

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE CIENCIAS

**INHIBICIÓN DEL CANAL TRPV1 POR UNIÓN DIRECTA DE
UN ANTAGONISTA LIPÍDICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ANA ELENA LÓPEZ ROMERO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR



Ciudad Universitaria, CD.MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1.Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

1.Datos del alumno

López
Romero
Ana Elena
44-41-96-87-16
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310576877

2.Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

2.Datos del tutor

Dra.
Tamara Luti
Rosenbaum
Emir

3.Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3.Datos del sinodal 1

Dr
Arturo
Hernández
Cruz

4.Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4.Datos del sinodal 2

Dra
Tatiana
Fiordelisio
Coll

5.Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5.Datos del sinodal 3

Dra
Myrian
Velasco
Torres

6.Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6.Datos del sinodal 4

M. en C.
Laura Silvia
Salinas
Velázquez

7.Datos del trabajo escrito

Título

Número de páginas
Año

7.Datos del trabajo escrito

Inhibición del canal TRPV1 por unión directa
de un antagonista lipídico
p47
2016

Agradecimientos

En primer lugar quiero dar mi mayor agradecimiento a la Dra. Tamara Rosenbaum por el apoyo, el tiempo y por todo lo que he aprendido con ella durante este tiempo en el laboratorio. Encima de todo, gracias por introducirme a la labor científica y contagiarme la gran pasión que tiene por ella.

A los miembros de mi jurado, Dra. Tatiana Fiordelisio, Dr. Arturo Hernández, Dra. Myrian Velasco y M. en C. Silvia Salinas, por sus valiosas revisiones a mi trabajo.

Gracias a los miembros del laboratorio BL-303, especialmente a la Biol. Itzel Alejandra Llorente por su trabajo en este proyecto y ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio y a Felix Sierra por su gran ayuda y consejos. A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro, a sus alumnos, así como a mi compañera Ileana.

A mis padres, Ana Catalina y Luis Alberto, y a mis hermanos, Caty y Luis; porque aunque no siempre estuvimos de acuerdo, me apoyaron en mis decisiones y me ayudaron en todo lo necesario para cumplirlas. Gracias por darme cariño, ánimo y confianza cada que los necesito.

A mi gran amiga Estefanía, por nuevamente haberme acompañado durante esta etapa desde el principio hasta el fin. A los nuevos amigos Erik, Alba, Sabine, Mariana, Andrés; a la familia que me recibió, mi tía Geña, Eugenia, y a sus hijos, gracias a todos por haber contribuido a hacer de mi licenciatura una de las mejores épocas de mi vida.

Este trabajo fue realizado con los siguientes apoyos: CONACYT "Ciencia Básica" con el proyecto CB-201-01-238399, Investigación en Fronteras de la Ciencia con el proyecto 77 y con el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con los proyecto IN200314 con una beca por conclusión de estudios de licenciatura y el proyecto IN200717. Agradezco a DGAPA-UNAM por la beca recibida.

Índice

Resumen	1
Introducción	
1) La cualidad eléctrica de la membrana celular	2
2) Los canales iónicos	3
3) Los canales TRP (“Transient Receptor Potential”)	5
3.1) El canal TRPV1	7
3.1.1) Aspectos estructurales relevantes del TRPV1	8
3.1.2) El papel del TRPV1 en la percepción del dolor	10
3.1.3) La modulación del TRPV1 por lípidos endógenos	11
3.2) El ácido oleico	12
Hipótesis	14
Objetivo general	14
Objetivos particulares	14
Metodología	
1) Electrofisiología	15
2) Soluciones para electrofisiología	17
3) Cultivo Celular	19
4) Transfección transitoria de células HEK293	19
5) Mutagénesis	20
6) Análisis estadístico	21
Resultados	
1) El ácido oleico inhibe al TRPV1	
1.1) El efecto del OA es reversible y dosis-dependiente	22
1.2) Inhibición del canal TRPV1 por OA durante pulsos continuos a voltajes despolarizantes e hiperpolarizantes	25
1.3) El OA inhibe a TRPV1 activado con diferentes agonistas	26

1.4)	La inhibición del canal TRPV1 con ácido oleico es más rápida en el estado cerrado	28
2)	Localización del sitio de unión del OA	
2.1)	El OA no se une a residuos cargados del canal	29
2.2)	El canal TRPV1 aviar se inhibe menos eficientemente por OA que el canal de rata	30
2.3)	Los residuos Y511, S512 y T550 en el sitio vaniloide unen al OA	33
2.4)	El canal de pollo TRPV1 A558T se inhibe con OA	35
	Discusión	37
	Conclusiones	42
	Bibliografía	43

Resumen

El canal TRPV1 es un canal iónico polimodal presente en células nociceptoras cuya activación posee un destacado papel en la transducción del dolor durante condiciones patofisiológicas y procesos inflamatorios, por ello es que sus agonistas y, especialmente, antagonistas son atractivos para la formulación de analgésicos. Aunque los agonistas conocidos para el canal son numerosos, son pocos los moduladores negativos reportados. En el presente trabajo hemos identificado y caracterizado el mecanismo molecular por el cual el ácido oleico (OA), un ácido graso abundante en la naturaleza, es un antagonista del canal TRPV1.

Utilizando técnicas de electrofisiología determinamos que el efecto del ácido oleico sobre el TRPV1 ocurre de manera reversible y dependiente de la dosis, observamos que durante pulsos de voltaje tanto positivos como negativos el OA no activa al TRPV1 sino que lo inhibe. De igual forma determinamos que es capaz de inhibirlo cuando el canal es estimulado por agonistas tanto exógenos como endógenos y encontramos que el efecto ocurre más rápido cuando el canal se encuentra en un estado cerrado. El sitio de interacción para el ácido oleico en el canal fue determinado comparando la inhibición entre canales TRPV1 de dos especies distintas: el TRPV1 aviar que no responde a la capsaicina por diferencias en residuos de aminoácidos en el sitio de unión a este vaniloide y el TRPV1 de rata que sí responde a la capsaicina. El TRPV1 aviar respondió en menor medida a la inhibición por ácido oleico que el de rata, y eso sugirió un posible papel del sitio de unión a vaniloides en la inhibición por ácido oleico. Por mutagénesis dirigida en los canales de mamífero y aviar, localizamos los residuos específicos en dicho sitio que son importantes para establecer la interacción del canal TRPV1 con el ácido graso.

Nuestros resultados describen el efecto y el mecanismo molecular por el cual un ácido graso natural actúa como antagonista alostérico del TRPV1, ya que al unirse a él en su sitio vaniloide promueve la estabilización de un estado cerrado, impidiendo la transición al estado abierto.

Introducción

1) La cualidad eléctrica de la membrana celular

Los seres vivos interactúan con su entorno gracias a la capacidad que tienen de detectar y responder a estímulos ambientales. En especial, la capacidad de distinguir los estímulos nocivos es esencial para su supervivencia (Dubin & Patapoutian, 2010).

En los mamíferos, el estímulo es detectado por receptores en las células nerviosas periféricas que generan señales que son propagadas a través de los axones de las neuronas sensoriales hasta el sistema nervioso central (SNC). Una vez que la información es interpretada en el SNC, se producen señales en respuesta al estímulo que son ejecutadas por las neuronas motoras logrando que el organismo se pueda alejar de una situación potencialmente peligrosa. La recepción y propagación del estímulo se debe a un cambio en el voltaje de la membrana celular que se conoce como “potencial de acción” (Islas, 2009).

Las membranas celulares son muy poco permeables a iones y las concentraciones iónicas extra e intracelulares son desiguales y es así que estas estructuras actúan como capacitores separando partículas cargadas. Las membranas celulares están polarizadas ya que existe un exceso de carga positiva en el exterior y un exceso de carga negativa en el interior, esta particularidad les confiere un potencial de reposo o de membrana (V_m). Para que los iones puedan atravesar estas estructuras hidrofóbicas, es necesaria la presencia y la acción de canales iónicos en las membranas celulares. Este flujo es el que ocasiona el cambio en el V_m y la generación de potenciales de acción.

A la capacidad de las células de producir potenciales de acción es a lo que se llama “excitabilidad” (Islas, 2009). No todas las células son excitables, la diferencia es que éstas expresan canales iónicos específicos que no expresan las células no excitables (Hille, 2001).

2) Los canales iónicos

Los canales iónicos son complejos proteicos transmembranales con poros hidrofílicos altamente selectivos al paso de determinados iones, principalmente Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} . Los canales tienen regiones definidas en su estructura que juegan papeles importantes en su función y que delimitan sus características biofísicas particulares. Por ejemplo, para lograr la selectividad a los iones, los canales poseen un “filtro de selectividad” en su poro de conducción, un ducto hidrofílico en el centro de la proteína que permite el paso de iones, que está determinado por una secuencia de aminoácidos específica que varía dependiendo de cada tipo de canal (Alberts *et al*, 2002).

Asimismo una propiedad distintiva de los canales iónicos es que su conformación estructural se modifica de forma que presentan diferentes estados que permiten o impiden el flujo de los iones, esta propiedad es conocida como “gating” o propiedad de compuerta. En general, se distinguen tres estados de los canales iónicos, el abierto, cerrado e inactivo, este último es un estado diferente al cerrado que no permite el flujo de iones ni la activación del canal por algún estímulo y que se logra por la participación de alguna región particular del canal que impide el paso de iones sin que el canal se cierre (Alberts et al., 2002).

Una vez que un canal es activado permite el movimiento de iones a través de la membrana. Este flujo o corriente eléctrica obedece al gradiente electroquímico, por tanto, no requiere gasto energético y ocurre rápidamente. El gradiente electroquímico involucra tanto al gradiente químico, que se refiere a la concentración diferencial de iones que hay entre el interior y el exterior de la célula y al gradiente eléctrico, que se genera por la separación de cargas a ambos lados de la membrana plasmática por su propiedad de aislante eléctrico (Alberts et al., 2002).

Los canales iónicos pueden ser activados por estímulos de diferente naturaleza. Así, los hay activados por estímulos eléctricos, químicos, mecánicos e incluso por temperatura (Alberts, 2002). Esto remarca su importancia fisiológica, especialmente para las células del sistema nervioso, pues gran variedad de estímulos convergen en la generación de un potencial de acción en la membrana celular.

Los canales activados por voltaje forman una superfamilia de canales iónicos cuyo estudio ha recibido mucho interés debido a que son responsables de importantes procesos fisiológicos como la generación del potencial de acción, la secreción de hormonas, neurotransmisores, funciones específicas como el latido del corazón, entre otros múltiples ejemplos (Tombola *et al.*, 2006). Esta familia canales iónicos conserva similitudes estructurales entre sus miembros: Son tetrámeros cuyas cuatro subunidades proteicas se ensamblan alrededor del poro de conducción, el ducto hidrofílico por donde ocurre el paso de los iones, de modo que la estructura del tetrámero tendrá forma de cono invertido (Fig. 1). A su vez, cada subunidad del tetrámero está formada por seis segmentos transmembranales (S1-S6) de α -hélices más el asa reentrante del poro (P) ubicada entre S5 y S6.

Como se mencionó anteriormente, los diferentes segmentos o regiones de los canales desempeñan funciones específicas que los caracterizan. Así pues, en los canales activados por voltaje, los segmentos S5-P-S6 de cada subunidad forman el anteriormente mencionado poro de conducción. Por su parte, sus segmentos S1-S4 les confieren la sensibilidad a voltaje, lo cual significa que la proteína presenta diferentes conformaciones estructurales ante cambios en el voltaje transmembranal. La sensibilidad al voltaje se debe a que en el S4 se presentan residuos cargados positivamente (principalmente argininas y lisinas) que cuando hay un cambio en el potencial de membrana, modifican su posición y hacen rotar al segmento transmembranal, lo cual promueve que se presente la conformación abierta del canal (Catterall, 2010).

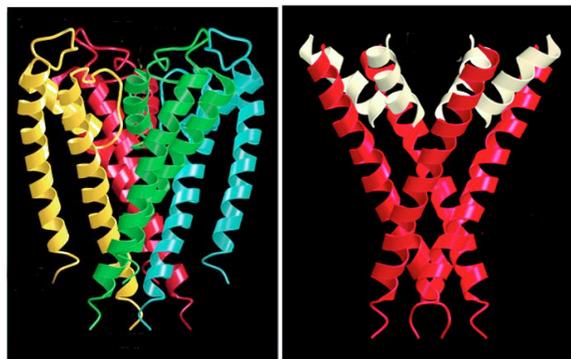


Figura 1. Estructura del tetrámero del canal de K^+ . En la imagen de la izquierda se observa la estructura del tetrámero ensamblado alrededor del poro donde cada subunidad está representada con un color diferente

(para simplicidad solo se muestran S5-S6). En la imagen de la derecha se representa la arquitectura de cono invertido que adopta el tetrámero, en color claro se representan las hélices del poro y en color rojo las internas. Modificado de Doyle *et al.*, 1998.

La topología de las subunidades de la familia de canales iónicos sensibles a voltaje es semejante a la que se presenta en otra familia implicada en la detección de estímulos diferentes como son la temperatura y agentes químicos presentes en plantas y animales. Estos canales, denominados Receptores del Potencial Transitorio o TRPs (por sus siglas en inglés) poseen baja sensibilidad al voltaje y se consideran canales polimodales porque pueden responder a más de un estímulo, siendo particularmente importantes para la respuesta de los organismos a cambios ambientales potencialmente nocivos (Clapham, 2003). Sus características generales se describen a continuación.

3) Los canales TRP (“Transient Receptor Potential”)

La familia de canales iónicos TRP fue identificada por primera vez en 1969 por el fenotipo que se observó en un linaje mutante de *Drosophila melanogaster*, en el cual la adaptación de las moscas a la luz se alteraba y se comportaban como ciegas (Cosens & Manning, 1969). Debido a la respuesta transitoria que se observó en el electroretinograma, a esta mutación se le llamo *trp*, por sus siglas en inglés para “receptor de potencial transitorio”. Sin embargo, fue hasta 1989 que el gen responsable fue clonado y su producto caracterizado como una proteína transmembranal, dando así inicio al estudio de la familia de canales TRP (Montell & Rubin, 1989; Minke, 2010).

Los canales TRP son una familia de canales iónicos cuyos miembros poseen seis segmentos transmembranales que se ensamblan como homo- o hetero-tetrámeros y forman canales catiónicos no selectivos (Clapham, 2003). A pesar de la homología entre sus secuencias los canales TRP son bastante diferentes entre sí; son activados por una amplia variedad de estímulos, son selectivos a diferentes cationes, son expresados en diferentes tejidos y, por tanto, desempeñan funciones diferentes (Venkatachalam & Montell, 2007).

Debido a la variedad de estímulos que activan a sus miembros, los canales TRP realizan múltiples funciones tanto en células excitables como en no excitables. Principalmente se

relacionan con la fisiología sensorial, al estar involucrados en el tacto, audición, olfato, visión y sensación térmica y también detectan estímulos del ambiente celular local (Venkatachalam & Montell, 2007).

La familia TRP se divide en siete subfamilias según su secuencia de aminoácidos: TRPC (“Canónicos”), TRPV (“Vaniloide”), TRPM (“Melastatina”), TRPA (“Anquirina”), TRPP (“Policistina”), TRPML (“Mucolipina”) y TRPN (NOMPC, por sus siglas en inglés “no mechanoreceptor potential C”). Los canales TRP se encuentran en organismos desde levaduras, nematodos, insectos hasta vertebrados. En los mamíferos existen representantes de cada subfamilia, a excepción del TRPN que en vertebrados sólo ha sido reportado en pez cebra (Pedersen *et al.*, 2005).

Dentro de la gran familia de canales TRP, el primero que se clonó en mamíferos fue el TRPV1 (vaniloide 1) y en este trabajo nos enfocamos en el estudio de este canal. La subfamilia TRPV está constituida por canales catiónicos no selectivos, permeables preferentemente a Ca^{2+} y cuyos miembros presentan de 3 a 6 dominios repetidos de anquirinas en su extremo amino terminal y se encuentra integrada por seis miembros: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 y TRPV6 (Pedersen *et al.*, 2005).

Una peculiaridad de esta subfamilia es que algunos de sus miembros son canales termosensibles (Fig. 2) y son activados por cambios en la temperatura ambiente. El TRPV4 es un sensor moderado de calor que se activa por temperaturas entre 24 y 27°C, mientras que TRPV1 se activa por temperaturas mayores a 42°C y TRPV2 por temperaturas aún más altas de alrededor ~52°C, que para mamíferos son potencialmente nocivas (Ferrandiz-Huertas *et al.*, 2014).

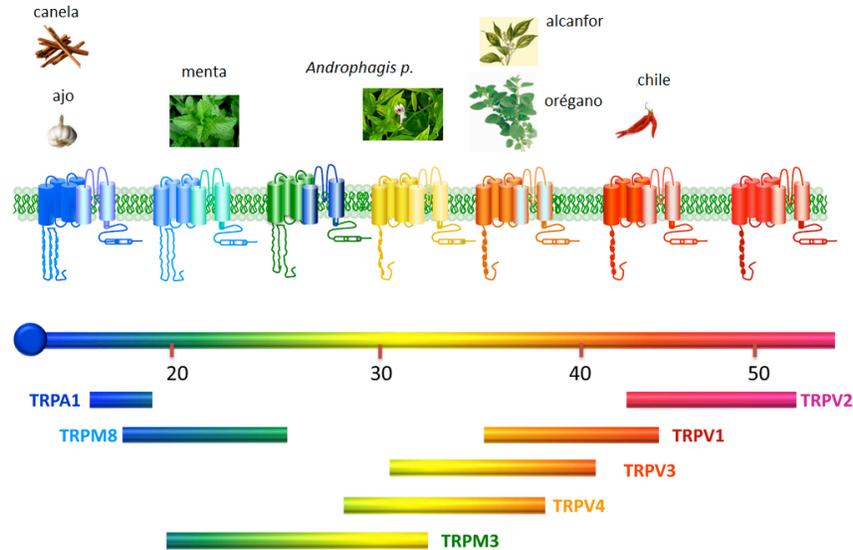


Figura 2. Canales TRP sensibles a temperatura. En un lado del espectro se encuentran los canales TRPA1 y el TRPM8, activados por temperaturas bajas. Los canales TRPM3, TRPV3 y TRPV4 responden a temperaturas entre 24 y 27°C y los canales TRPV1 y TRPV2 a temperaturas >40°C. Cada uno de ellos puede ser activado por diferentes ligandos característicos, el TRPA1 por compuestos pungentes como el cinamaldehído de la canela y la alicina del ajo, el TRPM8 por el mentol de la menta, el TRPV4 por el extracto de la planta *Andrographis paniculata*, el TRPV3 por diversos compuestos presentes en plantas como el carvacrol del orégano y el alcanfor, TRPV1 por la capsaicina y para el TRPV2 no se han reportado ligandos específicos. Modificado de Ferrandiz-Huertas *et al.*, 2014.

3.1) El canal TRPV1

El canal TRPV1 fue descrito por primera vez en neuronas sensoriales de mamífero como un canal activado por capsaicina cuya función fisiológica está involucrada en la transducción del dolor (Caterina *et al.*, 1997). Es un canal catiónico con rectificación saliente lo que significa que la conductancia del canal aumenta conforme el voltaje se vuelve positivo y no selectivo pero que deja pasar preferencialmente Ca^{2+} . Es activado por una amplia variedad de ligandos moleculares intra y extracelulares (como alicina, anandamida, bradiquinina, metabolitos del ácido araquidónico, lípidos endógenos, etc.), temperatura (>42°C), voltaje, protones e incluso venenos de arañas y medusas, lo que lo hace un receptor polimodal que integra múltiples estímulos nocivos (Tominaga *et al.*, 1998, Morales-Lázaro & Rosenbaum, 2015).

El TRPV1 es conocido por ser el receptor de capsaicina (Fig. 3), el compuesto pungente de los chiles del género *Capsicum*. Otros compuestos que también presentan grupos vaniloides en su estructura también actúan como sus análogos, por ejemplo la resiniferatoxina (RTX) que es obtenida de la planta *Euphorbia resinifera* (Rosenbaum & Simon, 2007).

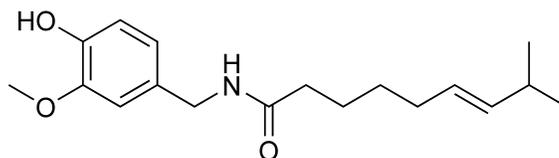


Figura 3. Estructura química de la capsaicina.

3.1.1) Aspectos estructurales relevantes del TRPV1

Recientemente la estructura del canal se obtuvo por crio-microscopía electrónica (crio-EM) con una resolución aproximada de 3 Å. Se demostró que a pesar de la baja (<20%) similitud en la secuencia entre los TRP y los canales activados por voltaje, en efecto se comparte una estructura tetramérica en la que cada subunidad se ensambla alrededor de un poro de conducción central (Fig. 4B). Cada subunidad está compuesta por regiones amino (N)- y carboxilo (C)-terminales que son intracelulares, por seis segmentos transmembranales (S1-S6) y entre S5 y S6 se ubica la hélice del poro. En conjunto, las subunidades adoptan una estructura de cono invertido como lo que se observa en los canales activados por voltaje (Fig. 4) (Liao *et al.*, 2013).

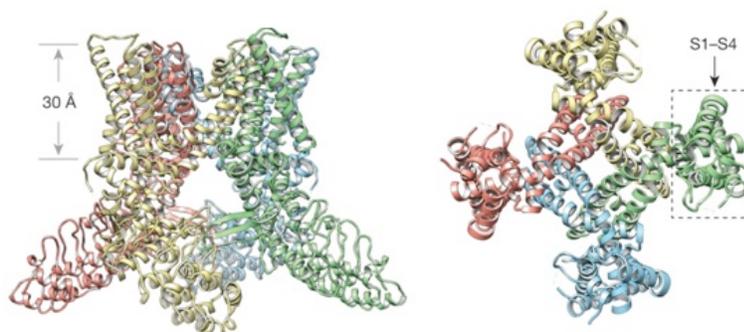


Figura 4. Diagrama de la estructura del TRPV1 obtenida por crio-EM. En la imagen de la izquierda se representa cada subunidad homóloga por un color diferente en el homotetrámero que adopta una forma de

como invertido. Las flechas delimitan el espesor de la membrana plasmática. En la imagen de la derecha se representa la vista superior del canal. Las subunidades ya ensambladas forman el poro de conducción hacia el centro donde S1-S4 de las subunidades rodean al mismo. Tomado de Liao *et al.*, 2013.

El TRPV1 presenta dominios característicos que de igual manera se encuentran en otros canales TRP (Fig. 5). En primer lugar, hay seis dominios repetidos de anquirina (ARD) en el extremo N-terminal, seguido por una región (P360-V415) que está conservado entre los subtipos de la subfamilia TRPV y que conecta a los ARD con la pre-hélice S1 (E416-R428). Cada subunidad contiene los segmentos S1-S4 y la región S5-P-S6 que están conectados por la extensión S4-S5. En su extremo C-terminal, después de S6 se ubica la “caja TRP”, un dominio conservado que se presenta en varios miembros de la familia TRP y que es importante para la tetramerización y el funcionamiento del canal (Liao *et al.*, 2013).

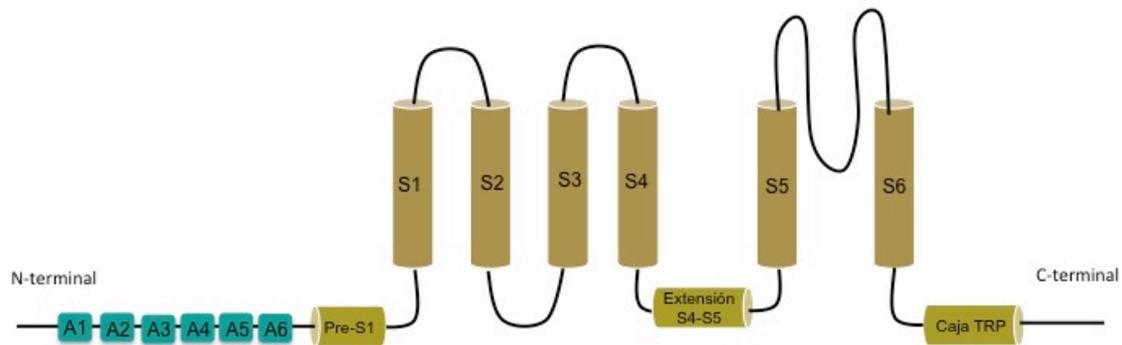


Figura 5. Representación de la estructura de una subunidad de TRPV1. En el esquema se muestran los dominios importantes presentes en cada subunidad homóloga: Los seis dominios repetidos de anquirinas en el extremo N-terminal (A1 a A6), la pre-hélice S1, el dominio semejante al sensor de voltaje, conformado por los segmentos transmembranales S1-S4, la extensión S4-S5, el segmento transmembranal S5 seguido de la hélice del poro y el segmento transmembranal S6 con la caja TRP y el extremo C-terminal.

Se ha visto que el sitio vaniloide, donde se unen la capsaicina y otros compuestos vaniloides, está constituida por una región transmembranal y una intracelular. La estructura obtenida por crio-EM sugiere que la extensión S4-S5 y S6 están involucrados en la unión de los compuestos vaniloides, mientras que los S1-S4 son estáticos y funcionan como un

ancla durante la apertura del canal. Al unirse un compuesto vaniloide se modifica la estructura del poro, lo que por consecuencia lleva a un estado abierto. Algunos residuos que han demostrado ser importantes para la sensibilidad a ligandos vaniloides son Y511 y S512 en S3 y M547 y T550 en S4 (Cao *et al.*, 2013).

Estudios funcionales recientes han demostrado que la especificidad de la unión de la capsaicina se da por puentes de hidrógeno entre la cabeza y el “cuello” amida de la molécula vaniloide con los residuos E570 (extensión S4-S5) y T550 (S4) del canal. En el canal de origen aviar ambos residuos equivalentes están mutados por alanina, lo que explica la insensibilidad a capsaicina que presenta el canal en estos organismos en particular (Yang *et al.*, 2015).

3.1.2) Papel del TRPV1 en la percepción del dolor

La expresión del TRPV1 abarca desde tejido no neuronal como queratinocitos, músculo liso, hígado, riñón y vejiga, hasta el sistema nervioso central y periférico. Su función principal, o por lo menos la más conocida, la lleva a cabo en el tejido nervioso periférico, en neuronas aferentes nociceptoras, fibras-C (no mielinizadas) y fibras A δ , con somas en ganglios sensoriales como ganglios de la raíz dorsal y en el ganglio trigémino (Jara-Oseguera *et al.*, 2008).

La activación de TRPV1 en el tejido nervioso periférico es uno de los primeros eventos moleculares que lleva a la percepción del dolor. Cuando ocurre una lesión que es detectada por neuronas sensoriales se generan las señales del proceso inflamatorio (inflamación neurogénica) que convergen en la activación de TRPV1 (Morales-Lázaro & Rosenbaum, 2015).

La activación de TRPV1 también contribuye al dolor neuropático asociado a múltiples condiciones patofisiológicas como artritis, pancreatitis, dolor en cáncer y migraña. Tomando esto en cuenta, los antagonistas del TRPV1 han cobrado gran interés clínico porque representan una estrategia novedosa para el alivio del dolor. Mientras que los anestésicos tradicionales bloquean la respuesta inflamatoria y la propagación de la señal,

los antagonistas de TRPV1 previenen el dolor al bloquear un nociceptor periférico polimodal (Szallasi *et al.*, 2007).

Otra estrategia para inhibir el dolor relacionado a la activación del TRPV1 es usando agonistas del mismo canal. Por ejemplo, la capsaicina en su presentación de crema es usada por los pacientes que presentan artritis y los parches con capsaicina son utilizados para aliviar el dolor muscular (Anand & Bley, 2011). Esto ocurre a través de la eventual desensibilización del canal en presencia de capsaicina, que resulta en el cierre del canal cuando el estímulo permanece por tiempos prolongados. De igual manera, la respuesta del canal puede ser reducida cuando es expuesto a continuos estímulos de agonista, este fenómeno se conoce como “taquifilaxis” (Touska *et al.*, 2011).

3.1.3.) Modulación del canal TRPV1 por lípidos endógenos

Entre la gran variedad de moduladores endógenos descritos para el TRPV1 resaltan los diferentes compuestos de naturaleza lipídica. El fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) es un fosfolípido, precursor de diacilglicerol (DAG) y del inositol 3-fosfato (IP₃), que se encuentra presente en las membranas celulares y se sabe que actúa sobre el canal TRPV1, y aunque hay un grupo de investigación que sugiere que el PIP₂ es un regulador negativo, la idea más aceptada al día de hoy es que es un regulador positivo del canal que interactúa con su extremo C-terminal (Morales-Lázaro & Rosenbaum, 2015).

De igual manera, el TRPV1 puede ser modulado por compuestos hidrofóbicos vaniloides endógenos (“endovaniloides”). Entre los endovaniloides que activan directamente al canal se encuentra la anandamida y algunos congéneres endocannabinoides, como por ejemplo los que son derivados del ácido araquidónico como producto de la actividad de la lipoxigenasa como lo son el ácido 5- y 15-(S)-hidroxiperoxieicosatetraenoico (5-HPETEs) y las N-acil-dopaminas de cadena larga insaturada como la N-Araquidonoil dopamina (NADA) (De Petrocellis & Di Marzo, 2005).

El ácido lisofosfatídico (LPA) es otro importante lípido que es agonista endógeno del TRPV1 y que ha sido asociado a procesos de dolor neuropático crónico. En nuestro

laboratorio se reportó que este lisofosfolípido es capaz de activar al canal y producir dolor agudo al unirse directamente en el residuo K710, en el extremo C-terminal proximal (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). En el laboratorio se encontró también que otros ácidos grasos con estructura molecular similar a la del LPA son capaces de tener el mismo efecto; lo que significa que los ácidos grasos con carga negativa, que presenten una cadena de por lo menos 18 carbonos, una insaturación y un grupo cargado en la cabeza, pueden activar al canal TRPV1 (Morales-Lázaro *et al.*, 2014).

3.2) Ácido oleico (OA)

El ácido oleico (nombre IUPAC “ácido *cis*-9-octadecenoico”) es un ácido graso monoinsaturado de cadena larga cuya estructura difiere con la del LPA en que no posee un grupo cargado en su cabeza (Fig. 6) y por tanto es incapaz de activar al canal TRPV1 (Morales-Lázaro *et al.*, 2014).

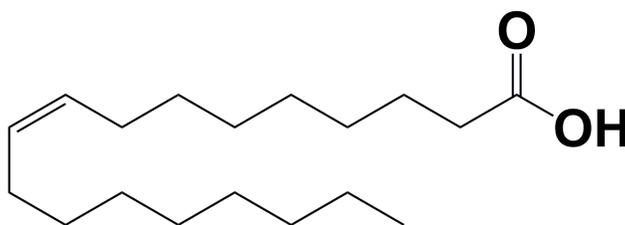


Figura 6. Estructura química del ácido oleico.

El ácido oleico por sí mismo realiza un papel biológico importante pues junto con el ácido palmitoleico, son los principales ácidos grasos monoinsaturados que componen el depósito de energía en tejido adiposo humano. Ambos ácidos grasos son sintetizados por la esteradiol-CoA desaturasa que cataliza la formación del doble enlace *cis* en la posición $\Delta 9$, y se sabe que ésta enzima se distribuye en tejidos como cerebro, riñón, pulmón y adipocitos (Ntambi, 1999) y que las concentraciones en las reservas energéticas de estos ácidos grasos son dependientes de la dieta.

De manera importante, además de ser funcional en los tejidos antes mencionados, en tejido nervioso el ácido oleico también posee un papel funcional. En el sistema nervioso central se desempeña como factor neurotrófico ya que se ha reportado que los astrocitos sintetizan ácido oleico durante el desarrollo cerebral y éste es utilizado por las neuronas promoviendo el crecimiento axonal, agrupamiento y la diferenciación neuronal (Medina & Taberno, 2002). Incluso es encontrado en el sistema nervioso periférico, donde el OA es el principal ácido graso constituyente de la mielina, por ejemplo representa entre el 35 y 45% de los ácidos grasos de los nervios ciáticos (Garbay *et al.*, 1998).

Como ya se mencionó, este ácido graso, a diferencia del LPA, no actúa como agonista del TRPV1 pero en el laboratorio observamos que funciona como su antagonista. De este resultado se derivó la presente tesis en donde nos enfocamos, como se explica a continuación, en el estudio de los efectos inhibitorios del OA sobre el canal TRPV1 así como en el mecanismo molecular por medio del cual se logra este efecto.

Hipótesis

El ácido oleico es capaz de inhibir al canal TRPV1 por medio de su interacción directa con alguna región específica de esta proteína y lo hace a través de un mecanismo de inhibición alostérica.

Objetivo General

Localizar el sitio de unión del ácido oleico al canal TRPV1 para dilucidar el mecanismo molecular de su función antagonista.

Objetivos Particulares

1. Determinar que el efecto de inhibición del ácido oleico sobre las corrientes de TRPV1 sea dosis dependiente y reversible, debido a su interacción directa con el canal.
2. Comparar la inhibición del TRPV1 por OA con diferentes estímulos, como LPA y pH, así como a diferentes voltajes para dilucidar su mecanismo de inhibición.
3. Determinar que la unión del OA al TRPV1 ocurra con mayor facilidad en un estado abierto o cerrado al comparar la inhibición entre dichos estados.
4. Comparar el efecto del OA entre canales TRPV1 de origen diferente (rata, pollo y humano) para estudiar diferencias en el sitio de unión.
5. Localizar el sitio de unión del ácido oleico al canal TRPV1 utilizando mutagénesis dirigida para introducir cambios en la secuencia de aminoácidos en diferentes regiones del canal.

Metodología

1. Electrofisiología

Se utilizó la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o “patch-clamp” para el estudio de la actividad biofísica del canal TRPV1. Esta técnica puede ser utilizada en las configuraciones: parche adherido, célula completa y parche escindido ya sea “inside-out” en donde la cara intracelular de la membrana se expone a la solución del baño, o “outside-out” donde la cara extracelular de la membrana es la que se expone a la solución del baño (Fig. 7). La técnica consiste en formar un sello de alta resistencia entre la membrana celular y la punta de una micropipeta de vidrio. Una vez formado el sello, éste puede aislarse del resto de la célula y la membrana al retirar la pipeta. Para los experimentos que se presentan en esta tesis se utilizaron las configuraciones de parche escindido “outside-out” e “inside-out”, dependiendo del agonista. El beneficio de utilizar esta configuración del patch-clamp es que se pueden aislar a los canales de los complejos procesos que ocurren en las células controlando de forma más precisa las condiciones experimentales.

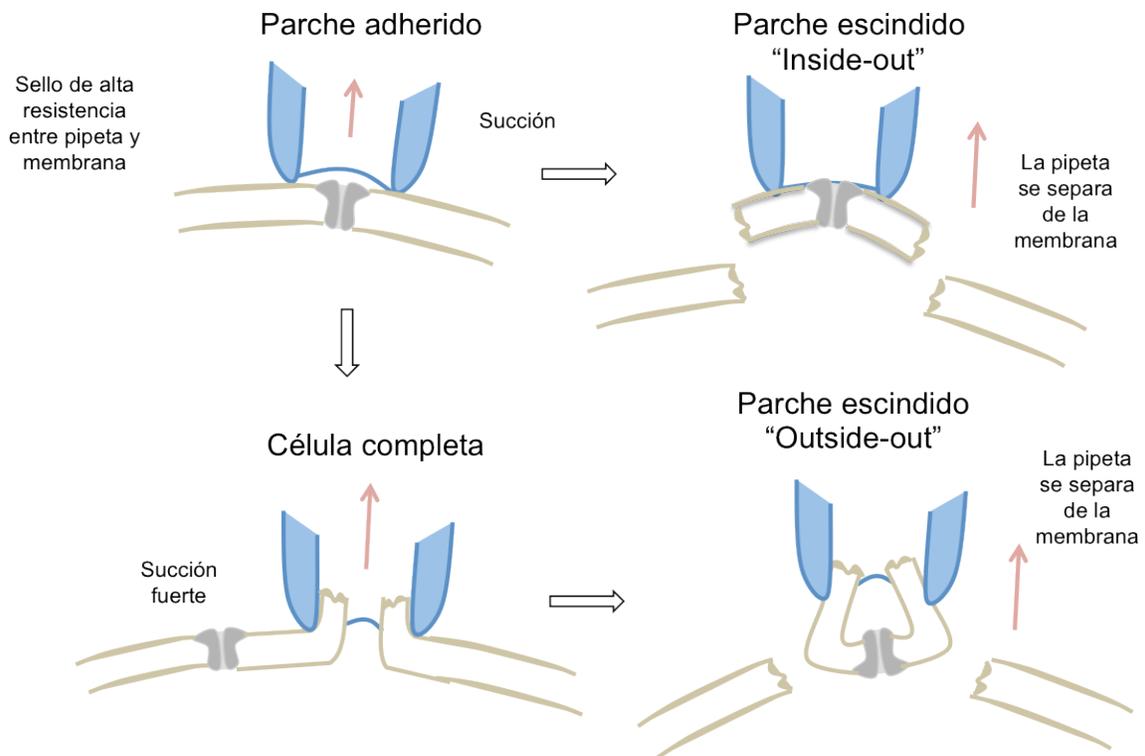


Figura 7. Técnica de Patch-Clamp. (A) Célula adherida, se forma un sello de alta resistencia entre la membrana celular y la micropipeta, sin separarlo de las condiciones celulares. (B) Parche escindido “Inside-out”, de (A) se separa la pipeta de la membrana y el sello es aislado, de forma que la cara intracelular del canal se expone hacia fuera de la pipeta. (C) Célula completa, de (A) se succiona y el sello se rompe, de tal forma que se pueden estudiar los canales de la célula completa. (D) Parche escindido “Outside-out”, de (C) la pipeta se separa de la membrana, los extremos que se separan de ella se unirán entre sí, de tal forma que dejan expuesta la cara extracelular del canal hacia fuera de la pipeta.

Las micropipetas utilizadas en los experimentos fueron pipetas de vidrio de borosilicato con una resistencia entre 3-5 MΩ. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22°C). En el protocolo de voltaje utilizado para registrar las corrientes macroscópicas se fijó un potencial de mantenimiento en 0 mV y se aplicaron pulsos 100 ms desde -120 mV hasta +120 mV.

Para determinar la inhibición del canal por OA a distintas dosis, se activaron las corrientes del canal con 4 μM de capsaicina, se lavó el agonista hasta cerrar los canales y después se aplicaron las diferentes concentraciones de OA (0.1, 0.5, 1, 2, 3 y 5 μM) en ausencia de la capsaicina por 5 minutos para poder medir la respuesta del canal ante el agonista otra vez después de ser inhibido (Fig. 8). La curva se obtuvo dividiendo la corriente final (después del tratamiento de los canales con OA) entre la corriente inicial obtenida en presencia de capsaicina. Cada punto de la curva se obtuvo promediando la corriente de los parches de membrana distintos ya que el OA no puede ser lavado fácilmente. Todas las corrientes fueron tomadas a +120 mV. Los datos se normalizaron con la corriente inicial obtenida solo con capsaicina, se graficaron en función a las concentraciones de ácido oleico y se ajustaron a la ecuación de Hill:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \left(\frac{1}{1 + \frac{[OA]}{K_d}} \right)^n$$

Donde n es el coeficiente de Hill que proporciona un estimado del número de moléculas de OA necesarias para inhibir o que interaccionan con el canal, [OA] es la concentración del ligando y K_d es la constante de disociación.

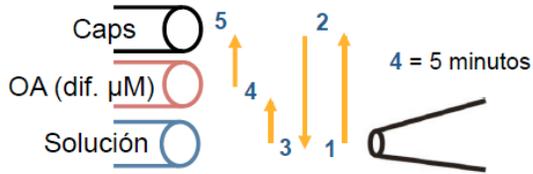
Asimismo, se realizaron experimentos en donde se determinó el curso temporal de la inhibición midiendo la misma en parches expuestos a OA en presencia o ausencia de la capsaicina (Fig. 8). El curso temporal de la inhibición dependiente del estado abierto se realizó aplicando un pulso continuo de voltaje de +60 mV en la presencia de capsaicina y capsaicina con OA (capsaicina 4 μ M y OA 5 μ M). Para los experimentos en el estado abierto, los ajustes a una exponencial simple de diferentes experimentos fueron promediados.

Los experimentos para determinar la inhibición en el estado cerrado se realizaron usando un pulso continuo a -60 mV en el que primero se activó con capsaicina 4 μ M y luego se lavó con solución de registro hasta cerrar los canales y se aplicó el ácido oleico por 1, 3, 6, 10 y 20 segundos para después reactivar con capsaicina y medir la magnitud de la inhibición. Los datos se normalizaron con la corriente inicial obtenida solo con capsaicina. Para cada punto en el tiempo se utilizó un parche de membrana y se promediaron 5 experimentos para cada punto para después ajustar la curva obtenida con una exponencial simple.

Para determinar la magnitud de la reversibilidad del efecto inhibitorio del OA y el curso temporal con el que ocurre, se aplicaron pulsos continuos a +40 mV en donde se aplicó capsaicina 4 μ M, se lavó con solución de registro para después aplicar OA 5 μ M en presencia de capsaicina hasta que se inhibió la corriente (Fig. 8). Después se expusieron los parches a capsaicina sola para revertir la inhibición y los cursos temporales de la recuperación fueron ajustados a una exponencial simple.

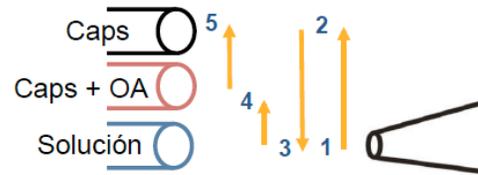
Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti-S) con lámpara de epifluorescencia (Nikon Intensilight C-HGFI), amplificador EPC10 (HEKA Elektronik), micromanipulador motorizado MP-225 (Sutter Instruments) y un sistema de recambio rápido de soluciones RSC-200 (BioLogic, Science Instruments). Los registros se realizaron con el programa Patchmaster (HEKA Instruments) y se analizaron con el programa IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA).

Inhibición dosis dependiente



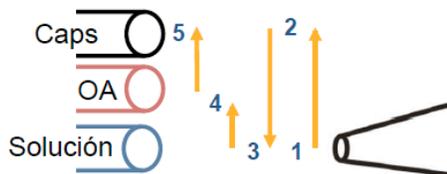
Cada punto de la curva se obtuvo promediando la corriente de distintos parches de membrana a +120 mV

Reversibilidad de la inhibición



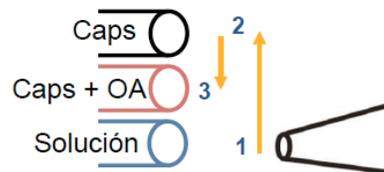
Pulso continuo de voltaje a +40 mV durante 350 ms

Inhibición dependiente del estado cerrado



Pulso continuo de voltaje a -60 mV
Cada punto de tiempo en la curva se obtuvo promediando parches de membrana independientes.

Inhibición dependiente del estado abierto



Pulso continuo de voltaje a +60 mV

Figura 8. Representación de los protocolos utilizados en los experimentos de electrofisiología. Para cada experimento se muestra la secuencia de exposición a las diferentes soluciones, el protocolo de voltaje y para la inhibición dosis dependiente, el tiempo de incubación del parche.

2. Soluciones para Electrofisiología

En todos los experimentos se utilizaron soluciones isométricas en la pipeta y en el baño con 130 mM NaCl, HEPES 3 mM y EDTA 1 mM con un pH de 7.6 (con NaOH).

Para la solución de pH 5.5 que se utilizó en los experimentos en la configuración de outside-out para estudiar la inhibición por OA con este agonista, la composición de la solución fue igual que la descrita anteriormente pero el HEPES se sustituyó por MES 3 mM.

Las soluciones madre o stock de capsaicina (Sigma-Aldrich) se hicieron a una concentración de 4 mM en etanol. El stock del OA (Sigma-Aldrich) se mantuvo congelado a -70°C y el día del experimento se tomó un vial el cual se descongeló, agitó y sonicó durante 5 minutos para posteriormente ser preparado en solución de registro. El LPA fue preparado a partir de una solución madre (10 mM) en DMEM con 1% BSA que permaneció congelada a -80°C hasta el día del experimento. Antes de comenzar los registros electrofisiológicos, el vial fue sonicado por 5 minutos en baño frío.

3. Cultivo Celular

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron en células de la línea HEK293 (Human Embryonic Kidney-293 cells) las cuales fueron transfectadas transitoriamente. Las células se crecieron en monocapas en cajas de Petri de 100 mm (Corning) en la incubadora con 95% O₂ y 5% de CO₂ a 37°C. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium con L-glutamina) suplementado con 10% de suero bovino fetal, y penicilina al 1%.

Cuando la confluencia de la monocapa se encontraba cerca del 70% las células fueron resembradas. Para llevar a cabo esto, se despegaron de las cajas de cultivo agregando 1 mL de tripsina-EDTA (GIBCO), disociando mecánicamente y se recolectaron y centrifugaron a 12,000 rpm durante 3:30 minutos. Después, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se resembraron. Las células utilizadas para registros electrofisiológicos fueron resembradas en cajas de Petri de 35 mm con cuadros de vidrio pretratados con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich). Las células fueron incubadas para permitir su crecimiento, y 24 horas después fueron transfectadas como se detalla a continuación.

4. Transfección transitoria de células HEK293

Las células HEK293 fueron cotransfectadas con la proteína verde fluorescente (GFP, BD Bioscience) y ADN que codifica para el canal TRPV1 de rata silvestre, el canal TRPV1 aviar silvestre o para las diversas mutaciones de ambos canales que se generaron, usando el agente de transfección JetPEI (Polyplus Transfection). La eficiencia de la transfección fue determinada por el marcador fluorescente GFP para los experimentos de electrofisiología.

Brevemente, los complejos de transfección para cada ADN se formaron mezclando por separado el ADN del TRPV1 y GFP (500 ng) con NaCl 150 mM hasta un volumen de 100 μ L y, por otra parte, al JetPEI (3 μ L) con NaCl 150 mM hasta el mismo volumen del primero. En general, se transfectaron entre 300 y 500 ng de ADN del canal TRPV1 silvestre y mutante. La mezcla que contiene a JetPEI se agregó a la primera mezcla y el complejo final de 200 μ L se agregó a las células gota a gota. Las células transfectadas expresaron el canal 48 horas después de la transfección.

5. Mutagénesis

Las mutantes utilizadas en los experimentos se generaron por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en dos pasos (Rosenbaum & Gordon, 2002). Se identificó la secuencia de interés, se diseñaron oligonucleótidos que llevaran el cambio que se deseaba introducir en la secuencia de aminoácidos junto con un sitio de restricción nuevo y específico en la secuencia de ADN. En 2 reacciones de PCR independientes, se utilizaron dos oligonucleótidos, uno que no porta la mutación, que delimita a la secuencia que se mutará junto con un sitio de restricción que se encuentra en la secuencia del canal, y un segundo que contiene la mutación y el nuevo sitio de restricción. Para una PCR se utiliza un oligonucleótido silvestre sentido y uno mutagénico antisentido, y para la segunda un oligonucleótido silvestre antisentido y el mutagénico sentido.

El siguiente paso consistió en producir varias copias (amplificar) la secuencia en la que se introdujo la mutación y el sitio de restricción utilizando el par de oligonucleótidos no mutagénicos que delimitaran la secuencia con la mutación. Los dos productos de la primera reacción de PCR se unen porque las secuencias de los oligonucleótidos mutagénicos son complementarias. El producto final fue digerido en los sitios de restricción que delimitan a la secuencia y fue reintroducido al resto del canal, donde la secuencia equivalente a la mutada ya fue eliminada, en un vector para expresión en células de mamífero que contiene un cassette de resistencia a ampicilina, pcDNA3, por medio de una reacción de ligación con ligasa T4.

Una vez que se tuvo el vector con el ADN, se utilizó para transformar bacterias competentes (*E. coli* cepa DH5 α) por medio de un choque térmico y se crecieron los

cultivos para obtener suficiente cantidad de ADN. Se dejaron crecer los cultivos en medio LB (para 1 L: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 1 mL de NaOH 1 M), con agar y ampicilina 1%, para seleccionar aquellas que sí fueron transformadas, y se incubó por 12 horas a 37°C.

El ADN se extrajo de los cultivos, se hicieron reacciones de diagnóstico para verificar que cada una de las diferentes mutaciones realizadas se hubiera introducido en la secuencia al digerir una alícuota de ADN con una enzima de restricción que se sabía reconocía el sitio de restricción nuevo. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% para el que se utilizó el buffer TBE a 0.5X y se le agregaron 3 µL de bromuro de etidio para teñir las muestras, con esto se verificó que los tamaños correspondieran a los fragmentos esperados. Se utilizó el programa Vector NTI para diseñar los oligonucleótidos y predecir el peso de las bandas. Finalmente, se confirmó la presencia de la mutación al secuenciar el ADN.

6. Análisis estadístico

Los datos fueron promediados y, a menos que se especifique de otra forma, se muestran como el promedio \pm el error estándar de la media (s.e.m.). Utilizamos la prueba T-student y los datos con un valor $p < 0.01$ se consideraron estadísticamente diferentes.

Resultados

1. El ácido oleico inhibe al canal TRPV1

1.1. El efecto del OA es reversible y dosis-dependiente

En parches escindidos en la configuración de “inside-out” que expresaban al canal TRPV1 se aplicó un pulso continuo de +40 mV durante 350 ms (Fig. 9A), se expusieron a solución de registro, después se pasaron a capsaicina 4 μM (“caps” en Fig. 9A), se lavó con solución de registro (“lavado” en Fig. 8A) y se aplicó capsaicina con OA 4 μM (“caps + OA” en Fig. 9A) hasta observar la inhibición de la corriente, finalmente se expuso de nuevo en capsaicina sola para observar la recuperación de la inhibición (“caps (reversibilidad)” en Fig. 9A). A partir de este experimento concluimos que el efecto del OA es reversible (Fig. 9B) ya que al aplicar capsaicina con OA el 15 ± 2.6 % de la corriente inicial permaneció (Fig. 9B) y después de lavar y volver a exponer a capsaicina 85 ± 6.3 % de la corriente inicial permaneció (Fig. 9B) con una exponencial del curso temporal de $\tau = 38.8 \pm 6.5$ s.

Una vez que determinamos que el efecto del OA es reversible, decidimos realizar experimentos para obtener una curva dosis respuesta y, como se muestra en la Fig. 9C, observamos que el efecto del OA es dependiente de la dosis y el ajuste a la ecuación de Hill resulta en el cálculo de una constante de disociación (K_d) aparente de 2.2 μM y un coeficiente de Hill de 2.

Dado que una concentración de 5 μM de OA durante 5 minutos produce la inhibición de casi todas las corrientes activadas por capsaicina en el canal TRPV1, caracterizamos la inhibición del canal cuando el OA es aplicado a las caras intracelular (“inside-out”) y extracelular (“outside-out”) del mismo utilizando dicha concentración. Así, las corrientes fueron activadas con capsaicina 4 μM y los parches se expusieron a 5 μM OA para después medir la respuesta a capsaicina nuevamente cuando el OA fue aplicado desde el lado intracelular (Fig. 10A) o por el lado extracelular (Fig. 10C). Las Figs. 10B y D son las curvas corriente a voltaje (IV) que se obtuvieron a partir de los registros en 10A y 10C.

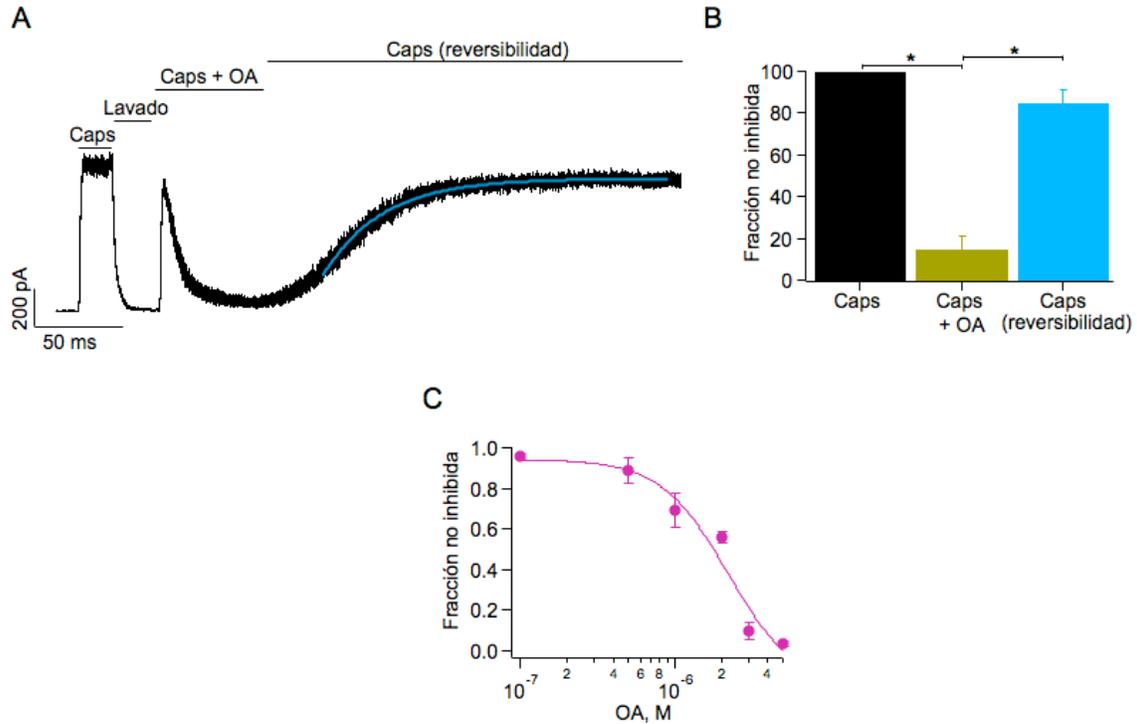


Figura 9. La inhibición de TRPV1 con OA es reversible y dosis-dependiente. (A) Trazo representativo de corriente evocada a 40 mV durante 350 ms en parches “inside-out” de células HEK293 que expresan TRPV1. Los parches fueron expuestos en solución de registro, después a capsaicina 4 μ M (Caps), lavados en solución de registro (lavado) y expuestos a capsaicina 4 μ M con OA 5 μ M (Caps + OA) hasta observar inhibición de la corriente y finalmente expuestos de nuevo a capsaicina para observar la recuperación de la inhibición (Caps (reversibilidad)). Los datos de recuperación de la inhibición se ajustaron a una exponencial simple ($\tau = 38.8 \pm 6.5$ s). (B) Promedios de la fracción de la corriente no inhibida en los puntos indicados en (A), los datos fueron normalizados con la corriente obtenida inicialmente con capsaicina (barra negra). Caps+OA (barra verde) permanece 15 ± 2.6 % de la corriente. Caps (reversibilidad) (barra azul) después de exponer a capsaicina 85 ± 6.3 % inicial se recupera ($n = 6$) * $p < 0.001$ entre grupos. Barras de error = s.e.m. (C) Curva dosis a respuesta de la inhibición en presencia de distintas concentraciones de OA durante 5 minutos ($n = 5$ para cada punto). La línea indica el ajuste a la ecuación de Hill; $K_d = 2.2$ μ M y constante de Hill = 2.

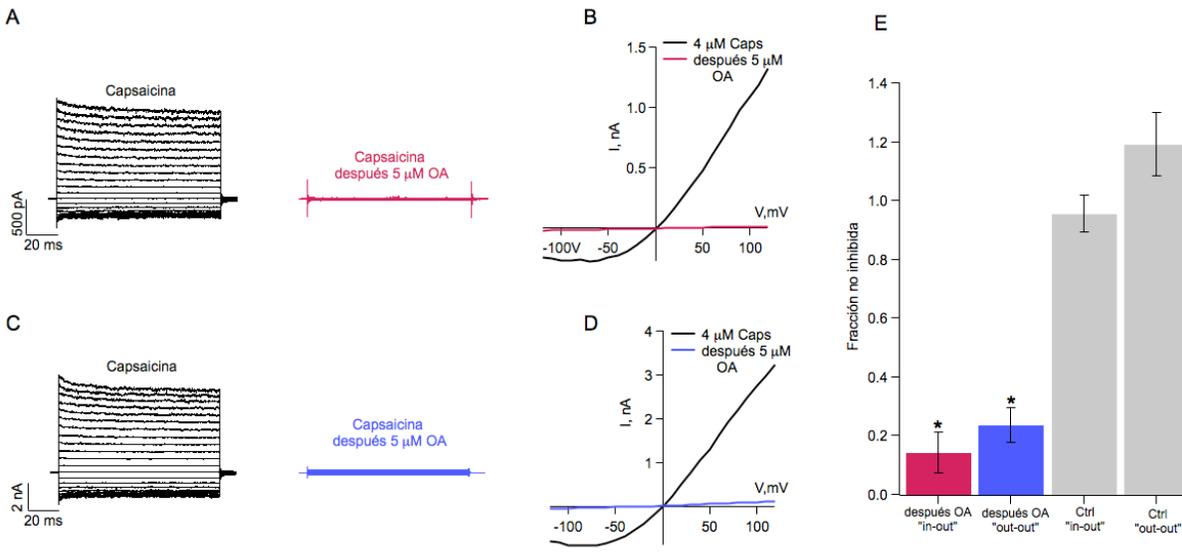


Figura 10. El TRPV1 es inhibido cuando OA es aplicado tanto a la cara intracelular como extracelular.

(A) Inhibición del canal por OA intracelular. Corrientes activadas por capsaicina $4 \mu\text{M}$ antes (negro) y después (rosa oscuro) del OA $5 \mu\text{M}$ intracelular por 5 minutos. Las corrientes fueron obtenidas utilizando protocolo de voltaje de -120 mV a $+120 \text{ mV}$ por 100 ms , con incremento de 10 mV . (B) Relación corriente a voltaje para las corrientes en (A). (C) Inhibición del canal por OA extracelular. Corrientes activadas por capsaicina $4 \mu\text{M}$ antes (negro) y después (violeta) del OA $5 \mu\text{M}$ extracelular por 5 minutos (D) Relación corriente a voltaje para las corrientes en (C). (E) Fracción de la corriente no inhibida por OA intracelular ($13 \pm 3\%$) y por OA extracelular ($22 \pm 4\%$), ($n = 6$ para cada caso), $*p < 0.01$ con respecto a los controles. Barras de error = s.e.m. Los controles fueron obtenidos registrando la corriente inicial y la final con solución de registro después de 5 minutos.

En resumen, después de exponer a los canales al OA (intracelular o extracelularmente), observamos que la mayor parte de la respuesta a capsaicina se abate. En promedio, solo el $13 \pm 3\%$ de la corriente permanece cuando el OA es aplicado en la cara intracelular y el $22 \pm 4\%$ en la cara extracelular (Fig. 10E). No encontramos diferencias entre la aplicación extra e intracelular del OA a 5 min, pero si hubieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus controles con solución de registro (Fig. 10E). Los resultados que se describen arriba demuestran que el OA inhibe las corrientes del TRPV1 cuando el compuesto es aplicado al lado intra o extracelular del canal, es dosis-dependiente y su efecto sobre el canal es reversible.

1.2. Inhibición del canal TRPV1 por OA durante pulsos continuos a voltajes despolarizantes e hiperpolarizantes

Para estudiar la inhibición del canal TRPV1 ante voltajes despolarizantes e hiperpolarizantes y para corroborar que el OA no activa al canal, se aplicaron pulsos continuos de voltaje a +40 o a -40 mV durante 600 s en parches de membrana “inside-out” de células HEK293 transfectadas con TRPV1. Para determinar el efecto del OA, los parches fueron expuestos a los siguientes tratamientos: 1) capsaicina 4 μ M, 2) lavado con solución de registro (+), 3) OA 5 μ M durante 3 minutos, 4) capsaicina 4 μ M, 5) lavado en solución de registro, 6) OA 5 μ M durante 2 minutos, 6) capsaicina 4 μ M y, por último, 7) lavado con solución de registro. Como se muestra en las figuras 11 A y B, el OA no activa al canal TRPV1 (mientras el OA es aplicado por 3 o 2 minutos no hay activación) y que el OA inhibe la activación del canal a ambos voltajes.

Cuando el canal TRPV1 es expuesto durante periodos cortos pero continuos al agonista en presencia de calcio se observa una disminución en su respuesta, este fenómeno recibe el nombre de “taquifilaxis” (Touska *et al.*, 2011).

Con la finalidad de descartar que la inhibición que observamos con OA pudiera deberse a un efecto de taquifilaxis realizamos los controles que se describen a continuación. Utilizando el mismo protocolo de aplicación de voltajes continuos por periodos largos de tiempo (600 s), solo se analizó la activación de la corriente por capsaicina después de pulsos repetidos de este agonista y como se ve en las figuras 11C y D, la aplicación repetida de capsaicina no produjo cambios en la corriente descartando que los efectos que observamos en las figuras 11A y B se debían a la desensibilización del canal.

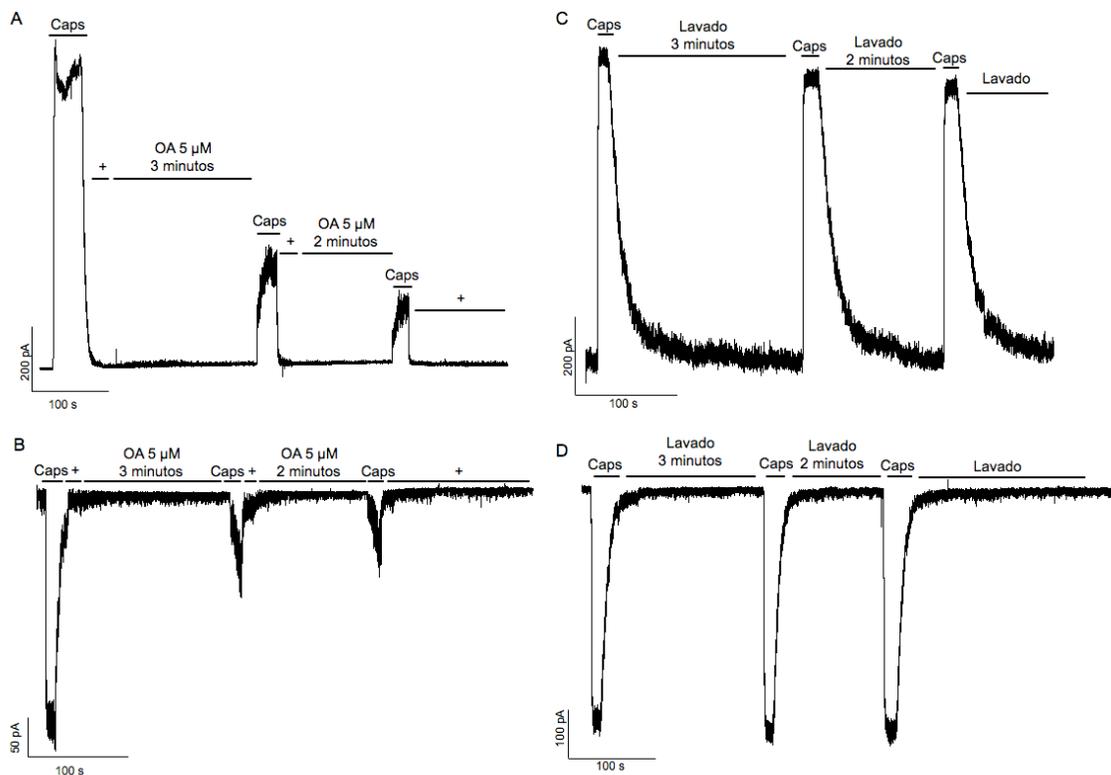


Figura 11. La inhibición de TRPV1 con OA ocurre en voltajes hiperpolarizantes y despolarizantes. Inhibición del TRPV1 con OA 5 μM durante la aplicación de un pulso continuo de voltaje de +40 mV (A) y -40 mV (B) durante 600 s ($n = 6$). El canal fue activado con capsaicina 4 μM (caps), después se lavó el agonista brevemente (+) con solución de registro y se incubó durante 3 minutos en OA para volver a ser activado, lavado e incubado durante 2 minutos en OA y vuelto a activar con capsaicina. Activación del TRPV1 con continuas exposiciones a capsaicina 4 μM durante un pulso continuo de voltaje a +40 mV (C) y -40 mV (D) durante 600 ms, ($n = 3$). El canal fue activado con capsaicina 4 μM (caps) y después lavado (+) durante 3 y 2 minutos.

1.3. El OA inhibe a TRPV1 activado con diferentes agonistas

Dado que el canal TRPV1 es un receptor polimodal, decidimos dilucidar si el OA podía inhibirlo cuando es activado por distintos agonistas. Así, probamos la inhibición del OA cuando el canal era activado por agonistas endógenos como el LPA y el pH ácido. Dado que los protones interaccionan con sitios extracelulares (Jordt *et al.*, 2000) del canal, se probó en parches “outside-out” mientras que el LPA se probó en parches “inside-out” porque su sitio de unión es intracelular (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). Una vez activado el

canal se expuso durante 5 minutos a OA 5 μ M para observar la inhibición. El OA inhibió por completo la corriente evocada por ambos agonistas endógenos de manera similar a lo que observamos con capsaicina (Figs. 12A y B). Para el caso del LPA, la inhibición fue del $95 \pm 2\%$ y para el pH fue del $98 \pm 3\%$ (Fig. 12C).

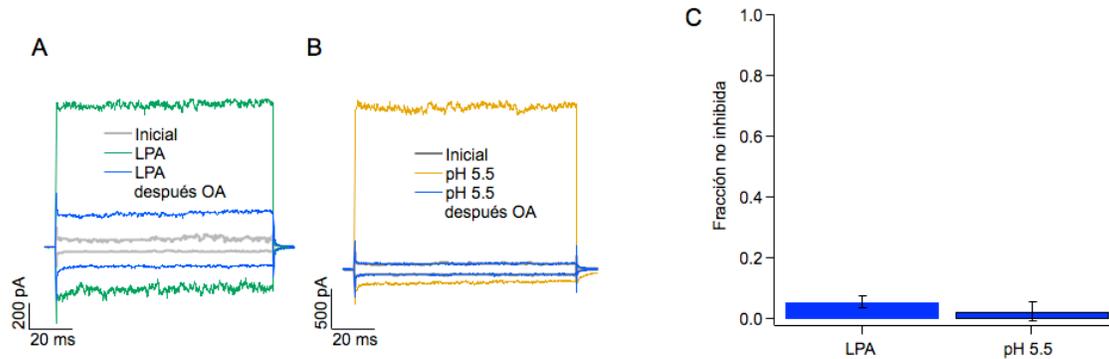


Figura 12. OA inhibe al TRPV1 activado por LPA y pH. (A) Trazo representativo de la inhibición del canal cuando es activado con LPA. El canal se activó con LPA 5 μ M (trazo verde) y se volvió a exponer al agonista después de 5 minutos de incubación de los parches con OA 5 μ M (trazo azul). (B) Trazo representativo de la inhibición del canal cuando es activado con pH 5.5. El canal se activó con pH 5.5 (trazo amarillo) y se volvió a exponer a pH 5.5 después de 5 minutos con OA 5 μ M (trazo azul). (C) Promedio de las fracciones de la corriente que permanecen después de exponer el canal durante 5 minutos a 5 μ M con LPA (n = 10) y pH 5.5 (n = 21).

El OA inhibe al canal cuando es activado con diferentes estímulos que interactúan con distintas regiones del canal. El LPA se une al canal en su extremo C-terminal, los protones en la región extracelular del poro (Ryu *et al.*, 2007), la capsaicina en el sitio vaniloide que engloba a residuos en diferentes segmentos transmembranales más hacia la región intracelular (Yang, *et al.*, 2015). Esto nos sugirió que el OA lleva al canal a un estado refractario a su activación por estímulos de distinta naturaleza.

1.4. La inhibición del canal TRPV1 con ácido oleico es más rápida en el estado cerrado

Una diferencia en la inhibición del canal entre estados abierto y cerrado podría sugerirnos la acción de un mecanismo alostérico sobre el TRPV1 por parte del OA. Para determinar si el OA podía inhibir diferencialmente al canal en los diferentes estados, medimos la velocidad de la inhibición en condiciones en las que el OA 5 μM fue aplicado en presencia o en ausencia de la capsaicina (usando el protocolo que se describe en la sección de Métodos). Al comparar el curso temporal de la inhibición del canal TRPV1 (Fig. 13) observamos al ajustar a una sola exponencial que la inhibición en el estado cerrado es más rápida ($\tau = 2.9$ segundos) que en el estado abierto ($\tau = 7.7 \pm 0.64$ segundos). Esto sugiere que el OA se podría unir directamente al canal y que esta unión se favorece cuando el canal adopta la estructura de estado cerrado, posiblemente porque su sitio de unión esté más expuesto en esta conformación y, una vez unido, actúe estabilizando el estado cerrado e impedir la activación ante cualquier tipo de estímulo.

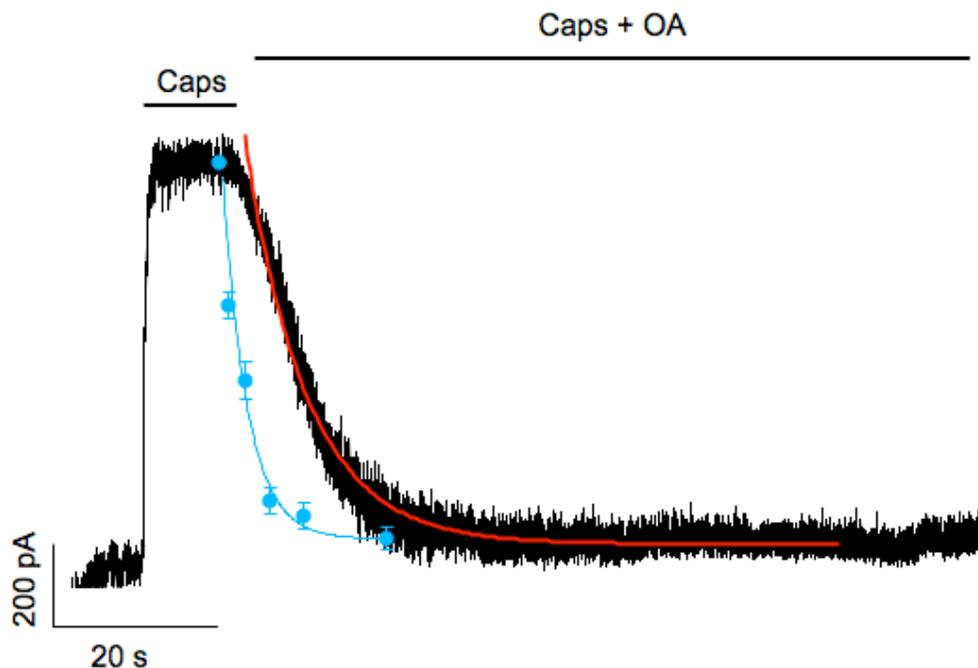


Figura 13. La inhibición es más rápida en el estado cerrado. Curso temporal de la inhibición de TRPV1 con 5 μM OA ($n = 5$). Los datos fueron obtenidos a +60 y -60 mV. En el estado cerrado (línea azul) la inhibición del canal es más rápida que en el estado abierto (línea roja). Valores $\tau = 2.9$ s y $\tau = 7.7 \pm 0.64$ s para estado cerrado y estado abierto, respectivamente.

2. Localización del sitio de unión del OA

2.1. El OA no se une a residuos cargados del canal

El OA en solución fisiológica puede encontrarse cargado negativamente y puede establecer interacciones electrostáticas con grupos cargados positivamente. Para determinar si el sitio de unión del OA estaba determinado por interacciones electrostáticas con residuos con carga positiva, se probaron mutantes del canal de rata en que se eliminó la carga de determinados residuos positivos que potencialmente unieran al OA. Las mutaciones se realizaron en sitios con carga positiva que, de acuerdo con reportes anteriores, son importantes para establecer unión con lípidos: R491, K535, R557, R575 y R701 (Fig. 14A) (Winter *et al.*, 2013).

Además de estos, se mutó el sitio de unión del LPA, K710D (Nieto-Posadas *et al.*, 2012) y el sitio de unión del colesterol, L585I (Picazo-Juárez *et al.*, 2011) ya que estos sitios unen lípidos (Fig. 14A). Finalmente, se probó la mutante donde los residuos 777-821 en el extremo C-terminal fueron deletados ya que se sabe que en este sitio se encuentran numerosos residuos cargados positivamente.

Se midió si el OA inhibe las corrientes de los canales mutantes que generamos en una magnitud distinta a la que observamos en el canal TRPV1 WT. Los resultados demuestran que ninguna de estas mutantes fue diferente en su inhibición por OA de los canales WT de humano y de rata (Fig. 14B).

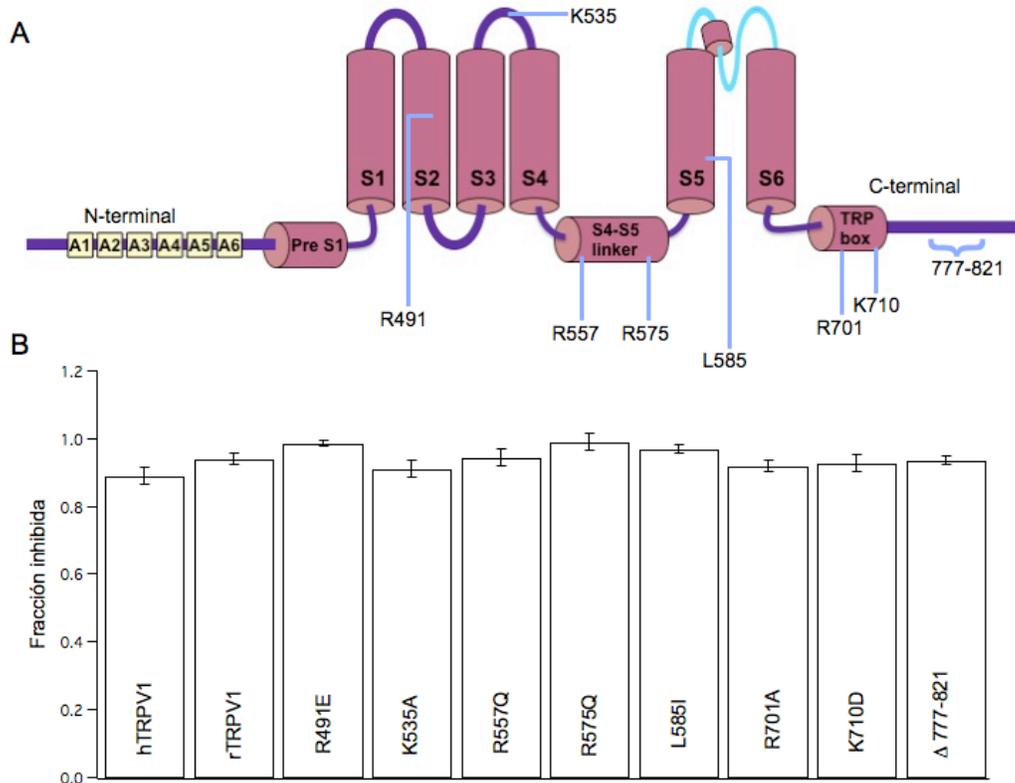


Figura 14. Residuos cargados positivamente no interactúan con el OA en el canal TRPV1. (A) Localización de las 8 mutantes en un esquema del canal TRPV1. Las mutantes se indican con las líneas lila. (B) Fracción de la corriente inhibida después de aplicar OA 5 μ M. Las corrientes fueron activadas con capsaicina 4 μ M y obtenidas a +120 mV (n = 5-11) y la fracción de corriente inhibida se obtuvo dividiendo la corriente final entre la corriente inicial. “hTRPV1” y “rTRPV1” corresponden al canal TRPV1 de humano y de rata, respectivamente.

2.2. El canal TRPV1 aviar se inhibe menos eficientemente por OA que el canal de rata

Posteriormente, nos preguntamos si el efecto del OA es diferente en algún canal ortólogo (de alguna especie distinta al de mamífero) y si eso pudiera ayudarnos a entender el mecanismo molecular que subyace a la inhibición. Así, evaluamos la inhibición del canal TRPV1 aviar (de pollo, *Gallus gallus*) por OA. Tres residuos importantes para la unión de vaniloides en el canal TRPV1 de rata son los residuos Y511, S512 y el T550. Existen diferencias entre el TRPV1 de pollo y de mamífero en el sitio de unión a vaniloides que

resultan en que el canal de pollo sea insensible a la capsaicina. Entre estas se encuentran cambios en la posición 550 del canal TRPV1 de rata (Fig. 15A).

A pesar de ser insensible a capsaicina, el canal aviar se activa con pH ácido (Jordt & Julius, 2002). Así estudiamos la inhibición del canal TRPV1 de pollo con OA (Fig. 15C) y encontramos que la fracción inhibida de la corriente en el canal es significativamente ($p < 0.001$) menor a la que observamos en el canal de rata (Fig. 15B): aproximadamente $25 \pm 11\%$ de la corriente es inhibida en el pollo, mientras que en rata se inhibe el $85 \pm 1\%$ de la corriente (Fig. 15D).

Este resultado nos llevó a sugerir que el sitio de unión del OA al TRPV1 se localiza en el sitio de unión de la capsaicina. Por ello se realizaron diferentes mutaciones en los sitios Y511, S512 y T550 (y sus sitios homólogos en la secuencia de pollo) en residuos del sitio vaniloide de ambos canales para determinar cómo cambiaba la inhibición por OA en estos canales mutantes. Así mismo, se obtuvieron otras mutantes en sitios que se han descrito importantes para la unión de los vaniloides tales como F543 y E570 (Yang *et al.*, 2015).

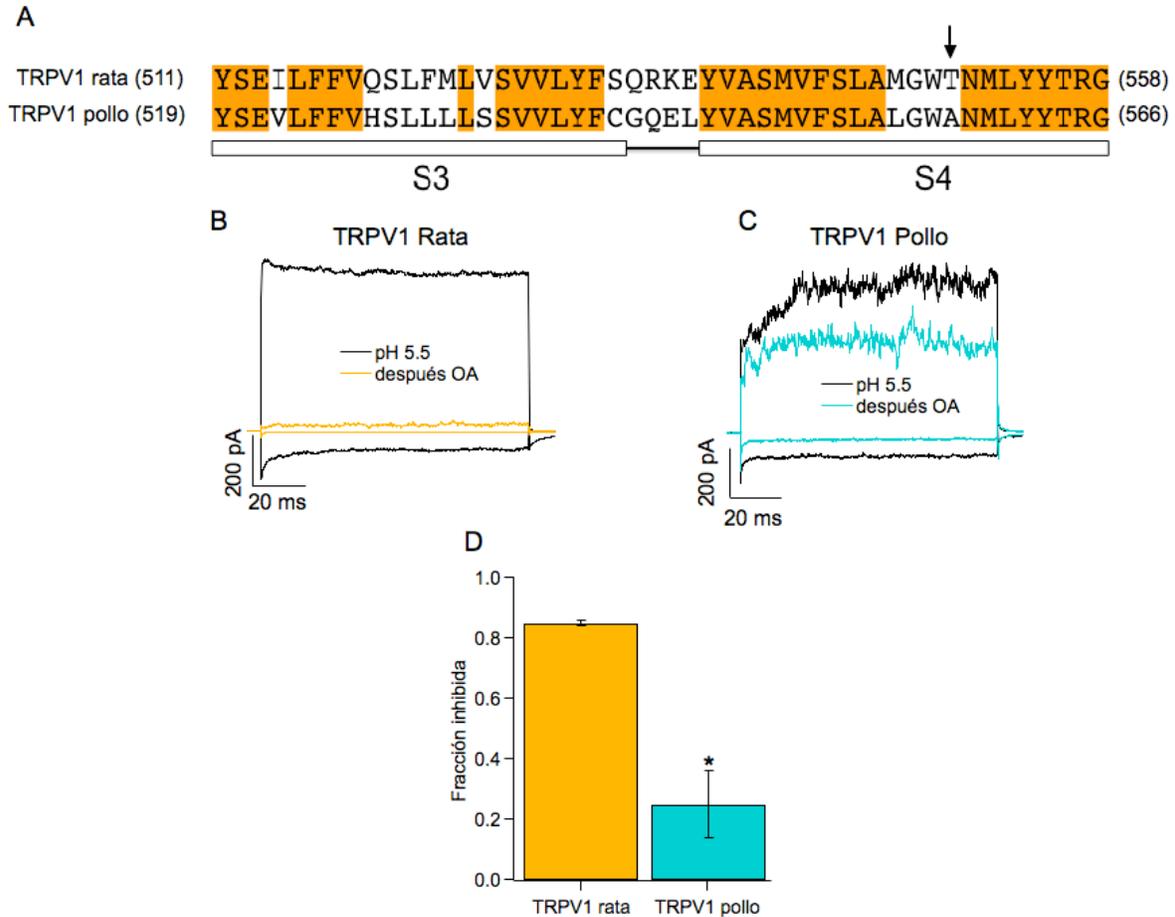


Figura 15. El canal TRPV1 de pollo se inhibe menos que el canal de rata. (A) Secuencia de S3-S4 del canal TRPV1 de rata y de pollo. El residuo T550 se muestra con una flecha en rata y su homólogo en pollo, A558. El color naranja indica los sitios conservados. (B) Trazo representativo de la inhibición del canal TRPV1 de rata. Las corrientes fueron evocadas con pH 5.5 (trazo negro) y la corriente que permanece después de exponer el parche 3 minutos a OA 5 μ M se muestra como el trazo naranja. (C) Trazo representativo de la inhibición del canal TRPV1 de pollo. Las corrientes evocadas con pH 5.5 se muestran como el trazo negro y la corriente que permanece después de exponer el parche 3 minutos a OA 5 μ M en azul. (D) Promedio de la fracción de corrientes inhibidas después de OA 5 μ M. La fracción de corriente inhibida en el canal de pollo (barra azul) (25 \pm 11%, n = 30) es estadísticamente diferente (*p<0.001) de la fracción inhibida en el canal de rata (85 \pm 1%, n = 22) (barra naranja). Barras de error = s.e.m.

2.3. Los residuos Y511, S512 y T550 en el sitio vaniloide unen al OA

Se generaron canales mutantes en donde se introdujeron mutaciones puntuales en los residuos que arriba se mencionan o canales en donde varios de estos residuos fueron mutados en la misma proteína. Así se generaron las siguientes mutaciones: TRPV1 E570A, TRPV1 F543Y, TRPV1 T550A, TRPV1 Y511A T550A, TRPV1 Y511A S512A T550A, TRPV1 Y511A T550I y TRPV1 Y511A S512A T550I.

Las mutantes fueron probadas en parches “outside-out” ya que el canal de pollo no responde a capsaicina y se determinó el grado de inhibición por OA activando a los canales con pH ácido. De esta forma, las corrientes fueron activadas con pH 5.5, expuestas durante 3 minutos a OA 5 μ M y regresados a pH 5.5. La fracción inhibida de la corriente de las mutantes F543Y y E570A introducidas en el canal de rata ($79 \pm 2\%$ y $75 \pm 2\%$, respectivamente) no fue diferente a la observada en el canal silvestre (WT) ($81 \pm 1\%$) (Figs. 16A y B). No obstante, la mutante T550A fue claramente diferente del canal WT ($60 \pm 6\%$, $p < 0.001$), sugiriendo que este residuo es particularmente importante para la interacción del canal con OA, más no el único debido a que gran parte de la corriente permaneció aún después de la exposición de los parches de membrana a OA.

Sin embargo, cuando la mutación T550A se acompañó de la mutación Y511A la fracción inhibida disminuye significativamente con respecto al canal WT ($58 \pm 6\%$, $p = 0.002$; Figs. 16A y C). Más aún, cuando estas dos mutaciones se acompañaron con la mutación S512A la fracción inhibida disminuyó drásticamente con respecto de la que se observó en el canal WT ($36 \pm 6\%$, $p < 0.001$; Fig. 16A y D) y la inhibición de la triple mutante también fue diferente del canal con dos mutaciones (TRPV1 Y511A T550A; $p < 0.01$).

Para confirmar el efecto de la mutación T550A sobre la inhibición del canal por OA menos acentuada, se obtuvo una mutante donde la alanina fue sustituida por isoleucina. En las dobles y triples mutantes con isoleucina observamos un efecto similar al de las mutantes con alanina (Fig. 16A). La fracción inhibida en TRPV1 Y511A T550I fue del $48 \pm 7\%$ y en TRPV1 Y511A S512A T550I fue del $36 \pm 5\%$. Aunque el efecto del OA entre estas mutantes no es significativamente diferente ($p = 0.1$), tampoco son diferentes a su

correspondientes mutantes con alanina (TRPV1 Y511A T550A vs TRPV1 Y511A T550I, $p = 0.15$ y TRPV1 Y511A S512A T550A vs TRPV1 Y511A S512A T550I, $p = 0.49$).

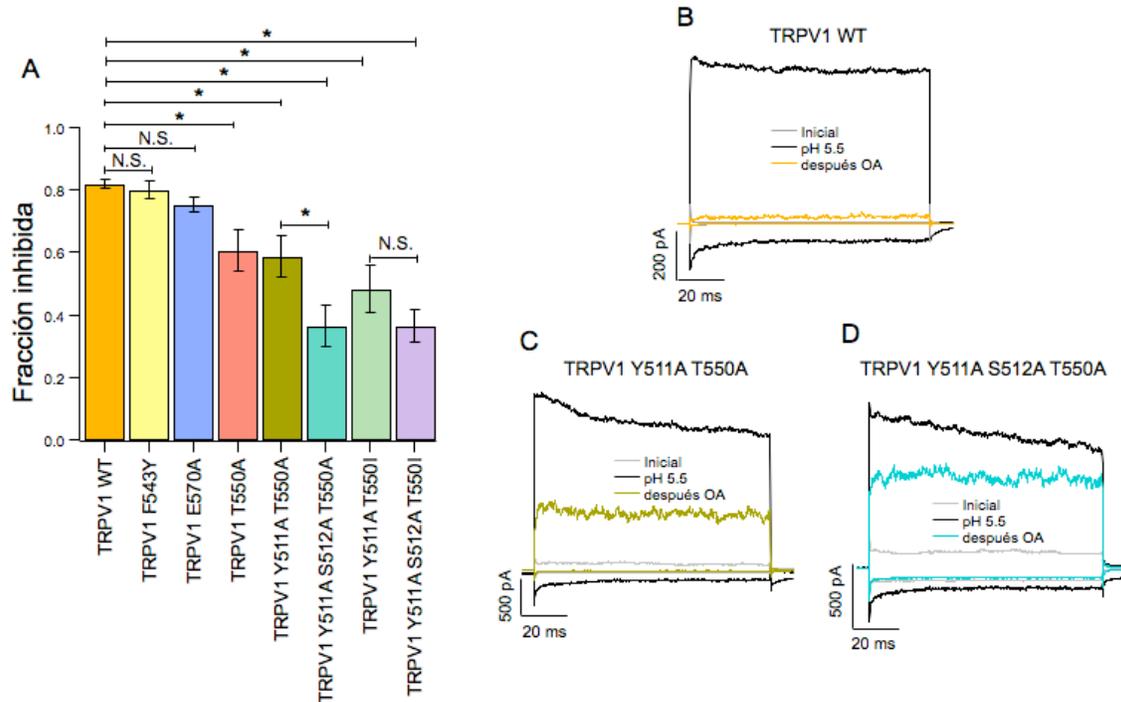


Figura 16. El OA se une al sitio vaniloide del TRPV1. (A) Fracción de la corriente inhibida en las mutantes del sitio vaniloide del TRPV1. TRPV1 WT, barra naranja ($81 \pm 1\%$, $n = 22$); TRPV1 F543Y, barra amarilla ($79 \pm 2\%$, $n = 16$); TRPV1 E570A, barra azul ($75 \pm 2\%$, $n = 13$); TRPV1 T550A, barra salmón ($60 \pm 6\%$, $n = 15$); TRPV1 Y511A T550A, barra verde olivo ($58 \pm 6\%$, $n = 16$); TRPV1 Y511A S512A T550A, barra cian ($36 \pm 6\%$, $n = 15$); TRPV1 Y511A T550I, barra verde claro ($48 \pm 7\%$, $n = 10$) y TRPV1 Y511A S512A T550I, barra lila ($37 \pm 5\%$, $n = 26$). * $p < 0.01$ (B) Trazo representativo de las corrientes que permanecen en TRPV1 WT después de 3 minutos en OA $5 \mu\text{M}$ (trazo naranja) con respecto a la corriente inicial con pH 5.5 (trazo negro). (C) Trazo representativo de las corrientes que permanecen en TRPV1 Y511A T550A después de 3 minutos en OA $5 \mu\text{M}$ (trazo verde olivo) con respecto a la corriente inicial con pH 5.5 (trazo negro). (D) Trazo representativo de las corrientes que permanecen en TRPV1 Y511A S512A T550A después de 3 minutos en OA $5 \mu\text{M}$ (trazo azul) con respecto a la corriente inicial con pH 5.5 (trazo negro).

Los resultados descritos arriba indican que en la posición 550 es importante que haya un residuo hidrofílico que sea capaz de formar puentes de hidrógeno, pues tanto la alanina

como la isoleucina son residuos hidrofóbicos. Los resultados indican que el OA interactúa directamente con el canal en el sitio vaniloide, donde los residuos Y511, S512 y T550 son los responsables de la unión. En especial el residuo T550, porque pensamos que es el responsable de estabilizar la unión del OA por un enlace puente de hidrógeno.

2.4. El canal de pollo TRPV1 A558T se inhibe con OA

Para determinar con mayor detalle el papel del residuo T550 en el canal TRPV1 de rata para la unión del OA fue realizar una mutante del canal de pollo en este sitio y determinar si así este canal se podía inhibir con OA. En el canal de pollo hay una alanina en el sitio homólogo a T550 de rata, A558 (Fig.15A indicado con una flecha), el cual mutamos y cambiamos por treonina para que fuera parecido al canal TRPV1 de rata. A diferencia del canal de pollo silvestre, observamos que este canal mutante es inhibido de forma más similar al de rata (Figs. 17A, B y C). Este canal se inhibe en promedio $68 \pm 10\%$ la cual no fue diferente a la inhibición del canal de rata ($p = 0.11$) pero sí fue diferente con respecto al canal aviar silvestre ($p = 0.004$) (Fig. 17D).

Tanto los experimentos con el canal de pollo y con las otras mutantes indicaron que el sitio de unión del OA se encuentra en el sitio vaniloide, donde los residuos más importantes para su interacción con el canal son Y511, S512 y T550. La inhibición del OA que observamos en el TRPV1 aviar y el de rata es diferente porque los sitios vaniloides son diferentes, debido a la ausencia de treonina en el sitio homólogo a T550.

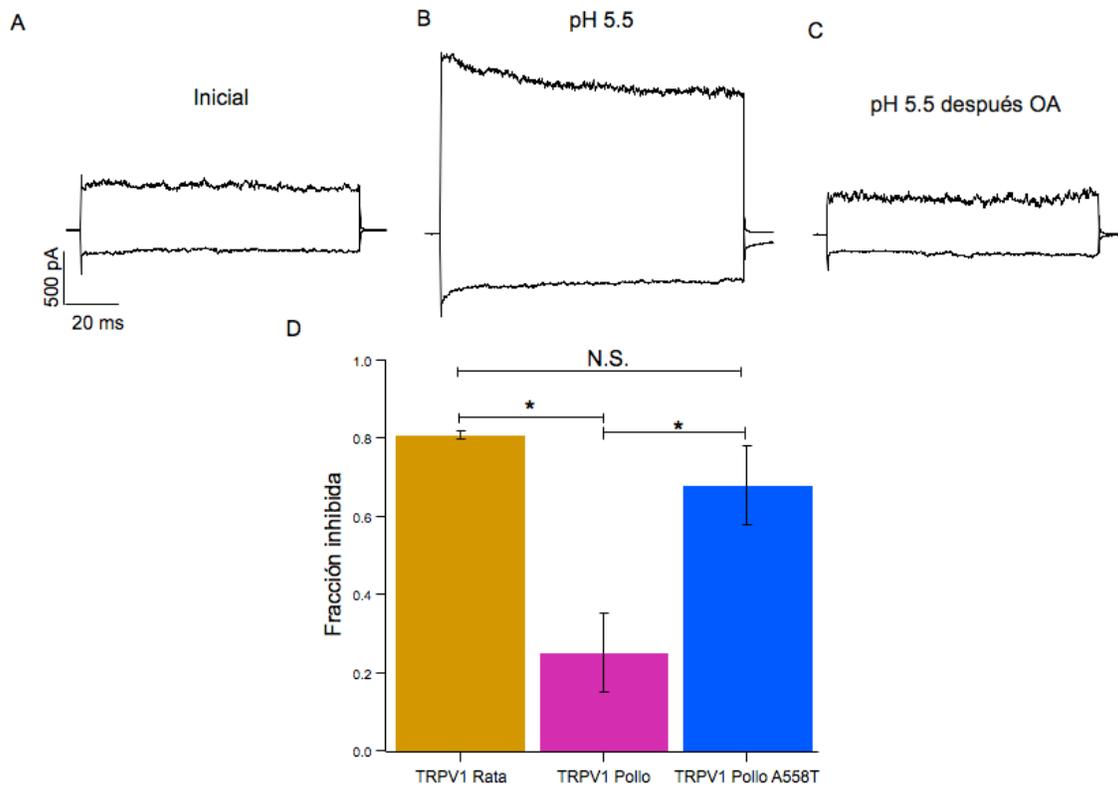


Figura 17. TRPV1 A558T de pollo se inhibe más que el TRPV1 silvestre de pollo. (A) Trazo representativo de la corriente inicial (sin agonista) del canal TRPV1 A558T de pollo (+/- 120 mV). (B) Trazo representativo de la corriente con pH 5.5 del canal TRPV1 A558T de pollo (C) Trazo representativo de la corriente en pH 5.5 después de 3 minutos en OA 5 μ M del canal TRPV1 A558T de pollo (D) Gráfica de la fracción de corriente inhibida por OA en TRPV1 de rata, barra café ($81 \pm 1\%$, $n = 22$); TRPV1 de pollo, barra rosa ($25 \pm 11\%$, $n = 30$) y TRPV1 A558T de pollo, barra azul ($68 \pm 10\%$, $n = 15$) * $p < 0.01$.

Discusión

El estudio de moléculas que modulan la actividad del canal TRPV1 ha recibido mucho interés por parte de la industria farmacológica debido a la estrecha relación que existe entre la activación del TRPV1 y la sensación de dolor en condiciones patofisiológicas. Especialmente, el estudio de sus inhibidores permanece como una estrategia innovadora para formular analgésicos.

Con la presente investigación hemos reportado que un ácido graso abundante en la naturaleza actúa como inhibidor de TRPV1 tanto con estímulos exógenos como endógenos, porque es capaz de unirse a él y modificar sus propiedades de compuerta. La unión de este ácido graso al TRPV1 se origina por interacciones estéricas, así como por la posible formación de un enlace puente de hidrógeno y no por interacciones electrostáticas.

El OA es capaz de inhibir al TRPV1 porque tiene un sitio de unión específico en el canal que se encuentra en el sitio vaniloide, el mismo sitio donde se une el agonista mejor caracterizado del canal, la capsaicina. Sin embargo, la unión del OA al canal resulta en su inhibición. Debido a la diferencia entre la inhibición del canal aviar y de mamífero hemos logrado identificar el sitio donde ocurre dicha interacción. Los residuos que participan en la unión del OA son Y511, S512 en S3 y T550 en S4 y cuando estos tres residuos son intercambiados por alaninas la inhibición se pierde.

Modelando dicha interacción en el canal de rata TRPV1 WT y en la mutante TRPV1 Y511A S512A T550A, podemos sugerir que el residuo T550 en S4 posee un grupo hidroxilo en su estructura que le permite formar el puente de hidrógeno con la molécula de OA, mientras que los residuos Y511 y S512 en S3 contribuyen en la estabilización de la cola hidrofóbica del OA en el espacio (Fig 17A), así el OA parece adoptar una conformación “cabeza arriba-cola abajo”. La alanina es un residuo neutro que a diferencia de la treonina no forma puentes de hidrógeno. Al mutar T550A el OA no puede formar un enlace y la unión se desestabiliza (Fig. 17B), lo cual junto con los sitios Y511 y S512 mutados, resulta en la baja inhibición que observamos funcionalmente.

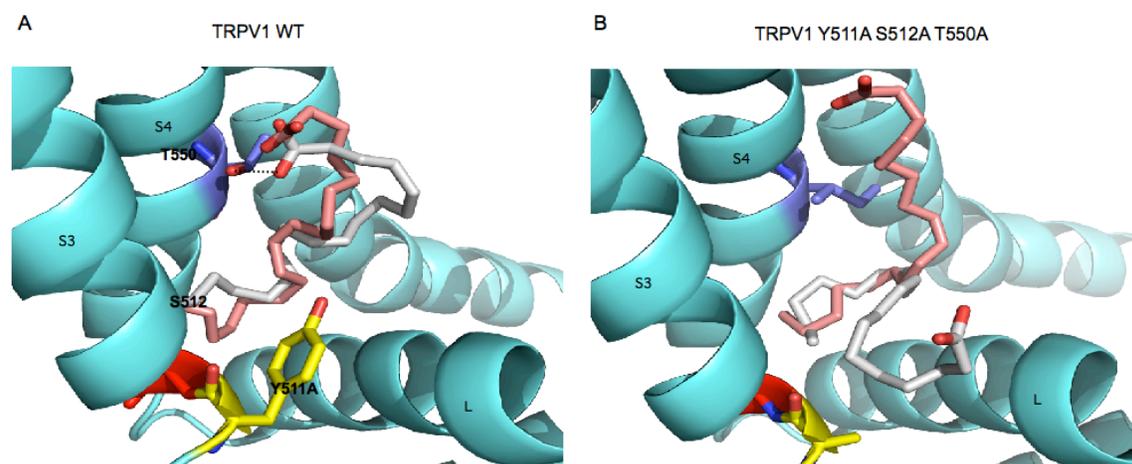


Figura 17. Modelo de la unión del OA al sitio vaniloide. (A) En el canal WT el OA es capaz de unirse a su sitio por los aminoácidos Y511, S512 y T550, indicados en color amarillo, rojo y azul, respectivamente. La unión es estabilizada por la formación de un puente de hidrógeno, representado como una línea punteada, entre T550 y la molécula. (B) En la mutante Y511A S512A T550A, la unión se desestabiliza.

Cabe resaltar que la inhibición de TRPV1 Y511A T550I no sea diferente de TRPV1 Y511A S512A T550I cuando se observó que en las doble y triple mutantes con alanina sí hubo una diferencia significativa. Esto sugiere que el sitio de unión del OA no se modifica de igual manera porque la isoleucina es un residuo de mayor tamaño que la alanina, estéricamente más parecido a la treonina. Por lo cual, el sitio no cambia drásticamente y la unión del OA al TRPV1 se facilita en comparación con la mutante que en el mismo sitio posee alanina.

Los lípidos han sido extensamente caracterizados como moduladores de la actividad de los canales iónicos pero, dentro de ellos, el estudio del OA y su papel sobre los canales es escaso. Si bien anteriormente el OA se ha reportado como inhibidor de otros canales iónicos, el mecanismo no ha sido determinado con detalle. Por ejemplo, sobre los canales K_{ACh} , OA 5 μ M inhibe las corrientes cuando es aplicado en la cara intracelular, sin embargo no se logra el mismo efecto sobre la cara extracelular (Kim & Pleumsamran, 2000). También se ha reportado que el OA a 5 μ M inhibe la corriente dependiente de voltaje de la subunidad- α del canal de Na^+ cardiaco humano (Xiao *et al.*, 1998). Por otra parte tiene efectos contrarios al que nosotros encontramos sobre otros canales, como por ejemplo en

los canales BK_{Ca} , el OA a concentraciones entre 10-50 μM aumenta la actividad (Clarke *et al.*, 2002), similar a lo que se ha observado en canales de sodio del músculo esquelético humano (hSkM1) con OA 5 μM (Wieland *et al.*, 1996). Asimismo, en otros canales parece no tener efecto sobre sus corrientes: en los canales $K_v7.2/3$ no facilita la apertura con una concentración de 70 μM (Liin *et al.*, 2016), en los canales de K^+ en células receptoras de sabores (Gilbertson *et al.*, 1997) y en canales de Na^+ y K^+ en neuronas CA1 (Vreugdenhil *et al.*, 1996) tampoco tiene efecto observable a concentraciones de 10 μM y 16 μM , respectivamente.

Nosotros observamos que el efecto del OA sobre el canal TRPV1 es directo pues el ácido graso se une a él en su sitio vaniloide, la inhibición es reversible, dependiente de la dosis y se presenta cuando se aplica intra y extracelularmente, sin ser una de estas aplicaciones más efectiva que la otra, por lo menos, después de 5 minutos de exposición al OA. De igual manera, observamos que tras repetidas exposiciones a capsaicina la corriente del canal no disminuye, pero sí cuando también es expuesto a OA. Con esto eliminamos la posibilidad de que sea la desensibilización del TRPV1 lo que ocasiona la inhibición y no por el OA.

Hay análogos sintéticos de la capsaicina que son antagonistas del TRPV1, por ejemplo la capsazepina. Sin embargo, la capsazepina actúa como antagonista competitivo, su inhibición es específica a la respuesta de capsaicina y se ha reportado que no inhibe la respuesta de otros estímulos, como los protones (Bevan *et al.*, 1992; Fox *et al.*, 1995). A diferencia de la capsazepina el OA inhibe al canal cuando es estimulado tanto con agonistas exógenos y endógenos, lo cual denota un mecanismo de inhibición distinto.

Otros inhibidores que se han reportado para TRPV1 son las agatoxinas, provenientes del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*. Las agatoxinas inhiben las corrientes de TRPV1 porque bloquean el poro de conducción y por ello su efecto es diferente al del OA, pues únicamente inhiben las corrientes del canal cuando son aplicadas en la cara extracelular y su efecto es estrechamente voltaje-dependiente (Kitaguchi & Swartz, 2005; Morales-Lázaro *et al.*, 2015).

A diferencia de los mencionados antagonistas del TRPV1, el mecanismo inhibitorio del OA se explica por una estabilización del estado cerrado del canal (resultado que se deriva a

partir de experimentos con canales únicos, datos no mostrados). Más aún, como se demostró en los experimentos de inhibición dependientes del estado del canal, el OA inhibe más rápido cuando el canal se encuentra en estado cerrado porque en esta configuración su unión se facilita, en parte por que no compite por el sitio de unión con la capsaicina. Esto nos indicó que el OA funciona como antagonista alostérico de TRPV1, es capaz de modificar las propiedades de compuerta del canal y dificulta la transición al estado activo, dejando al canal en estado refractario para responder a los estímulos de diferentes agonistas (Fig. 18).

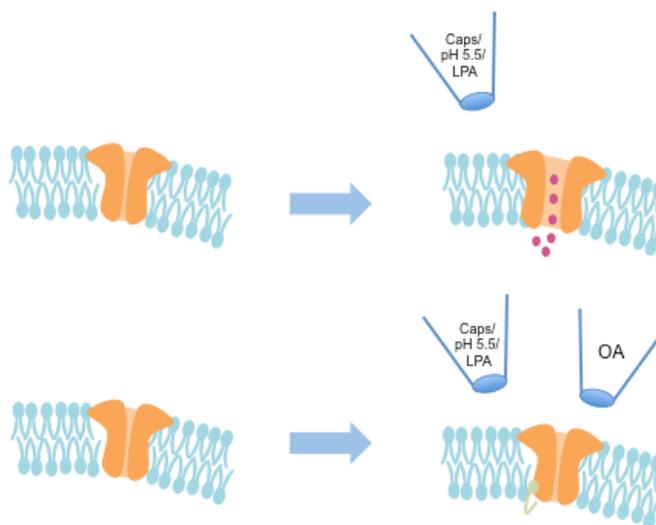


Figura 18. Inhibición con OA del TRPV1. Cuando el canal TRPV1 (representado en naranja) es expuesto a alguno de sus agonistas como capsaicina, pH ácido o LPA, pasará de un estado cerrado a uno abierto y promoverá el flujo de cationes hacia el interior celular (panel superior). Si se expone a OA (representado en verde) el ácido graso se une al canal y no puede pasar a su estado abierto aunque esté expuesto a alguno de sus agonistas (panel inferior).

Es importante resaltar que existen pocos moduladores negativos endógenos del TRPV1 reportados, los cuales incluyen al colesterol, la adenosina y las resolvinas (Morales-Lázaro *et al.*, 2013). El colesterol es un lípido que se une directamente al canal en S5 y actúa reduciendo el número de canales funcionales, es decir, secuestrando al canal en un estado no conductivo (Picazo-Juárez *et al.*, 2011). Otro modulador endógeno es la adenosina, ésta

y sus análogos median la inhibición del TRPV1 por su acción directa sobre el canal, independientemente de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. Sin embargo, su efecto se ha demostrado solo para la activación con capsaicina pero no con estímulos endógenos del TRPV1 (Puntambekar *et al.*, 2004).

Las resolvinas son moléculas endógenas derivadas de ácidos grasos poli-insaturados que incluyen al ácido docosahexaenoico (DHA) del cual se derivan las resolvinas D1 (RvD1) y D2 (RvD2) y al ácido eicosapentaenoico (EPA) del cual se deriva la resolvina E1 (RvE1). El mecanismo de acción de las resolvinas aún no es claro pero se piensa que no es directamente sobre el TRPV1 (Park *et al.*, 2011).

Conclusiones

La inhibición del TRPV1 con el OA es reversible y dosis dependiente porque su efecto es específico y directo sobre el canal, entonces posee un sitio de unión determinado. El sitio de unión del OA engloba a los residuos Y511, S512 y T550 que se ubican en el sitio vaniloide. Es por ello que el canal de origen aviar es inhibido en menor medida por el OA, porque no presenta una treonina en la posición correspondiente a 550 sino una alanina, pero al regresar una treonina a dicho sitio hay inhibición similar a lo que se observa en el canal TRPV1 de rata.

El OA es capaz de inhibir las corrientes del TRPV1 cuando es activado por diferentes agonistas debido a que es un inhibidor alostérico; al unirse estabiliza algún estado cerrado del TRPV1 e impide que cualquier estímulo lo vuelva a activar. Asimismo, tiene mayor afinidad por el canal cuando se encuentra en un estado cerrado, en parte porque se une en el sitio vaniloide y en ausencia de la capsacina no debe competir por el sitio.

Bibliografía

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., & Roberts, K. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, NY.
2. Anand, P., & Bley, K. (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British journal of anaesthesia*, 107(4), 490-502.
3. Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, CS., & Yeats, J. C. (1992). Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British journal of pharmacology*, 107(2), 544-552.
4. Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., & Julius, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, 504(7478), 113-118.
5. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816-824.
6. Catterall, W. A. (2010). Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915-928.
7. Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517-524.
8. Clarke, A. L., Petrou, S., Walsh, J. V., & Singer, J. J. (2002). Modulation of BKCa channel activity by fatty acids: structural requirements and mechanism of action. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 283(5), C1441-C1453.
9. Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224, 285 – 287.
10. De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2005). Lipids as regulators of the activity of transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels. *Life sciences*, 77(14), 1651-1666.
11. Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
12. Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 3760-3772.

13. Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C. J., Devesa, I., & Ferrer-Montiel, A. (2014). Trafficking of thermotrp channels. *Membranes*, 4(3), 525-564.
14. Fox, A. J., Urban, L., Barnes, P. J., & Dray, A. (1995). Effects of capsazepine against capsaicin-and proton-evoked excitation of single airway C-fibres and vagus nerve from the guinea-pig. *Neuroscience*, 67(3), 741-752.
15. Garbay, B., Boiron-Sargueil, F., Shy, M., Chbihi, T., Jiang, H., Kamholz, J., & Cassagne, C. (1998). Regulation of Oleoyl-CoA Synthesis in the Peripheral Nervous System: Demonstration of a Link with Myelin Synthesis. *Journal of neurochemistry*, 71(4), 1719-1726.
16. Gilbertson, T. A., Fontenot, D. T., Liu, L. I. D. O. N. G., Zhang, H. U. A. I., & Monroe, W. T. (1997). Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 272(4), C1203-C1210.
17. Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. Sunderland, MA. 814 pp.
18. Islas, L.D. 2009. Excitabilidad Celular. *En: Fanjul, M.L. & M. Hiriart (Eds.). Biología Funcional de los Animales II. Siglo XXI*, pp. 11-39.
19. Jara-Oseguera, A., Simon, S. A., & Rosenbaum, T. (2008). TRPV1: on the road to pain relief. *Current molecular pharmacology*, 1(3), 255.
20. Jordt, S. E., Tominaga, M., & Julius, D. (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 8134-8139.
21. Jordt, S. E., & Julius, D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*, 108(3), 421-430.
22. Kim, D., & Pleumsamran, A. (2000). Cytoplasmic unsaturated free fatty acids inhibit ATP-dependent gating of the G protein-gated K⁺ channel. *The Journal of general physiology*, 115(3), 287-304.
23. Kitaguchi, T., & Swartz, K. J. (2005). An inhibitor of TRPV1 channels isolated from funnel Web spider venom. *Biochemistry*, 44(47), 15544-15549.
24. Liao, M., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504(7478), 107-112.

25. Liin, S. I., Karlsson, U., Bentzen, B. H., Schmitt, N., & Elinder, F. (2016). Polyunsaturated fatty acids are potent openers of human M-channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Acta Physiologica*.
26. Medina, J. M., & Taberner, A. (2002). Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. *Journal of Physiology-Paris*, 96(3), 265-271.
27. Minke, B. (2010). The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of neurogenetics*, 24(4), 216-233.
28. Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the Drosophila *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313-1323.
29. Morales-Lázaro, S. L., Simon, S. A., & Rosenbaum, T. (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *The Journal of physiology*, 591(13), 3109-3121.
30. Morales-Lázaro, S. L., Serrano-Flores, B., Llorente, I., Hernández-García, E., González-Ramírez, R., Banerjee, S., Miller, D., Gududuru, V., Fells, J., Norman, D., Tigyi, G., Escalante-Alcalde, D., & Rosenbaum, T. (2014). Structural determinants of the transient receptor potential 1 (TRPV1) channel activation by phospholipid analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24079-24090.
31. Morales-Lázaro, S.L., & Rosenbaum, T. (2015). A painful link between the TRPV1 channel and lysophosphatidic acid. *Life sciences*, 125, 15-24.
32. Morales-Lazaro, S.L., Hernández-García, E., Serrano-Flores, B., & Rosenbaum, T. (2015). Organic Toxins as Tools to Understand Ion Channel Mechanisms and Structure. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(7), 581-603.
33. Ntambi, J. M. (1999). Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of lipid research*, 40(9), 1549-1558.
34. Nieto-Posadas, A., Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L., & Rosenbaum, T. (2012). Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature chemical biology*, 8(1), 78-85.
35. Park, C. K., Xu, Z. Z., Liu, T., Lü, N., Serhan, C. N., & Ji, R. R. (2011). Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1,

- inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *The Journal of Neuroscience*, 31(50), 18433-18438.
36. Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell calcium*, 38(3), 233-252.
37. Picazo-Juarez, G., Romero-Suarez, S., Nieto-Posadas, A., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Briggs, M., McIntosh, T.J., Simon, S.A., Ladrón-de-Guevara, E., Islas, L.D., & Rosenbaum, T. (2011). Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 24966-24976.
38. Puntambekar, P., Van Buren, J., Raisinghani, M., Premkumar, L. S., & Ramkumar, V. (2004). Direct interaction of adenosine with the TRPV1 channel protein. *The Journal of neuroscience*, 24(14), 3663-3671.
39. Rosenbaum, T., & Gordon, S. E. (2002). Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron*, 33(5), 703-713.
40. Rosenbaum, T. & S. Simon. (2007). TRPV1 Receptors and Signal Transduction. *En: Liedtke, W. B. & S. Heller (Eds.). TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press/Taylor & Francis.
41. Ryu, S., Liu, B., Yao, J., Fu, Q., & Qin, F. (2007). Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *The Journal of Neuroscience*, 27(47), 12797-12807.
42. Sales-Campos, H., Reis de Souza, P., Crema Peghini, B., Santana da Silva, J., & Ribeiro Cardoso, C. (2013). An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(2), 201-210.
43. Stein, A. T., Ufret-Vincenty, C. A., Hua, L., Santana, L. F., & Gordon, S. E. (2006). Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *The Journal of general physiology*, 128(5), 509-522.
44. Szallasi, A., Cortright, D. N., Blum, C. A., & Eid, S. R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature reviews drug discovery*, 6(5), 357-372.
45. Terés, S., Barcelo-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J. E., & Escribá, P. V. (2008). Oleic acid content is responsible for the reduction in blood

- pressure induced by olive oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 13811-13816.
46. Tombola, F., Pathak, M. M., & Isacoff, E. Y. (2006). How does voltage open an ion channel?. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 23-52.
47. Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., & Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3), 531-543.
48. Touska, F., Marsakova, L., Teisinger, J., & Vlachova, V. (2011). A “cute” desensitization of TRPV1. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(1), 122-129.
49. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual review of biochemistry*, 76, 387.
50. Vreugdenhil, M., Bruehl, C., Voskuyl, R. A., Kang, J. X., Leaf, A., & Wadman, W. J. (1996). Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12559-12563.
51. Wieland, S. J., Gong, Q. H., Poblete, H., Fletcher, J. E., Chen, L. Q., & Kallen, R. G. (1996). Modulation of human muscle sodium channels by intracellular fatty acids is dependent on the channel isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19037-19041.
52. Winter, Z., Buhala, A., Ötvös, F., Jósavay, K., Vizler, C., Dombi, G., Szakonyi, G. & Oláh, Z. (2013). Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel—an overview of the current mutational data. *Molecular pain*, 9(1), 1.
53. Xiao, Y. F., Wright, S. N., Wang, G. K., Morgan, J. P., & Leaf, A. (1998). Fatty acids suppress voltage-gated Na⁺ currents in HEK293t cells transfected with the α -subunit of the human cardiac Na⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2680-2685.
54. Yang, F., Xiao, X., Cheng, W., Yang, W., Yu, P., Song, Z., Yarov-Yarovoy, V., & Zheng, J. (2015). Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nature chemical biology*, 11(7), 518-524.