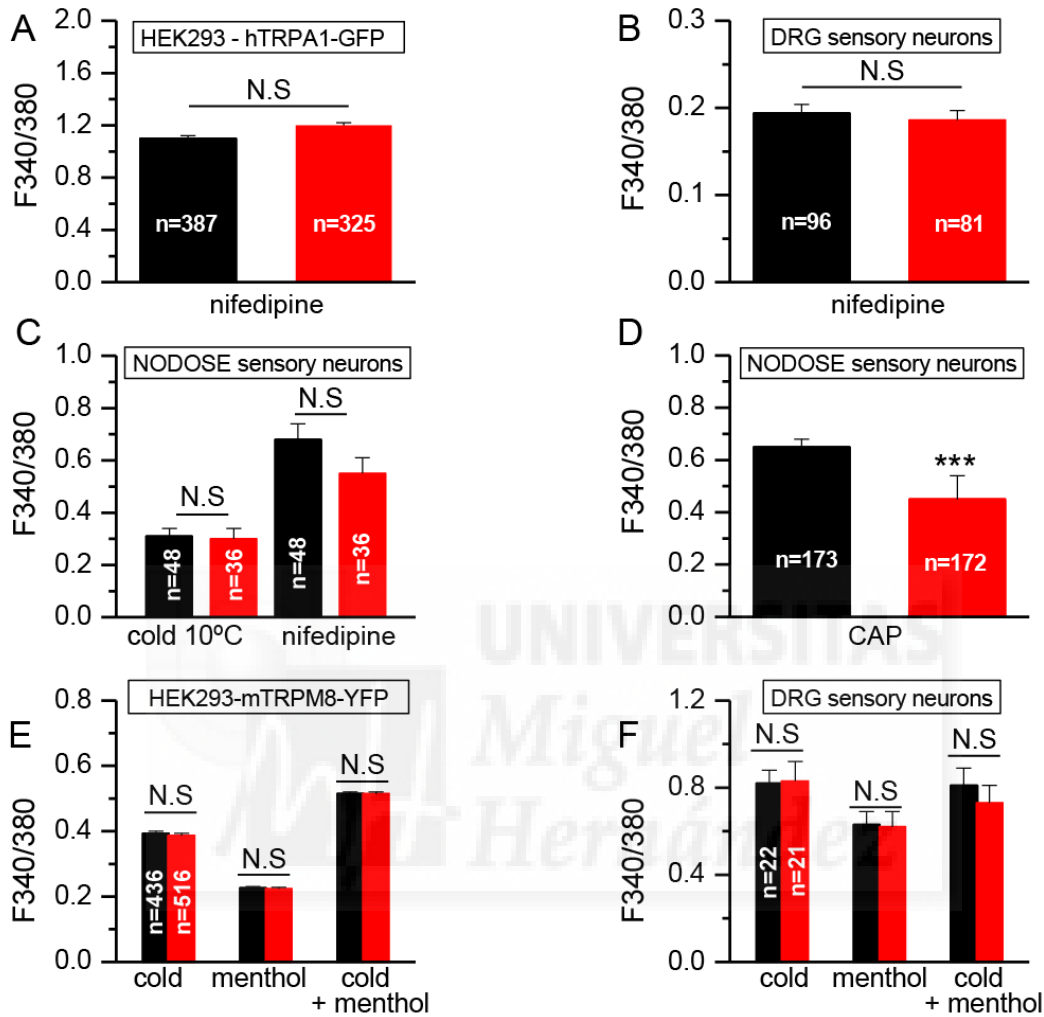
**Supplementary Figure 4. Inhibition by HA of TRPV1 sensitization by BK.** **A-D.** Examples of the  $[Ca^{2+}]_i$  rises evoked by capsaicin in neonatal (P1-P4) DRG neurons. **A.** Recording performed under perfusion with CS (n=101). **B.** A similar experiment but with the application of 2  $\mu$ M BK (n=170). **C.** The response to the same protocol as in A but under perfusion with HA. **D.** The response during exposure to HA and an application of 2  $\mu$ M BK 2 min before the 6<sup>th</sup> stimuli to illustrate the absence of sensitization of the CAP response by BK. **E, F.** The frequency distribution of the ratio between the amplitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  responses to the 6<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> stimuli under control conditions (n=80) and when BK has been applied indicating a shift to the right of the ratio under BK (n=175), the effect under perfusion with CS (E) and the absence of this BK effect with exposure to HA (F). **G.** The mean value of the ratio of the responses to the 6<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> stimuli under HA (n=66) and under HA + BK (n=77). The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m., Student's t-test: \*\*\*  $P < 0.001$ , <sup>N.S.</sup>  $P > 0.05$ .

### Supplementary Figure 5.



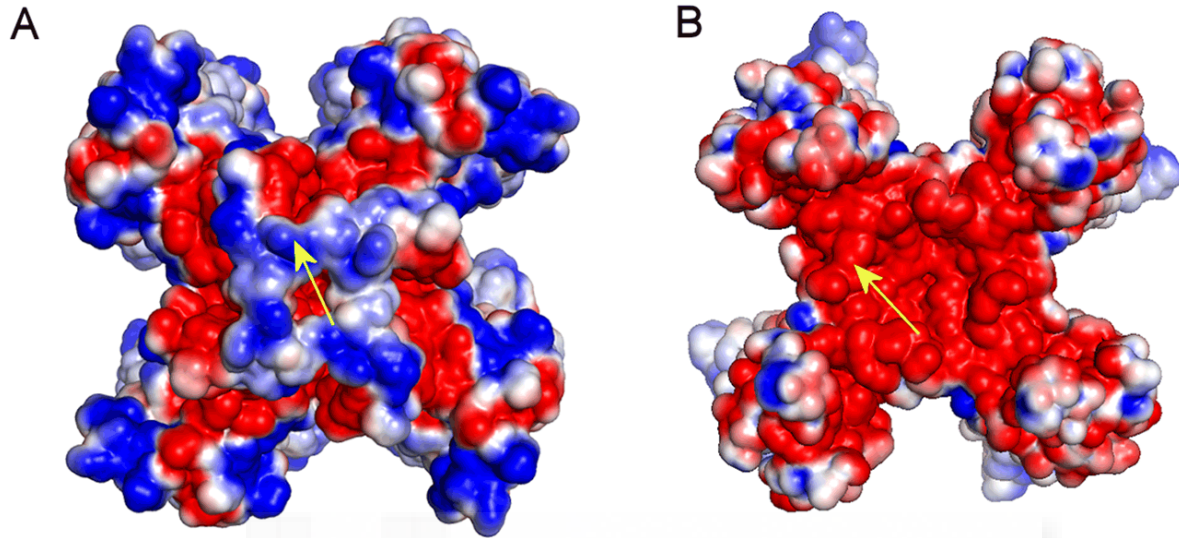
**Supplementary Figure 5. Effect of HA on behavioral nocifensive responses to an intradermal CAP injection in the paw.** The duration (**A**) and number of nocifensive behavior movements (licking, biting, lifting, guarding or shaking of the hind paw) (**B**), evoked by an intradermal CAP injection (10  $\mu$ l of 1  $\mu$ g/ml) that was preceded two days earlier by a 10- $\mu$ l injection of either the vehicle or HA. Wild type (n=7) and *TRPV1*<sup>-/-</sup> (n=8). The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m., Student's t-test: \*\*  $P < 0.01$ , <sup>N.S.</sup>  $P > 0.05$ .

**Supplementary Figure 6**



**Supplementary Figure 6. The effects of HA on TRPA1 and TRPM8 channels. A-B.** The average amplitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  response to 10  $\mu$ M nifedipine in CS (black bars) and during perfusion with HA (red, bars) in HEK293-hTRPA1-GFP(+) cells and DRG cultured neurons, **C-D.** The average amplitude of the  $[Ca^{2+}]_i$  response to cold (10 °C) and 1  $\mu$ M nifedipine in the same neurons (C) and 100 nM CAP (D) in cultured nodose ganglion neurons **E-F.** The average amplitude of  $[Ca^{2+}]_i$  response in HEK293-mTRPM8-YFP cells and DRG cultured sensory neurons to cold, 100  $\mu$ M menthol, and cold + 100  $\mu$ M menthol, in CS (black bars) and during perfusion with HA (red, bars). Black bars: in external CS, Red bars: in HA solution. The data are represented as the mean  $\pm$  s.e.m., Student's t-test: \*\*\*  $P < 0.0001$ , *N.S.*  $P > 0.05$ .

## Supplementary Figure 7



**Supplementary Figure 7. Electrostatic potential of TRPV1 and TRPA1 models.** Top view of the TRPV1 (A) and TRPA1 (B) models in electrostatic potential APBS representation<sup>1</sup> by using the plugin by M.G. Lerner and H.A. Carlson (2006) University of Michigan, Ann Arbor implemented in PyMol 1.6 (<http://www.pymol.org>). Positively charged regions are shown in blue and negatively charged domains in red. Arrows point to S5-pore helix loops.

Supplementary Table 1

	HEK-TRPV1-EYFP (+)		DRG sensory neurons <i>WT</i>		DRG sensory neurons <i>TRPV1<sup>-/-</sup></i>	
	CS n=65	HA n=42	CS n=49	HA n=45	CS n=135	HA n=98
<b>Threshold °C</b>	42±0	42±0	39.3±0.2	38.1±0.3	38.8±0.2	40.6±0.4
<b>Time to peak of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response (ms)</b>	38±6	24±3 *	44±1	27±3 *	28±4	24±5
<b>Amplitude of the response F340/F380</b>	0.37±0.02	0.26±0.02 ***	0.35±0.01	0.13±0.02 ***	0.39±0.01	0.31±0.01 **
<b>% inhibition</b>	30*		63*		26*	
<b>% of cells that respond</b>	93	91	41	28*	58	47*

**Supplementary Table 1. Effect of HA on HEK-TRPV1-EYFP (+) cells and DRG sensory neurons from *TRPV1<sup>-/-</sup>* mice.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes were measured in HEK-TRPV1-EYFP (+) cells and cultured DRG primary sensory neurons from WT and *TRPV1<sup>-/-</sup>* mice. We measured changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> evoked by a brief heat stimulus (48 °C) applied during perfusion with CS and in cells previously exposed to HA. A single heat stimulus was applied to prevent TRPV1 desensitization. No response to CAP was observed in cultured DRG sensory neurons of the *TRPV1<sup>-/-</sup>* mice. (Student's t-test: \*\*\* P< 0.001,\*\*P<0.01,\*P<0.05).

**Supplementary Table 2**

	CS Average ratio F340/380	HA Average ratio F340/380	Change evoked by HA
CHO-mTRPA1 cells Stimulus= CA 50 $\mu$ M	2.02 $\pm$ 0.05 n= 55	2.36 $\pm$ 0.05 n= 61***	Increment of 17%
DRG primary sensory neurons Stimulus= CA 50 $\mu$ M	0.35 $\pm$ 0.04 n= 32	0.31 $\pm$ 0.02 n= 38 <sup>N.S</sup>	No effect
HEK hTRPA1-GFP cells Stimulus= MO 20 $\mu$ M	0.72 $\pm$ 0.02 n= 81	0.63 $\pm$ 0.02 n= 102**	Reduction of 13%
CHO-mTRPA1 cells Stimulus= MO 20 $\mu$ M	1.6 $\pm$ 0.1 n= 141	1.2 $\pm$ 0.1 n= 177 <sup>N.S**</sup>	Reduction of 25%
HEK hTRPA1-GFP cells Stimulus= Nifedipine 10 $\mu$ M	1.1 $\pm$ 0.1 n= 325	1.2 $\pm$ 0.1 n= 331 <sup>N.S</sup>	No effect
DRG primary sensory neurons Stimulus= Nifedipine 10 $\mu$ M	0.19 $\pm$ 0.01 n= 96	0.19 $\pm$ 0.01 n= 81	No effect

**Supplementary Table 2. Effect of HA on TRPA1.**  $[Ca^{2+}]_i$  changes were measured in the CHO-mTRPA1 cell line in cultured DRG primary sensory neurons and HEK293 cells transfected with hTRPA1-GFP stimulated with cinnamaldehyde (CA) or mustard oil (MO). Akin to other groups<sup>1</sup>, we observed that the stimulation of TRPA1 with electrophilic compounds CA and MO yields highly variable results. More consistent activity was recorded when nifedipine or cold (35 to 10 °C) were used as stimuli to activate TRPA1. The variability of the results is indicated in the last column. The data with nifedipine as a stimulus, in which no effect of HA was consistently observed are also included. (Student's t-test: \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , <sup>N.S.</sup>  $P > 0.05$ ).

## Supplementary References

1. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10037-10041 (2001).
2. Nilius, B., Appendino, G. & Owsianik, G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **464**, 425-458 (2012).



# Financiación

---

Este trabajo fue financiado por fondos del Matrix Biology Institute (USA), Becas del Ministerio Español de Economía y Competitividad BFU2008-04425, SAF2014-545.18-C3-2-R, BFU2012-39092-C02-01 y SAF2013-45608-R, CONSOLIDER-INGENIO 2010, y CSD2008-00005; PROMETEO/2014/011 de la Generalitat Valenciana; y beca Santiago Grisolia de la Generalitat Valenciana. Instituto de Neurociencias, Centro de Excelencia Severo Ochoa.

