



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Biología experimental

Regulación del canal TRPV1 por la anandamida

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Rebeca Juárez Contreras

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Sara Luz Morales Lázaro

Instituto de Fisiología celular, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rocio Salceda Sacanelles

Instituto de Fisiología celular, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Roberto Sánchez Sánchez

Instituto Nacional de Rehabilitación

MÉXICO, CD. MX.

Octubre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Biología experimental

Regulación del canal TRPV1 por la anandamida

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Rebeca Juárez Contreras

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Sara Luz Morales Lázaro

Instituto de Fisiología celular, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rocio Salceda Sacanelles

Instituto de Fisiología celular, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Roberto Sánchez Sánchez

Instituto Nacional de Rehabilitación

MÉXICO, CD. MX.

Octubre, 2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática en su sesión ordinaria del día 26 de julio de 2019, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **JUÁREZ CONTRERAS REBECA** con número de cuenta **309198264** con la tesis "Regulación del canal TRPV1 por la anandamida", realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA LUZ MORALES LAZARO:**

Presidente: DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
Vocal: DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO
Secretario: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
Suplente: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ
Suplente: DR. RICARDO GONZÁLEZ RAMÍREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 03 de septiembre de 2019



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos institucionales.

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- Este proyecto fue financiado por el Programa de la dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGPA)-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IA202717 y No. IN206819.
- A CONACyT por el apoyo económico brindado con la beca para alumnos nacionales con número 488802.
- A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro del Instituto de Fisiología Celular, UNAM quien participó como tutor principal.
- Al comité tutor integrado por el Dr. Roberto Sánchez Sánchez y la Dra. Roció Salceda Sacanelles.

Agradecimientos formales.

- Al comité sinodal integrado por el Dr. Ricardo González Ramírez, la Dra. Magda Guerra Crespo, la Dra. Roció Salceda Sacanelles, el Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y la Dra. Rosa Ventura Martínez por sus observaciones, asesoría e importante contribución a este trabajo.
- A la Dra. Tamara Rosenbaum Emir, por permitir el uso del laboratorio donde se realizó este trabajo y por sus valiosos comentarios respecto al mismo.
- A la Biol. Alejandra Llorente Gil por su apoyo técnico para el desarrollo de este proyecto.
- Al Laboratorista Félix Sierra Ramírez por su apoyo técnico.
- Al Dr. Héctor Alfonso Malagón Rivero por su apoyo con el mantenimiento y manipulación de animales (Unidad de Bioterio del Instituto de Fisiología, UNAM).
- A la M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, por su apoyo técnico (Unidad de Computo del Instituto de Fisiología, UNAM).
- A Francisco Pérez Eugenio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su ayuda técnica.

Agradecimientos personales.

De forma personal quiero agradecer primero a Dios, por todo lo que representa para mí y por poner en mi vida a personas maravillosas que me convierten en lo que soy.

A mi familia, que amo con todo mi corazón y que me ha dado todo. Mis padres que me han enseñado la importancia del respeto, la justicia, la compasión y el valor del trabajo. A mis hermanos Alejandro y Rubén por guiarme, ser mis amigos, compañeros y mis primeros maestros.

A la tía Caro por el apoyo que me ha brindado toda la vida y por ser miembro de mi familia.

A Bety por su apoyo incondicional y por ser una hermana cuando más la necesite.

A Isaac, para quien las palabras no alcanzan pues se mantuvo conmigo cuando las cosas se pusieron más feas, por su ayuda y enseñanzas y sobre todo por su amistad.

A los miembros del laboratorio, la Dra. Sara nuevamente por toda su paciencia, su apoyo y por todo lo que me ha enseñado.

A la Dra. Tamara por la confianza para permitirme continuar en el laboratorio.

A Alejandra por su consejo y apoyo, porque sin sus palabras no hubiera podido seguir adelante.

A Félix por sus observaciones, sus consejos y por su apoyo.

A mis amigos del laboratorio por compartir conmigo tantas anécdotas, a Raúl que siempre tuvo una palabra de ánimo, a Óscar y Angélica, porque su buena actitud ayudó a renovar el ambiente del laboratorio. A Ileana y Ana con quienes más de una vez me he reído de nuestros problemas.

A Miguel, porque me enseñó a ser más cuidadosa con mi trabajo.

A los amigos que no podría contar, que por la distancia y el tiempo nos hemos dejado de ver y que me acompañaron en mi formación académica, a los profesores que participaron de la misma.

A los amigos y familia que ya no podrán leer esto pero que hubieran estado felices de acompañarme.

Gracias a todos por hacer de este proceso una experiencia que recordare siempre con mucho cariño.

Dedicado a mis padres.

Deseo de corazón que esto sea una alegría más para ustedes y que podamos seguir logrando cosas juntos.

Índice.

	Pág.
Abreviaturas.	
1. Resumen.	1
1. Abstract.	3
2. Introducción.	
2.1. La percepción del dolor.	5
2.2. El canal TRPV1.	9
2.3. Moduladores endógenos para la regulación del canal TRPV1.	12
2.4. La anandamida.	12
3. Hipótesis.	16
4. Objetivos.	16
5. Materiales y métodos.	
5.1. Cultivos celulares.	17
5.2. Transfección.	18
5.3. Tratamientos en los cultivos celulares.	18
5.4. Extracción de proteína total.	20
5.5. Marcaje de proteína de membrana.	21
5.6. Western blot.	21
5.7. Preparación de Stocks de compuestos.	22
5.8. Ensayos de conducta de dolor agudo.	23
5.9. Análisis de resultados	23
6. Resultados.	

6.1.	La capsaicina modifica los niveles proteicos del canal TRPV1.	24
6.2.	Efectos de la AEA en los niveles de proteína del canal TRPV1.	26
6.3.	La cantidad de canales TRPV1 en membrana plasmática disminuye por efecto del tratamiento con AEA.	29
6.4.	AEA modifica los niveles de proteína total TRPV1 de manera independiente a serina 116.	30
6.5.	Participación del calcio extracelular en los efectos de la AEA sobre los niveles de proteína total de TRPV1.	35
6.6.	Determinación de la participación de la vía del lisosoma en la disminución de los niveles proteicos de TRPV1 por efecto de AEA.	36
6.7.	El efecto negativo de la AEA en los niveles proteicos de TRPV1 se conserva en neuronas DRG.	38
6.8.	La AEA disminuye el dolor asociado a la activación del canal TRPV1.	40
7.	Discusión.	
7.1.	Los niveles proteicos del canal TRPV1 disminuyen por efecto de AEA.	41

7.2. Mecanismo molecular que participa en los efectos de la AEA en la desensibilización de TRPV1.	43
7.3. La AEA produce analgesia del dolor mediado por la activación del canal TRPV1.	45
8. Conclusiones.	47
9. Perspectivas.	48
10. Bibliografía.	49

Abreviaturas:

AEA: Anandamida.

AC: Adenilato ciclasa.

ASIC: Canales iónicos sensibles a protones.

cAMP: Monofosfato de Adenosina cíclico.

CaM: Calmodulina.

CB1: Receptor Cannabinoide 1.

CB2: Receptor Cannabinoide 2.

CLQ: Cloroquina.

Ctrl: Control.

DAG: Diacil glicerol.

DRG: Ganglios de la raíz dorsal en inglés *Dorsal Root Ganglion*.

D10: Medio de cultivo DMEM complementado con suero fetal bovino al 10%.

EGTA: Etilenglicol-bis (2-aminoetieleter)-N N N'N'-tetra acético.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

FAAH: Ácido graso amida hidrolasa en inglés *Fatty acid amide hydrolyase*

GAPDH: Gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa.

NGF: *Nerve Growth Factor*

IASP: *International Association for the Study of Pain*

Kv: Canales de potasio dependientes de voltaje.

Nav: Canales de sodio dependientes de voltaje.

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos

NADA: N-araquidonoil-dopamina.

Nt: Neurotransmisores.

PBS: Buffer de fosfatos.

PBST: Buffer de fosfatos con tween 20 al 0.1%.

PKA: Proteína Cinasa A.

PKC: Proteína Cinasa C.

PLC: Fosfolipasa C.

PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

SFB: Suero fetal bovino.

THC: Tetrahidrocannabinol.

TRPV1: Receptor de potencial transitorio en inglés *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*.

HEK293: Línea celular de células de riñón de embrión humano (*Human Embryonic Kidney*)

IP3: Inositol trifosfato.

2- AG: 2-araquidonilglicerol.

TRPV1r: Receptor de Potencial Transitorio vanilloide 1 de origen de rata.

Vh: Vehículos.

WB: *Western Blot*.

WT: Silvestre.

1. Resumen.

El dolor funciona como una sensación no placentera que alerta sobre el daño real o potencial, sin embargo, en ocasiones persiste luego de aliviar el problema que lo origina; una de las proteínas que participa de forma importante en la transducción del dolor es el Receptor de Potencial Transitorio Vaniloide 1 (TRPV1, por *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*), un canal polimodal catiónico no selectivo, que se expresa en neuronas sensoriales y que al ser activado puede generar la sensación de dolor. TRPV1 puede ser modulado por ligandos endógenos, que lo activan o lo inhiben por interacción directa o bien al propiciar cambios en el umbral de activación; una de estas moléculas de origen endógeno es la anandamida (AEA), un compuesto de tipo endocannabinoide derivado del ácido araquidónico que se asocia a efectos analgésicos. Actualmente, no se ha reportado evidencia experimental sobre la influencia de la AEA en la regulación de los niveles proteicos de TRPV1, a diferencia de lo reportado para la capsaicina, un agonista exógeno de TRPV1, que modifica los niveles proteicos de este canal, favoreciendo un estado desensibilizado.

En este trabajo se buscó determinar si la AEA puede modificar los niveles proteicos de TRPV1. Para ello se realizaron ensayos con cultivos de células HEK293 que expresan transitoriamente al canal TRPV1 y cultivos primarios de neuronas de ganglios de la raíz dorsal (DRG por *Dorsal Root Ganglion*), los cuales fueron sometidos a tratamientos con diferentes concentraciones de AEA. Se encontró que este endocannabinoide, modifica los niveles proteicos totales y de membrana plasmática de TRPV1, disminuyendo en la misma proporción en las diferentes concentraciones y diferentes tiempos. El efecto de la AEA es mediado por el calcio extracelular, dado que al aplicar el tratamiento en ausencia del catión no se modificaron los niveles proteicos de TRPV1. Aunado a ello, nos preguntamos por la influencia del estado de fosforilación de TRPV1 en serina (S) 116 por su relevancia previamente reportada; para ello utilizamos células HEK293 con expresión transitoria de mutantes del canal TRPV1, dicho residuo se modificó por una alanina (S116A) o un ácido aspártico (S116D), y se observó que el canal

disminuye en la misma proporción en el canal WT como en las mutantes, lo que indica que no depende de la fosforilación en este aminoácido. Conjuntamente, se determinó que la AEA regula los niveles proteicos de TRPV1 a través de la vía del lisosoma, debido a que el bloqueo de esta vía de degradación proteica rescata parcialmente los niveles de TRPV1. Finalmente, demostramos que la AEA inhibe la respuesta de dolor agudo producido por la activación de TRPV1. Estos resultados permiten concluir, de acuerdo con la hipótesis planteada, que la AEA si disminuye los niveles proteicos de TRPV1, esta vía comparte algunas características con lo previamente reportado para agonistas exógenos, ya que el canal disminuye a nivel de proteína total y de membrana plasmática, depende de la entrada de calcio extracelular y promueve la degradación por la vía del lisosoma; por otra parte, a diferencia de la capsaicina, la AEA disminuye el nivel de TRPV1 en la misma proporción en las distintas concentraciones y tiempos de incubación probados, además es independiente de la fosforilación en la S116. Esto sugiere un mecanismo diferente al provocado por los agonistas exógenos, que por su potencial terapéutico debe ser estudiado con mayor detalle.

1. **Abstract.**

Pain is an unpleasant sensation that alerts us from actual or potential harm. Among the proteins play an important role in the transduction of pain signal is the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1), a polymodal non-selective cationic channel that is expressed in sensory neurons.

TRPV1 can be modulated by endogenous ligands which regulate the TRPV1 activity by direct interaction or by promoting changes in the activation threshold; one of these molecules is anandamide (AEA), an endocannabinoid compound derived from arachidonic acid that is associated with analgesic effects. Currently, no experimental evidence has been reported on the influence of AEA in the regulation of protein levels of TRPV1, unlike for capsaicin, an exogenous agonist of TRPV1, which modifies the protein levels of this channel, favoring desensitized state.

This work sought to determine if the AEA can modify the protein levels of TRPV1. The experiments were carried out on cultures of HEK293 cells that express transiently to the TRPV1 channel and primary cultures of dorsal root ganglion neurons (DRG), which were subjected to treatments with different concentrations of AEA. It was found that this endocannabinoid modifies the total protein and plasma membrane levels of TRPV1. The effect of AEA is mediated by extracellular calcium, since the cells were treated with AEA and EGTA, the protein levels of TRPV1 were not modified. In addition, we wonder about the AEA effects over mutants of the TRPV1 channel, where serine 116 (S116) was replace by alanine or aspartic acid (S116A or S116D, respectively). The total protein levels of these mutant channels also were decreased by AEA treatment. In addition, we determined that AEA decrease protein TRPV1 levels through the lysosome pathway, since the inhibition of this degradation pathway partially rescues TRPV1 levels.

Finally, we demonstrate that AEA inhibits the acute pain response produced by the activation of TRPV1.

All these results allow us to conclude, according to the hypothesis proposed, that the AEA decreases the protein levels of TRPV1 by degradation through lysosomal pathway.

2. Introducción.

2.1. La percepción del dolor.

De acuerdo con la IASP (*International Association for the Study of Pain*), el dolor es una sensación no placentera que puede ser fisiológica o incluso emocional y que se asocia al daño ya sea real o potencial (Loeser y Treede, 2008), a pesar de la incomodidad que produce sentir dolor, cumple con una función adaptativa para la sobrevivencia, al alertar al organismo de condiciones adversas o de daño, esto obliga a poner atención en el sitio afectado para tratarlo para su pronta recuperación. No obstante, el dolor puede persistir después de la recuperación del daño, constituyendo un problema por sí mismo, denominado como dolor crónico.

El dolor crónico es común en diversas patologías como la neuropatía diabética, la irritación intestinal, la artritis y el cáncer (Nilius y Flockerzi, 2014; Hylands-White et al., 2017), lo que resulta en muchos casos de una mayor sensibilidad de los receptores, por lo que condiciones inocuas pueden producir dolor (Numazaki et al., 2002; Bhave et al., 2003; Woolf, 2004; Lee et al., 2005).

El dolor crónico no es un problema menor ya que se estima que el 20 % de la población mundial lo padece (Steingrimsdóttir et al., 2017) y puede durar meses o inclusive años, los pacientes deben acostumbrarse a vivir con esta condición que les impide desarrollar sus actividades cotidianas y representa gastos económicos importantes (Hylands-White et al., 2017).

La búsqueda de analgésicos de mayor efectividad, ha conseguido herramientas capaces de hacer el dolor crónico tolerable para los pacientes, actualmente hay analgésicos disponibles con diferentes blancos de acción, los no opioides son de acción rápida y bajo costo, pero su uso se limita por la dosis máxima tolerada, los pacientes con dolor crónico rara vez logran mantener el alivio a largo plazo y sus efectos secundarios deben ser evaluados en cada paciente, por ejemplo los analgésicos no esteroides que inhiben a las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, como el ácido acetilsalicílico, evitan la producción de moléculas proinflamatorias, pero por la amplia distribución de estas enzimas su inhibición

incrementa el riesgo del estado protrombotico vascular y de enfermedades coronarias del corazón, por lo que se debe considerar la predisposición a estas enfermedades antes de su uso (Woolf, 2004; Hylands-White et al., 2017).

Los agonistas de los receptores opioides μ son ampliamente utilizados en la clínica, promueven la actividad de los canales de K^+ , responsables de la hiperpolarización de las neuronas, e inhiben a los canales de Ca^{2+} con lo que reducen la transmisión de estímulos, sin embargo, pese a su efectividad su uso produce tolerancia a dosis cada vez mayores en poco tiempo y sus efectos secundarios son severos e incluso pueden ser mortales, entre ellos se reporta que producen náuseas, sedación, disfunción cognitiva y depresión respiratoria (Woolf, 2004; Hylands-White et al., 2017). Para el desarrollo de terapias más eficaces contra el dolor es necesario comprender los mecanismos moleculares que lo modulan.

A nivel celular, el dolor inicia por la activación de neuronas sensoriales especializadas conocidas como nociceptores, estas inervan a la piel y a los órganos internos, sus somas se encuentran en los DRG y poseen una proyección que se comunica con la medula espinal por lo que forman la conexión con el sistema nervioso central (figura 1). Los axones de los nociceptores se agrupan en fibras que se clasifican dependiendo de su grado de mielinización, las no mielinizadas se conocen como fibras C y conducen estímulos de baja velocidad (alrededor de 0.4–1.4 m/s), las poco mielinizadas se conocen como fibras A δ y su conducción de velocidad es media (alrededor de 5–30 m/s) (Dubin y Patapoutian, 2010). En la membrana plasmática de las terminales de los nociceptores hay un repertorio de canales iónicos por ejemplo algunos miembros de la familia TRP como TRPV1 y TRPA1 (TRP anquirina 1), los canales sensibles a protones (ASIC, por *acid sensing ion channel*) y canales activados por ligando como los P2X. La apertura de estos canales ocurre por estímulos definidos y ocasiona el flujo de iones por lo que se despolariza la membrana y la señal ambiental se convierte en una señal eléctrica que puede reconocer el sistema nervioso e interpretar como dolor, esto constituye la transducción y es el primer paso de la nocicepción. Como consecuencia de la despolarización se pueden activar canales de sodio (Na_v) que dirigen la entrada de

cargas positivas con lo que el voltaje puede llegar a producir un potencial de acción que se propague por el axón hasta la presinápsis, esto constituye la transmisión o propagación y se regula mediante la actividad de canales de potasio (K_v). La señal eléctrica puede activar a los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) presentes en la presinápsis, los cuales son encargados de regular la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato, que hacen blanco en las neuronas postsinápticas de la medula, esta información es transmitida al tronco cerebral, posteriormente activa al tálamo y a regiones del cerebro como la corteza somatosensorial y motora, para generar una respuesta que ayude a prevenir el daño. El sistema nervioso central es el encargado de determinar la iniciación, duración, intensidad y localización del estímulo nocivo, así como la respuesta adecuada (Waxman y Zamponi, 2014; Woolf, 2004); sin embargo, la activación de los canales iónicos durante la transducción al ser el primer paso de esta vía constituye un campo de estudio fundamental para el tratamiento del dolor (Woolf, 2004).

Vía general del dolor

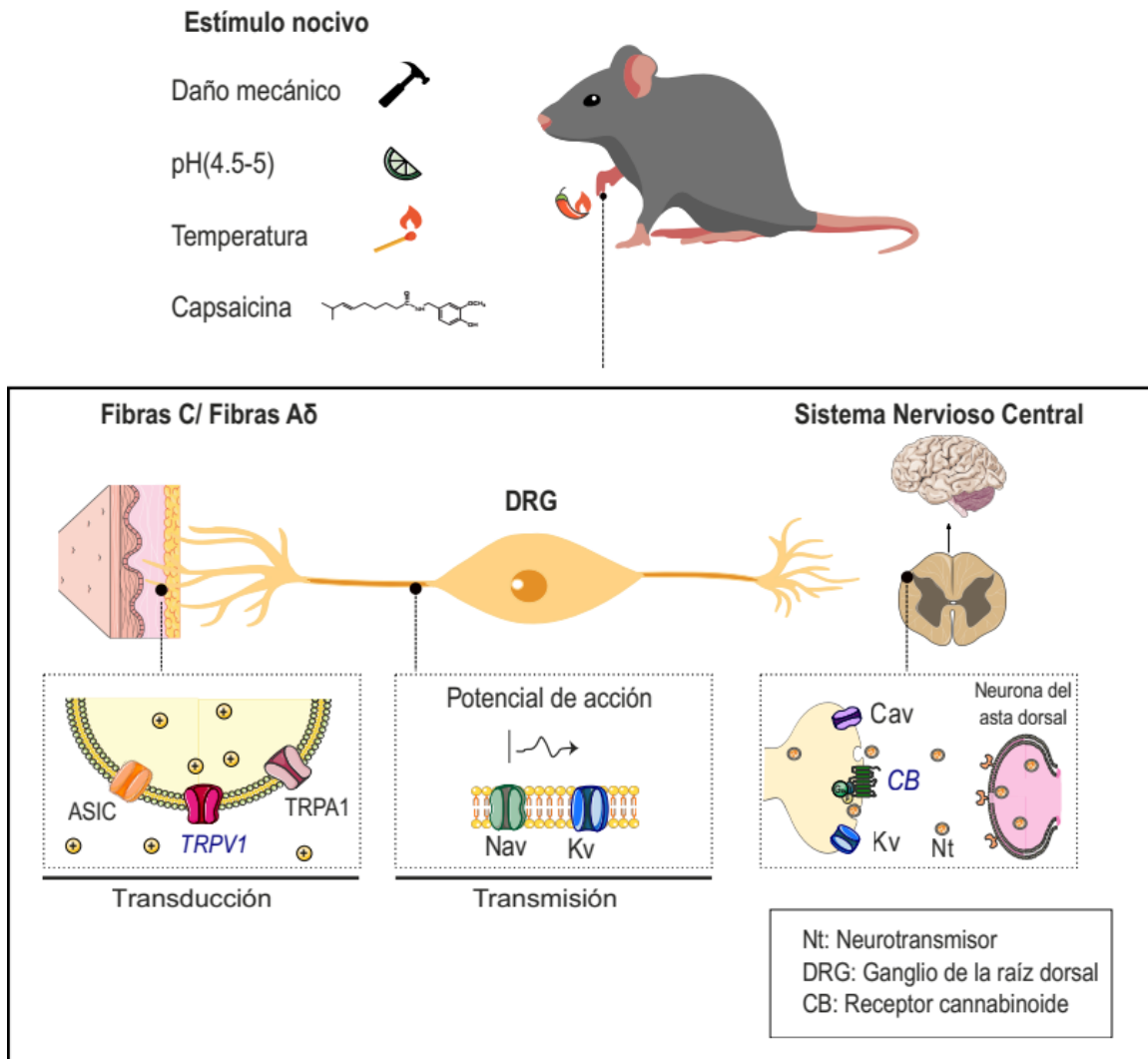


Figura 1. Vía general del dolor. TRPV1 un receptor polimodal ya que puede ser activado por diferentes tipos de estímulos físicos y químicos. Se expresa en las terminales que inervan a tejidos y órganos junto con otros canales que también participan de la nocicepción como otros miembros de la familia como TRPA1 y los ASIC. El paso de iones genera despolarización que se transmite por el axón mediante la activación de canales de Na_v y la posterior repolarización mediante los canales de K_v . Finalmente, en la presinápsis los K_v y Ca_v , así como los CB participan de la regulación de la liberación de neurotransmisores (Nt) que pueden excitar a las neuronas de la asta dorsal, lo que constituye el paso al sistema nervioso central.

Modificado de Juárez-Contreras et al., 2018

2.2. El canal TRPV1.

En el estudio de la nocicepción destaca la familia TRP por su aporte como sensores ambientales (Hill y Bautista, 2018; Julius, 2013), especialmente TRPV1, ya que ha demostrado ser importante para la respuesta de dolor ante estímulos nocivos (Caterina et al., 1997).

TRPV1 es un canal catiónico no selectivo, que se expresa abundantemente en los nociceptores de fibras con diámetro pequeño y mediano de los DRG y en los ganglios trigéminos (Caterina *et al.*, 1997; Tominaga *et al.*, 1998). Se caracteriza por su activación polimodal por estímulos nocivos como la temperatura mayor a 43°C, pH extracelular ácido (4.5-5) e intracelular básico (7.8-9.5) (Dhaka *et al.*, 2009), compuestos de producción endógena como el ácido lisofosfátidico y compuestos de plantas como la resiniferatoxina, que se extrae del látex de la planta *Euphorbia resinífera*, y la capsaicina, el compuesto pungente de los chiles (Caterina et al., 1997).

Estructuralmente, el canal TRPV1 presenta la topología típica de cualquier miembro de la familia de los TRP (figura 2), constituido por cuatro subunidades idénticas (homotetrámeros) en los que cada monómero se compone por seis pases transmembranales. El asa entre el pase 5 y 6 forma el poro, sus dominios amino y carboxilo se localizan intracelularmente, y posee una secuencia consenso de 23 a 25 aminoácidos conocida como caja TRP cerca del carboxilo terminal, conservada entre varios miembros de esta familia de canales, así como una secuencia de repetidos de anquirina cerca del amino terminal (Venkatachalam y Montell, 2007; Nilius y Flockerzi, 2014). TRPV1 cuenta con diversos sitios de unión a ligandos de efecto positivo o negativo así como diferentes aminoácidos susceptibles a ser fosforilados e inclusive algunos que pueden ser glicosilados (Morales-Lázaro et al., 2013; Ilescas, 2017).

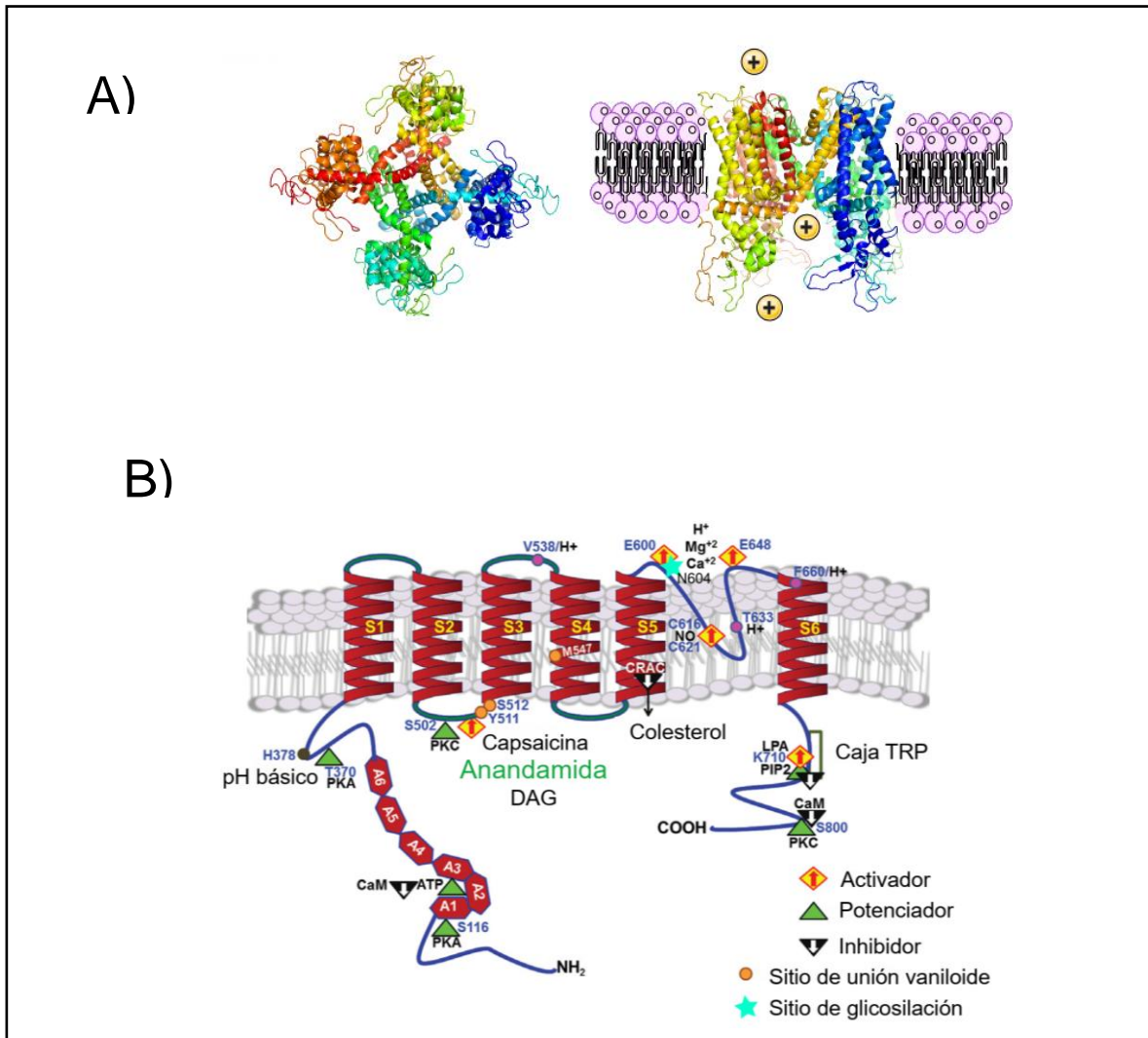


Figura 2. Características estructurales de TRPV1. Reconstrucción del homotetrámero para TRPV1. A partir de la vista superior se aprecia la región del poro, en la representación lateral se aprecia la región transmembranal, cada monómero es de color diferente. **B)** Representación de la organización de un monómero de TRPV1. Se muestran los seis pases transmembranales (S1-S6) y la región del poro formada por el asa entre S5-S6. En la parte intracelular como en otros canales TRP se conserva el carboxilo y amino terminal, los seis repetidos de anquirina (A1-A6) y la caja TRP. Se marcan diferentes sitios de unión a activadores, como el sitio de unión a capsaicina que se ha sugerido como el mismo sitio de unión para la AEA. Se muestran además diferentes sitios de modificación por fosforilación y uno para glicosilación.

PKC, por *Protein Kinase C*; PKA, por *Protein Kinase A*; CaM, por *calmoduline*; PIP2, por *Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*; LPA, por *Lysophosphatidic acid*; CRAC, por *cholesterol recognition amino acid consensus*; NO, por *Nitric oxide*; DAG, por *Diacylglycerol*.

Modificado de Morales-Lázaro et al., 2013.

El control de flujo de iones, constituye un mecanismo primordial para la sobrevivencia celular, por esta razón, la actividad de los canales iónicos es regulada específicamente por vías de señalización asociadas principalmente a la fosforilación o desfosforilación de estas proteínas.

En el TRPV1 el grado de fosforilación está estrechamente relacionado con un efecto “sensibilizador”, lo que favorece que estímulos de baja intensidad activen al canal, incluso por debajo del umbral requerido.

A la par, existe una vía para detener la transducción de señales nocivas por medio de TRPV1, denominado desensibilización, que puede ser del tipo agudo o crónico. La desensibilización aguda de TRPV1 ocurre después de la activación continua del canal en un periodo de tiempo corto, favoreciéndose que éste entre en un estado refractario, por lo que, aún en presencia de sus agonistas no pasan iones a través del poro (Holzer, 2008). Por otra parte, la desensibilización crónica ocurre por la aplicación constante de agonistas y depende de las características de la molécula, la concentración y frecuencia de exposición por ejemplo, altas concentraciones de capsaicina, llevan a la pérdida de función de los nociceptores mediante la degeneración o pérdida de fibras C aferentes, por lo que no hay respuesta ante diversos estímulos físicos y químicos (Holzer 2008; Jancsó et al., 2008). Por otra parte la capsaicina luego de inducir la entrada de calcio de forma repetida puede desencadenar la internalización rápida del canal en endosomas para posteriormente ser degradado por la vía lisosomal (Sanz-Salvador 2012), como consecuencia, la capsaicina disminuye los niveles de proteína de TRPV1 y la repercusión fisiológica es la disminución en el dolor asociado a la activación de este canal, así que esta propiedad de la capsaicina se aprovecha en parches y cremas de este compuesto para aliviar el dolor muscular y artrítico. Se estima que en 2013 hubo más de 224,000 prescripciones de capsaicina tópica como tratamiento solo en el Reino Unido (Hylands-White et al., 2017). Sin embargo, a pesar de su buena aceptación, como efecto secundario la aplicación de capsaicina genera la sensación de ardor agudo y extremo por la activación del canal (Mason et al., 2004; Groninger y Schisler, 2012).

2.3. Moduladores endógenos para la regulación del canal TRPV1.

A la fecha se han descrito algunas moléculas de producción endógena capaces de activar o inhibir directamente a TRPV1 (Morales-Lázaro et al., 2013). Aunado a esto, algunas moléculas liberadas durante la inflamación y el daño en tejidos pueden modificar la transducción de estímulos mediante TRPV1 por tres eventos principales: 1) los cambios en la fosforilación del canal, se ha reportado que si está más fosforilado puede ser activado con estímulos de menor intensidad, 2) mediante el reclutamiento de canales a la membrana plasmática, algunas moléculas pueden aumentar el tráfico del canal a la membrana plasmática y el tiempo que permanece en este sitio y 3) por modificaciones posteriores a la traducción, que pueden beneficiar la estabilidad del canal o bien su reclutamiento a la superficie (Goswami et al., 2004; Holzer 2008; Carlton y Coggeshall, 2001; Ji et al, 2002; Breese et al, 2005, Sanz-Salvador 2012).

Entre las moléculas de producción endógena que activan directamente a TRPV1, está el ácido lisofosfatídico (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). Por otra parte, otras moléculas, regulan positivamente la actividad de este canal de manera indirecta, por ejemplo, algunos neuropéptidos como el factor de crecimiento neuronal (NGF de *Nerve Growth Factor*), el cual induce la translocación de TRPV1 hacia la membrana plasmática (Xue et al., 2007), las bradicininas, leucotrienos y prostaglandinas, que a través de la unión a sus receptores específicos desencadenan vías de señalización que inciden en la sensibilización (fosforilación) del canal, así como los derivados del ácido araquidónico entre ellos la AEA (Clapper et al., 2010; Fine y Rosenfeld 2013).

2.4. La anandamida.

La AEA o araquidonoil etanolamina es un lípido endógeno que actúa como mediador de varios procesos fisiológicos como la respuesta al estrés, la sensación

de saciedad, el dolor y la inflamación. La AEA es un análogo endógeno del tetrahidrocannabinol (THC), la molécula responsable de los efectos de *Cannabis sativa*. El THC fue aislado y descrito hasta 1964 (Gaoni y Mechoulam, 1964). Posteriormente, en la década de los 90 se identificó como su principal blanco de acción al receptor cannabinoide 1 (CB1), con distribución preferentemente en el sistema nervioso central y poco tiempo después se encontró a su homólogo, el receptor cannabinoide 2 (CB2), distribuido principalmente en el sistema nervioso periférico (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). Encontrar a los receptores cannabinoide ayudó a describir el mecanismo de acción del THC e intensificó la búsqueda por la identificación de los ligandos endógenos de estos receptores (Piomelli, 2003; Howlett y Abood, 2017).

En 1992 se aisló por primera vez a la AEA a partir de extractos de cerebro de cerdo, siendo el primer endocannabinoide descrito (Devane et al, 1992), poco después se aisló a la 2-araquidonoilglicerol (2-AG), la 2- araquidonoil gliceril éter (éter noladín), la N-araquidonil-dopamina (NADA) así como otras moléculas relacionadas (Zou y Kumar, 2018). En conjunto CB1 y CB2, sus ligandos y las enzimas responsables de su síntesis y degradación fueron denominados como el sistema endocannabinoide (Rice et al., 2002; Akopian et al., 2009). Este sistema destaca por regular procesos como la liberación de norepinefrina y cortisol durante situaciones de estrés, controlar la sensación de saciedad, la reparación del tejido y participar en la respuesta a condiciones inflamatorias (Piomelli, 2003).

La AEA es un derivado del ácido araquidónico, su producción incrementa durante el dolor crónico y la inflamación (Ibsen et al., 2017). Su síntesis depende de las necesidades de la célula, puede ser estimulada por ejemplo, por la entrada de calcio durante la despolarización de la membrana, esto activa la hidrólisis de la N-acil-fosfatidiletanolamina mediante la N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD). Una vez sintetizada la AEA puede unirse a los CB, ambos están acoplados a proteínas $G_{i/o}$. Activar a CB1 desencadena a vías como la de las MAP cinasas, a la fosfatidilinositol 3 cinasa y a la fosfolipasa C (PLC). La PLC induce la producción de inositol trifosfato (IP_3), que libera calcio almacenado en las cisternas

del retículo endoplasmático, con lo que se promueve la fosforilación por cinasas dependientes de calcio, como la CaM cinasa, capaz de sensibilizar canales iónicos como TRPV1. Además de esto, la PLC produce una cantidad importante de DAG, mismo que puede inducir la fosforilación mediante PKC, lo que modula la sensibilidad de diversos canales iónicos (Turcotte et al., 2016; Ibsen et al., 2017). Por otra parte, los efectos de la activación de CB2 son menos conocidos que los de CB1, pero se sabe que posee efectos antiinflamatorios importantes como la disminución de la liberación de citosinas y moléculas proinflamatorias (Turcotte et al., 2016). Además, de que CB2 inhibe a la adenilil ciclasa (AC) y esto impacta negativamente en la producción del AMP cíclico (cAMP), en consecuencia, se inhibe la fosforilación por PKA (Turcotte et al., 2016; Ibsen et al., 2017).

La AEA es estructuralmente parecida a la capsaicina, esto llevó a evaluar su capacidad como agonista de TRPV1 por lo que fue el primer endocannabinoide descrito con esta característica (Zygmunt et al., 1999; Van Der y Di Marzo, 2004). De acuerdo a algunos autores la AEA se comporta como un agonista semejante a la capsaicina, es capaz de activar al canal, aunque requiere de concentraciones mucho mayores (Smart et al., 2000). Ensayos en los que se utilizó capsazepina, un antagonista que se une al mismo sitio que la capsaicina en el denominado pocket vaniloide, bloqueó las corrientes inducidas por AEA, lo que indica que podrían unirse al mismo sitio (Zygmunt et al., 1999; Smart et al., 2000). Además de su interacción directa con el canal, la AEA es susceptible a ser degradada rápidamente por hidrólisis o por oxidación y los productos resultantes también son capaces de actuar como activadores de TRPV1 (Ross, 2003).

Previamente se han evaluado los efectos de los agonistas exógenos de TRPV1 como la capsaicina y la resiniferatoxina, estas moléculas activan al canal induciendo el flujo de calcio. Se ha sugerido que el calcio entrante activa a fosfatasa que actúan sobre TRPV1, dado que al probar el efecto en un canal mutado (S116D), el canal adquiere mayor estabilidad en la membrana plasmática. Luego de la desfosforilación del canal, este es internalizado en endosomas y posteriormente es degradado por la vía lisosomal, con lo que disminuyen el número de canales

disponibles en la membrana plasmática. Este efecto es dependiente de la concentración y el tiempo por lo que a largo plazo genera desensibilización (Sanz-Salvador et al., 2012). Por otra parte, se desconoce el detalle de los efectos que pudieran tener los agonistas endógenos en los niveles proteicos de TRPV1, dado que la AEA y la capsaicina comparten similitudes como agonistas, es posible que su efecto sea similar también. El potencial de la AEA como una herramienta antiinflamatoria ya ha sido previamente estudiado sin embargo, actualmente no existen reportes que relacionen la analgesia de la AEA con el nivel proteico del canal TRPV1, a pesar del potencial terapéutico que esto representa, ya que plantea la posibilidad de contar con una herramienta farmacológica que posee un efecto analgésico similar al de la capsaicina, pero sin inducir dolor. Por lo que el presente trabajo buscó estudiar el efecto de la AEA en los niveles proteicos de TRPV1.

3. Hipótesis.

La anandamida regula la cantidad de canales TRPV1 promoviendo la degradación proteínica del canal.

4. Objetivos.

4.1. General.

Determinar si la anandamida promueve la degradación de TRPV1.

4.2. Particulares.

- Determinar si la anandamida afecta los niveles proteicos del canal TRPV1 (proteína total y de membrana).
- Evaluar si el posible efecto de la anandamida depende del estado de fosforilación del canal.
- Evaluar la importancia del calcio extracelular en los efectos de la anandamida.
- Determinar si el canal TRPV1 es degradado por la vía del lisosoma por efecto de la AEA.
- Evaluar el efecto fisiológico de la administración de anandamida en presencia de un agonista de TRPV1.

5. Materiales y métodos.

5.1. Cultivos celulares.

a) Células HEK293.

Se usaron cultivos celulares de la línea HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, ATCC) mantenidos en medio de cultivo DMEM con alta glucosa (*Dulbecco's Modified Eagle*) suplementado con suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, *HyClone*) al 10 %, y con solución de estreptomicina 10,000 µg/ml y penicilina 10,000 u/ml (en adelante referido solamente como D10), la temperatura de incubación fue de 37°C, bajo atmosfera húmeda y 5 % de CO₂. Los pasajes celulares se realizaron mediante la adición de solución de tripsina EDTA al 0.05 % (Invitrogen) para disociar la monocapa de células, la reacción enzimática se inhibió al agregar el mismo volumen de D10. La suspensión se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, finalmente se homogenizó el botón celular en 1 ml de medio D10 y se realizaron diluciones para obtener cultivos a una confluencia celular del 50 % en cajas de 35 o 100 mm, para proceder a la realización de ensayos de transfección celular.

b) Cultivo primario de neuronas.

Se prepararon cultivos primarios de neuronas de DRG de ratones macho de la cepa C57BL6/J con edad de 8 a 10 semanas. Los animales se procesaron de acuerdo con lo descrito previamente (Malin *et al*, 2007), el tejido obtenido de la extracción fue digerido por 30 min a 37°C en medio sin suero fetal bovino (SFB), el medio fue suplementado con tripsina (1.25 mg/ml) y colagenasa (2 mg/ml). Se homogenizó en medio D10 y se sembró para mantener las neuronas en incubación en condiciones de crecimiento normales, luego de 24 horas se dieron los tratamientos respectivos.

5.2. Transfección.

En los cultivos de células HEK293 se realizó la transfección para la expresión transitoria del canal TRPV1 de rata (TRPV1r). Para ello, se utilizaron plásmidos para la expresión de proteínas en eucariontes (pcDNA3.1 rTRPV1) que contiene la secuencia codificante del canal TRPV1 de origen de rata y cuya expresión es regulada por el promotor de citomegalovirus (CMV). Se transfectó también con el plásmido de la mutante con el canal TRPV1 modificado en la secuencia codificante para el residuo serina 116, en el cual está cambiado el triplete que codifica para alanina o ácido aspártico (pcDNA3.1rTRPV1-S116A/D). Como agente de transfección se utilizó un polímero comercial de etilenimina (jetPEI) y las condiciones para la transfección se realizaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor, utilizando 150/1500 ng del vector pcDNA3.1-TRPV1r y 3/5 µl del agente jetPEI para la transfección de cultivos celulares contenidos en cajas de 35 mm/100 mm respectivamente. Luego de 16 h pos-transfección, se realizó cambio de medio de cultivo y 24 h posteriores a esto las células fueron utilizadas para dar los tratamientos correspondientes.

5.3. Tratamientos en los cultivos celulares.

Los tratamientos en los cultivos celulares se realizaron en condiciones normales de incubación, es decir a 37°C y 5 % de CO₂. Al finalizar los tratamientos en todos los casos se obtuvo la proteína total o se procedió al marcaje de proteínas de membrana plasmática, para su evaluación por western blot (WB).

a) Tratamientos con capsaicina.

Para reproducir un control positivo previamente reportado, con un agonista capaz de disminuir el nivel proteico de TRPV1 (Sanz-Salvador et al., 2012), bajo

nuestras condiciones y estandarizar las condiciones para los siguientes experimentos, se utilizaron cultivos de células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1r a los cuales se les dieron tratamientos con 1, 5 y 10 μM de capsaicina y/o sus controles respectivos (etanol al 0.01, 0.05 y 0.1 %), en medio DMEM sin SFB (en adelante referido solo como DMEM). Las diferentes concentraciones y sus controles se incubaron durante 20 min en condiciones normales.

b) Tratamientos con AEA.

Para determinar si la AEA modifica los niveles proteicos del canal TRPV1, se utilizaron cultivos de células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1r silvestre, o los canales mutantes S116A o el S116D. Se aplicaron concentraciones de 10, 25 y 50 μM de AEA o sus controles (etanol al 0.1, 0.25 o 0.5 %) en medio DMEM. Las diferentes concentraciones y sus controles se incubaron durante 20 min en condiciones normales. Para posteriores ensayos se utilizaron las concentraciones de 10 o 25 μM de AEA por no existir diferencia significativa entre sus efectos.

Para evaluar la importancia del tiempo de incubación con AEA en el efecto en los niveles proteicos de TRPV1 se utilizaron cultivos de células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1r. Se aplicó 10 μM de AEA en medio DMEM y se incubó en condiciones normales durante 20, 60 y 90 min.

c) Respuesta a AEA en cultivos primarios.

Para evaluar el efecto de la incubación con AEA en el sistema de expresión nativo, en los cultivos primarios se aplicó 10 μM de AEA en medio DMEM. El tratamiento y su control (etanol al 0.1 %) se incubaron durante 20 min en condiciones normales.

d) *Ensayos con EGTA como agente quelante.*

Para evaluar la importancia del calcio extracelular para el efecto de la AEA, se utilizaron células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1r y se incubaron durante 15 min a 37°C en medio DMEM adicionado con AEA (25 µM) o con AEA y EGTA (5 mM), que de acuerdo a la literatura es una concentración suficiente para remover el calcio del medio (Leffler et al., 2008; Scherer et al., 2017).

e) *Pretratamiento con cloroquina como inhibidor de la degradación lisosomal.*

Para determinar si la degradación del canal TRPV1 ocurre por la vía lisosomal, en células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1r se aplicó el tratamiento con 100 µM de cloroquina (CLQ) en D10 durante 4 horas, para detener la actividad de los lisosomas al desactivar sus enzimas proteolíticas. Posteriormente se sustituyó por un tratamiento con 100 µM de CLQ adicionado con 25 µM de AEA o su respectivo control (etanol al 0.25 %) en medio DMEM que se incubó por 20 min más a 37°C.

5.4. Extracción de proteína total.

Los cultivos y tejidos, se colocaron en hielo y se lavaron con PBS frío para eliminar restos y medio de cultivo. Se adicionó buffer de lisis (TrisCl pH 8.0, 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón 1 %, NaF 2.5 mM, inhibidor de proteasas cOmplete, Roche) y se homogenizó mecánicamente, el lisado resultante se centrifugó a 13,200 rpm durante 3 min y se recuperó el sobrenadante. La proteína obtenida fue cuantificada por el método del ácido bicinónico tomando como referencia una curva de proteína de albúmina de suero bovino. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm y mediante regresión lineal se obtuvo la concentración de proteína total de las muestras para su posterior separación electroforética de las proteínas y análisis por WB.

5.5. Marcaje de proteína de membrana.

Para determinar si la AEA modifica la cantidad del canal TRPV1 de membrana se realizaron ensayos de marcaje y precipitación de proteínas de membrana plasmática. Para estos ensayos se procedió a trabajar con cultivos realizados en cajas de 100 mm de células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1r. Las células fueron tratadas con 10 μ M de AEA en medio DMEM durante 20 min. Posteriormente se realizó el marcaje de proteínas de superficie celular mediante el uso del kit Pierce™ Cell Surface Protein Isolation (Thermo Scientific™). El kit contiene sulfo-NHSSS-biotina que se une a las lisinas extracelulares sin tener la capacidad para atravesar la membrana plasmática, por lo tanto, el marcaje se restringe a las proteínas de superficie celular. El marcaje de las proteínas de superficie y su purificación se realizaron de acuerdo con las especificaciones del proveedor mediante perlas de avidina. Finalmente se obtuvo la proteína de membrana para el análisis por western blot.

5.6. Western blot.

Se realizaron geles de poliacrilamida al 10 % para la realización de la electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). Para ello se cargaron cantidades iguales de proteína de cada muestra (15 μ g) diluidas en buffer Laemmli. Las muestras fueron separadas aplicando una corriente constante de 20 mA por cada gel durante 2 h. Se realizó la transferencia de las proteínas separadas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), mediante el uso de un sistema de transferencia semi-seco. Para la inmunodetección de cada una de las proteínas de interés, se procedió a bloquear las membranas con una solución de buffer fosfato salino (PBS) adicionado con Tween 0.1 % (PBST) en la que se disolvió leche al 6 %. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con los

siguientes anticuerpos primarios: TRPV1 policlonal de conejo (Alomone ACC-030), diluido 1:1000 en leche 3 % en PBST o anticuerpo para la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) policlonal de conejo (Cell Signaling #14C10) diluido 1:5000 en PBST. Posterior a la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas con PBS-T e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermo Scientific, #31460), diluido 1:7500 en leche 3 % en PBST. Finalmente, la señal para cada proteína fue obtenida con la exposición de la membrana a la reacción quimioluminiscente (Reactivo Immobilon-Western) y la captación de la señal en placa radiográfica. Cada placa fue digitalizada para el análisis de las densitometrías con el programa ImageJ, con este se calculó el valor del área de bajo de cada una de las bandas de interés y de esa forma se obtuvieron los valores normalizados para la señal de TRPV1 con respecto a una proteína de expresión constitutiva utilizada como control de carga (GAPDH).

5.7. Preparación de stocks de compuestos.

Se utilizaron las siguientes soluciones para realizar los tratamientos correspondientes:

- La capsaicina y la AEA (ambos de Sigma-Aldrich) se disolvieron en etanol para obtener un stock a una concentración de 10 mM.
- La cloroquina (Sigma) se disolvió en agua mili Q para obtener un stock a una concentración de 10 mM.
- El EGTA (Sigma) se disolvió en agua mili Q para lo cual se ajustó el pH a 8 con NaOH 1N para obtener un stock a una concentración de 250 mM.

5.8. Ensayos de conducta de dolor agudo.

Los protocolos de trabajo en los que se utilizaron animales durante este proyecto fueron evaluados y aprobados por el CICUAL IFC, por considerar que cumplen con los principios éticos para el manejo experimental de modelos animales, clave de registro **SML127-18**.

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL6/J con edad de 8 a 10 semanas, se mantuvieron en fotoperiodo 12:12 (h luz: oscuridad) y se les aclimató en un cuarto con contaminación auditiva atenuada al menos por 1 h previa a cada ensayo. Se administró en el cojinete de la pata delantera cada una de las soluciones a probar, vehículo (0.05 % de etanol), capsaicina (1 µg), AEA (50 ng) y la combinación de capsaicina y AEA (1 µg y 50 ng respectivamente), en todos los casos los compuestos diluidos en etanol y con la cantidad suficiente de solución salina (0.9 % de NaCl) para un volumen de 10 µl. Se registró durante 10 min el tiempo de lamido del área afectada como respuesta típicamente asociada a dolor (Hunskaar y Hole, 1987) en este caso mediado por TRPV1.

5.9. Análisis de resultados.

Todos los resultados digitalizados de los ensayos de WB fueron analizados mediante el programa ImageJ. La normalización se realizó en Excel y el análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism.

Para todos los grupos se obtuvo la estadística descriptiva (media, desviación estándar y error estándar). Las medias de los controles y tratamientos se compararon mediante una prueba de *t-student* para comparaciones entre dos grupos y ANOVA con prueba post-hoc de Tuckey, para comparación entre más de tres grupos.

6. Resultados.

6.1. La capsaicina modifica los niveles proteicos del canal TRPV1.

Previamente se reportó que los agonistas exógenos de TRPV1 como la capsaicina y la resiniferatoxina son capaces de inducir el flujo de calcio y en consecuencia la internalización y degradación del canal mediante la vía del lisosoma (Sanz-Salvador et al., 2012). Efecto también observado en este trabajo, ya que los niveles proteínicos totales de TRPV1 tienden a disminuir en todos los cultivos tratados con capsaicina en comparación de los cultivos control. Cabe mencionar que la señal obtenida por WB da un bandeo con tres señales previamente identificadas como correspondientes al canal TRPV1, con diferentes grados de glicosilación, una banda retardada que corresponde al canal hiperglicosilado y dos bandas cercanas de las cuales la más pesada es de canal parcialmente glicosilado y la más ligera del canal no glicosilado (Veldhuis, et al., 2012), al ser estas bandas específicas para TRPV1 se consideró la señal total para la cuantificación (figura 3A).

La reducción en la cantidad de proteína en las concentraciones más altas, 5 y 10 μM es de $40.4 \pm 1 \%$ y $31.5 \pm 5 \%$ respectivamente, en comparación con el control (figura 3B). Este resultado, concuerda con lo previamente reportado (Sanz-Salvador et al., 2012) y se utilizó como control positivo, que muestra como un agonista exógeno de TRPV1 (capsaicina) disminuye los niveles proteínicos del canal y nos da la pauta para poder preguntar si este efecto también se observa con un agonista de origen endógeno.

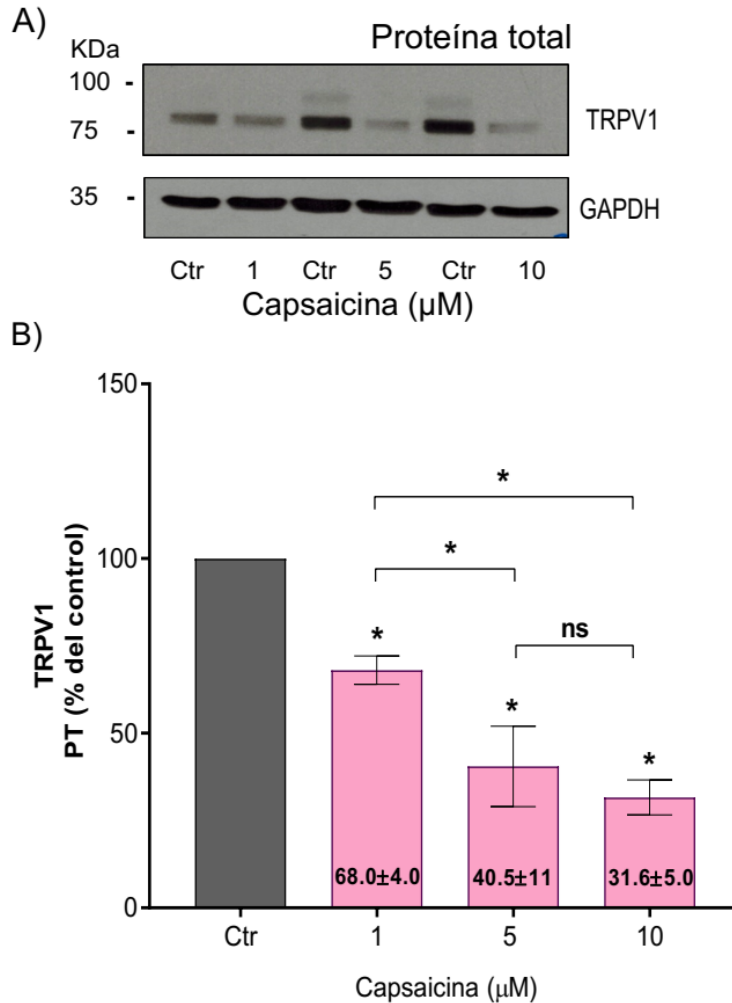


Figura 3. El tratamiento con capsaicina disminuye los niveles proteicos del canal TRPV1. A) WB representativo de la detección de TRPV1 (panel superior) y GAPDH (control de carga, panel inferior), en adelante referido solo como TRPV1 y GAPDH. La imagen muestra la disminución en la señal para TRPV1 en las muestras de cultivos tratados con capsaicina en comparación con la incubación con el control (Ctr). **B)** Normalización (%) de los tratamientos con capsaicina en comparación con sus controles, los cuales en todos los ensayos de WB presentados fueron establecidos como el 100 % (en adelante referido solo como control), a mayor concentración de capsaicina se observa mayor disminución de TRPV1. La n es de 3 y prueba ANOVA con post-hoc de Tuckey con $*p < 0.05$.

6.2. Efectos de la AEA en los niveles de proteína del canal TRPV1.

La AEA está descrita como un endocannabinoide capaz de activar a los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (Smith et al, 1994). Además, se considera un agonista parcial del canal TRPV1, ya que se requiere de una concentración mayor en comparación con la necesaria de capsaicina, o bien de condiciones que disminuyan el umbral de activación del canal (Zygmunt et al., 1999). El análisis por WB mostró que los extractos proteicos totales provenientes de las células tratadas con AEA disminuyeron significativamente los niveles de la proteína total de TRPV1, de manera independiente a las concentraciones de AEA aplicadas, con respecto a los controles considerados como 100 % (figura 4).

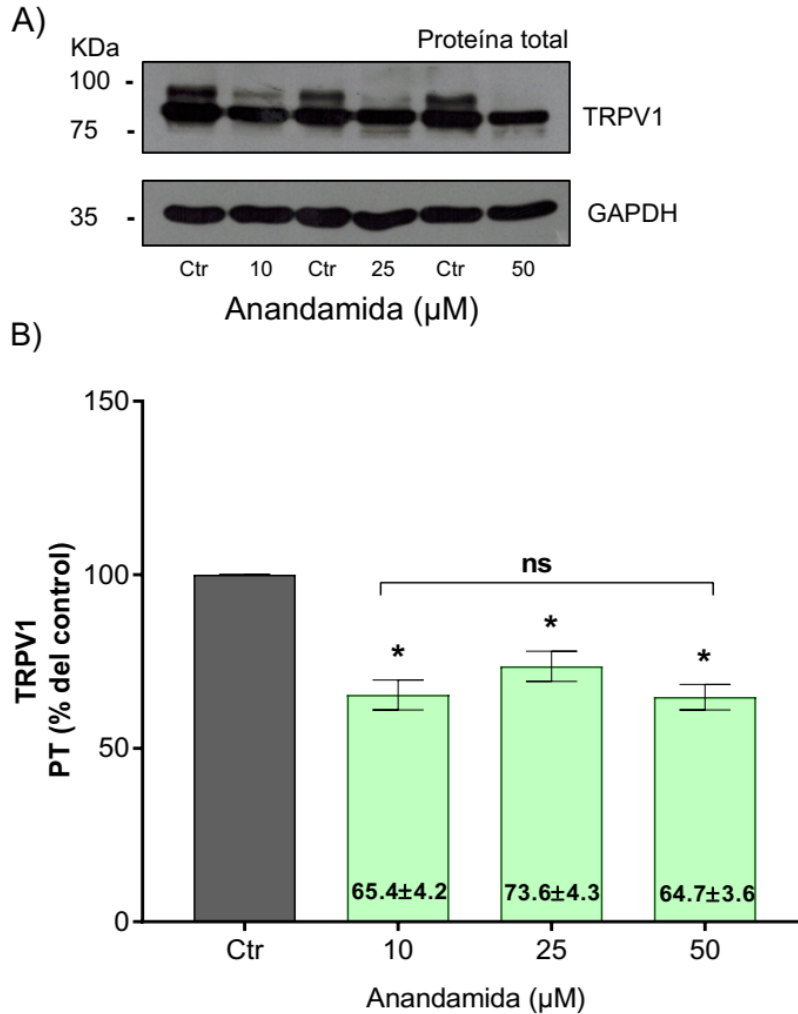


Figura 4. Células tratadas con AEA, muestran disminución en los niveles proteicos totales del canal TRPV1. A) WB representativo de la detección de TRPV1 y GAPDH. La imagen muestra la disminución en la señal para el canal TRPV1 en las muestras de cultivos tratados con AEA en comparación con la incubación con el control (Ctr). **B)** Normalización (%) de los tratamientos con AEA en comparación con su control, se encontró que todas las concentraciones de AEA aplicadas disminuyen la proteína TRPV1 en la misma proporción. La n es de 5 y prueba ANOVA con post-hoc de Tuckey con $*p < 0.05$. *Ns, no significativo.*

Debido a que esta reportado que la exposición a capsaicina disminuye la proteína TRPV1 (Sanz-Salvador et al., 2012), en este trabajo nos preguntamos si también se mantiene en los efectos de la AEA. Para ello, las células fueron tratadas con la concentración mínima de AEA en la que se detecta efecto (10 μM) durante 20, 60 y 90 min. El análisis por WB de la proteína total TRPV1 muestra que el efecto

de la AEA en la disminución de los niveles proteicos de TRPV1 no es diferente, de forma significativa, en los tiempos evaluados (figura 5).

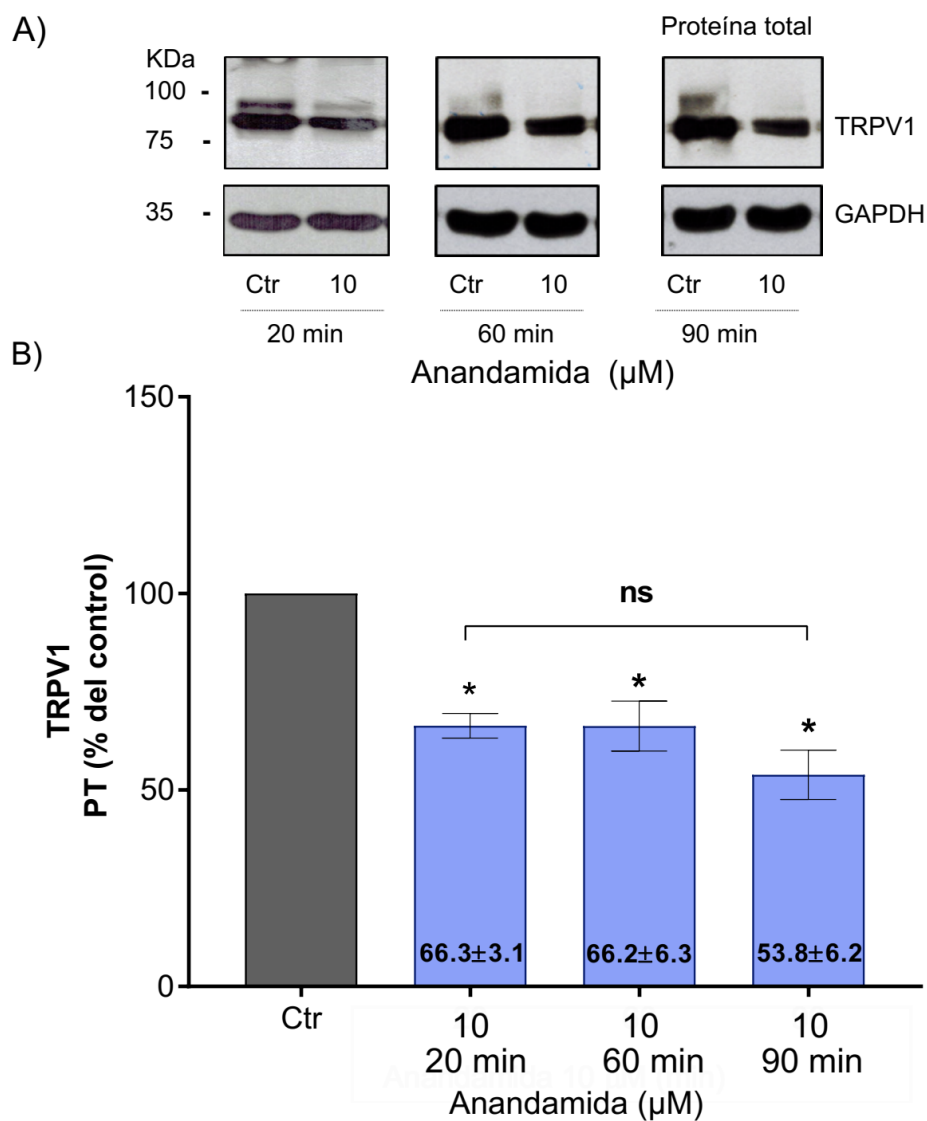


Figura 5. La AEA disminuye los niveles de proteína total TRPV1 de manera independiente del tiempo. A) WB representativo de la detección de TRPV1 y GAPDH. La imagen muestra la disminución en la señal para TRPV1 en las muestras de cultivos tratados con AEA durante 20, 60 y 90 min en comparación con su control (Ctr). **B)** Normalización (%) de los tratamientos con AEA en comparación con su control, se encontró disminución independiente del tiempo probado de incubación, ya que en todos los casos el canal disminuye en la misma proporción. La n es de 5 y prueba ANOVA con post-hoc de Tuckey con * $p < 0.05$.

6.3. La cantidad de canales TRPV1 en membrana plasmática disminuye por efecto del tratamiento con AEA

Una forma de regular al canal TRPV1, es a partir de la reducción de la cantidad de canales localizados en la membrana plasmática (Sanz-Salvador et al., 2012). Se determinó que los niveles de proteína de membrana de TRPV1 muestran una reducción del 40 % en las células tratadas con AEA, por lo que el porcentaje residual de proteína TRPV1 en membrana resultó de 57.7 ± 16 % respecto al control, considerado como el 100 % (figura 6).

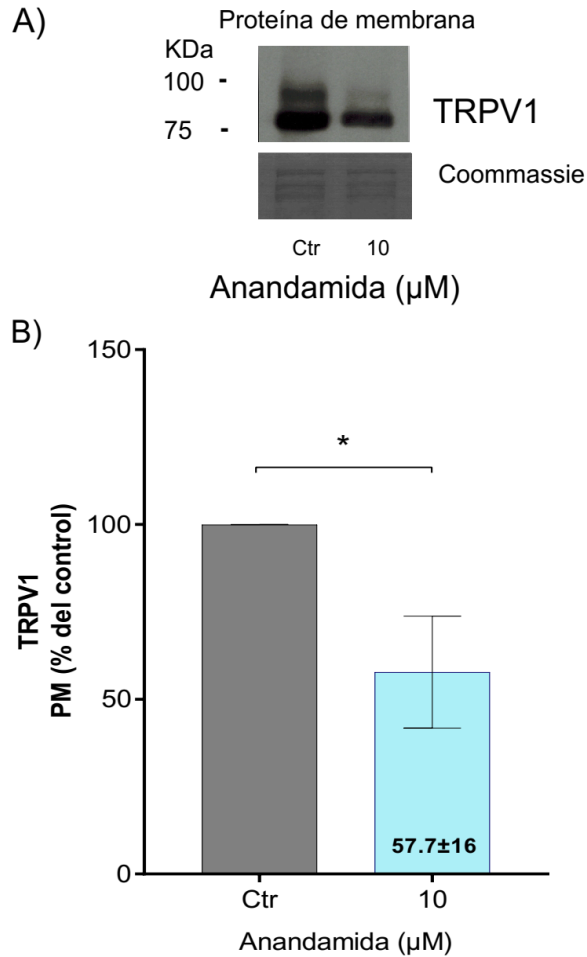


Figura 6. El tratamiento con AEA disminuye el nivel de proteína TRPV1 localizado en membrana plasmática. A) WB representativo de la detección de TRPV1 y tinción de coomassie (control de carga, panel inferior). Se muestra la disminución de la señal para TRPV1 de membrana en el cultivo tratado con AEA en comparación con la incubación con el control (Ctr). **B)** Normalización (%) del tratamiento con AEA en comparación con su control, se encontró disminución de TRPV1 de membrana plasmática estadísticamente significativa en el tratamiento con AEA. La n es de 3 y prueba de *t-student* con $*p < 0.05$.

6.4. AEA modifica los niveles de proteína total TRPV1 de manera independiente a serina 116.

Dentro de los mecanismos importantes para la regulación de la actividad del canal se encuentran eventos de fosforilación en residuos específicos del canal, entre los que destaca la serina 116 (S116). Esta modificación beneficia la activación del canal (sensibilización), ya que favorece su estabilidad en la membrana

plasmática (Liu et al., 2015). La fosforilación en S116 por efecto de PKA, evita la internalización y degradación del canal a pesar de la exposición prolongada a capsaicina (Sanz-Salvador et al., 2012). Es importante tener en cuenta que la AEA podría estar modificando el estado de fosforilación de TRPV1 por medio de la activación de los receptores tipo cannabinoides (CB) que activan río abajo cascadas de señalización (Turcotte et al., 2016; Ibsen et al., 2017). Para evaluar esta posibilidad, se trabajó con células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1-S116A, en el cual la serina 116 está sustituida por alanina (A). Esta sustitución evita que el canal TRPV1 sea fosforilado en esa posición (116). Posterior al tratamiento con AEA (10 μ M) durante 20 min a la par que su respectivo control (etanol al 0.1 %), se lisaron las células para la obtención de las proteínas totales y por WB se compararon los niveles de la proteína TRPV1. Como se puede observar en la figura 7, el tratamiento con AEA tanto en los cultivos con expresión del canal silvestre (WT) como para la proteína TRPV1-S116A, disminuyó en la misma proporción respecto al control (100 %) indicando que la modificación de la serina por alanina no repercute en el efecto de la AEA sobre el canal TRPV1 (figura 7).

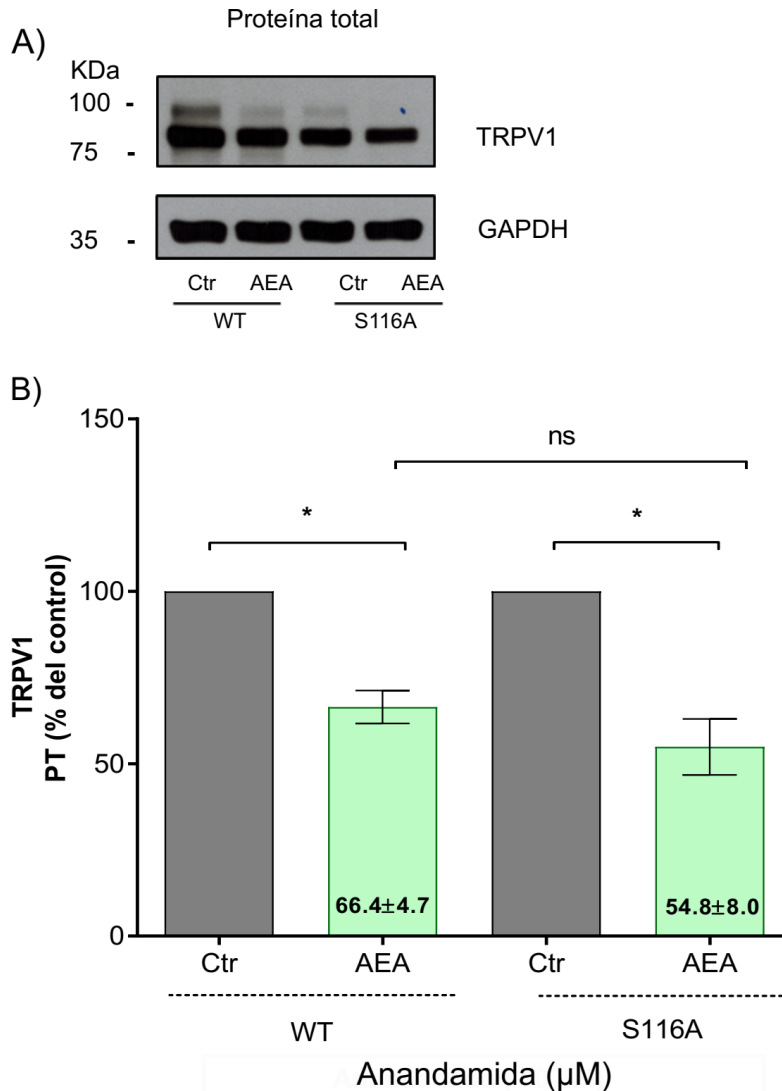


Figura 7. La mutación que evita la fosforilación en S116 no cambia la disminución de TRPV1 por efecto de AEA. A) WB representativo de la detección de TRPV1 y GAPDH. La imagen muestra la disminución en la señal para el canal TRPV1 silvestre (WT) y mutado en serina 116 (S116A), en los cultivos tratados con AEA, en comparación con sus respectivos controles (Ctr). **B)** Normalización (%) de los tratamientos con AEA en comparación con su control, no se encontró diferencia significativa entre el efecto en el canal WT y el mutante. La n es de 3 y prueba de *t-student*, ns: no significativa, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

Debido a que el cambio en la mutante S116A evita la fosforilación del canal en este residuo, se buscó evaluar el efecto de la fosforilación, con la mutante S116D, en la que el ácido aspártico asemeja a una fosforilación. Por ello las células fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el canal silvestre (WT) o con el mutado en S116D, los cultivos se trataron con 25 μM de AEA durante 20 min.

Debido a que en los resultados obtenidos hasta ahora no se encontró diferencia significativa entre el efecto de 10 y 25 μM (figura 4), se usaron ambas concentraciones seleccionando los tratamientos con 25 μM por resultar más sencilla su preparación.

El análisis por WB muestra que tanto en el canal WT como en el canal mutado, TRPV1-S116D, la AEA promueve una disminución de los niveles proteicos totales de TRPV1 en comparación de su respectivo control (100 %), las disminuciones observadas entre los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (figura 8).

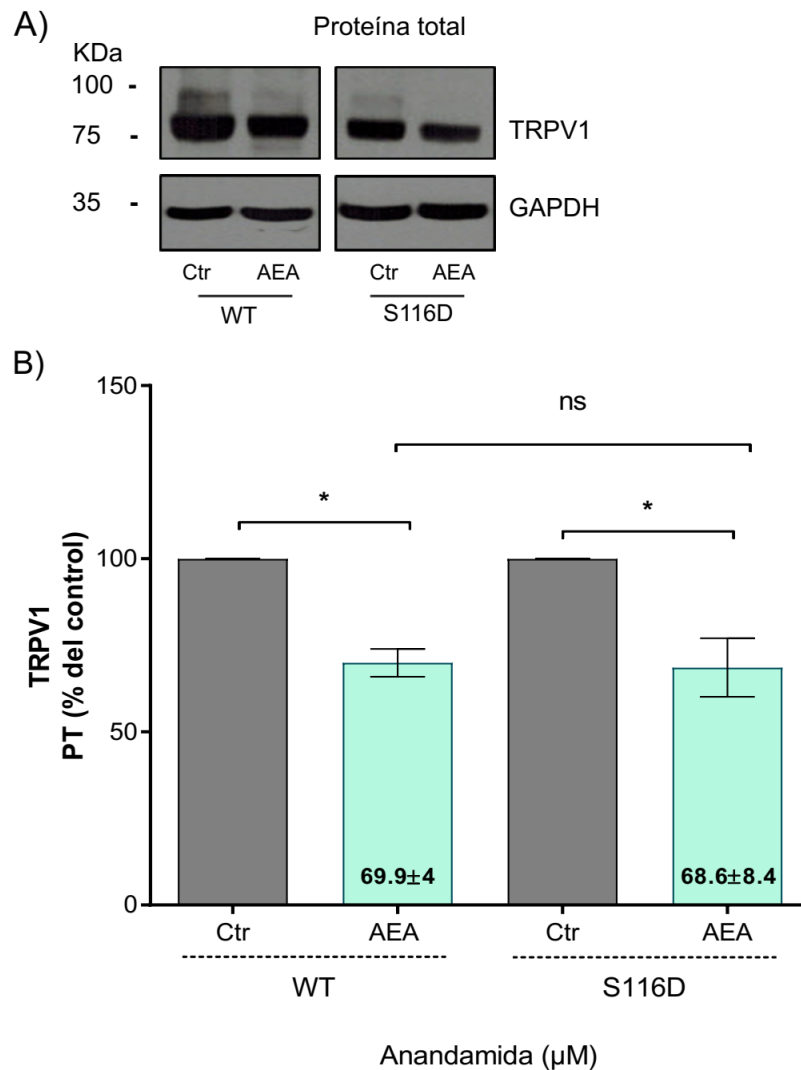


Figura 8. La fosforilación en serina 116 del canal TRPV11 no detiene la disminución de TRPV1 por efecto de la AEA. A) WB representativo de la detección de TRPV1 y GAPDH. La imagen muestra la disminución en la señal para el canal TRPV1 WT y modificado en serina 116 (S116D), en los cultivos tratados con AEA, en comparación con sus controles (Ctrl). **B)** Normalización (%) de los tratamientos con AEA en comparación con su control, no se encontró diferencia entre la disminución del canal WT y el mutado por lo que una carga negativa que proporciona el ambiente que daría una fosforilación en este sitio no influye en el efecto de la AEA sobre TRPV1. La n es de 3 y prueba de *t-student*, ns: no significativa, * $p < 0.005$.

6.5. Participación del calcio extracelular en los efectos de la AEA sobre los niveles de la proteína total de TRPV1.

La activación de TRPV1 permite el flujo de iones hacia el interior celular, lo que es fundamental para la desensibilización inducida por la capsaicina sobre los niveles proteicos de TRPV1 (Sanz-Salvador et al., 2012; Fenwick, et al., 2017). Por esta razón en este trabajo fue importante determinar si los efectos de AEA sobre la proteína TRPV1 también requieren del calcio extracelular, para lo que se trabajó con cultivos tratados durante 15 min con AEA, en medido de cultivo adicionado con EGTA (25 μ M y 5 mM, respectivamente), estas condiciones se determinaron como las adecuadas para eliminar el calcio presente en el medio de cultivo y al mismo tiempo se redujo el tiempo de incubación para evitar daño en las células por el uso de EGTA. Por otra parte, el grupo referencia consistió en células tratadas con AEA en ausencia de EGTA y un grupo control (células tratadas con etanol al 0.25 %). Finalmente se obtuvo la proteína total para su análisis por WB, y al comparar con los niveles de proteínas totales entre cada grupo se observó la disminución de la proteína TRPV1 por efecto del tratamiento con AEA (64.69 ± 7 %) con respecto al control (100 %), sin embargo, en los cultivos tratados AEA con EGTA, el efecto de la AEA fue completamente eliminado (95.4 ± 16.1 %) (Figura 9).

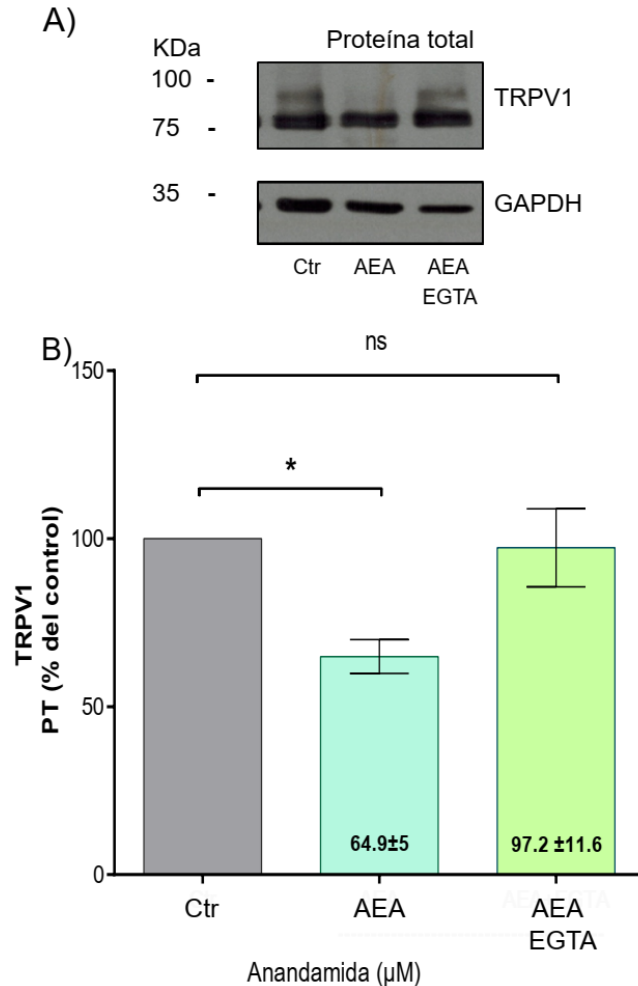


Figura 9. El secuestro de calcio extracelular detiene la disminución de TRPV1 por efecto de AEA. A) WB representativo de la detección de TRPV1 y GAPDH. La imagen muestra la disminución en la señal para TRPV1 tratado con AEA, en comparación con su control, contrario a lo que se observa que en presencia de EGTA donde no disminuye la señal del canal. **B)** Normalización (%) de los tratamientos con AEA en presencia y ausencia de calcio, en este último se detiene la disminución del canal. La n es de 3 y prueba de *t-student* con $*p < 0.05$. EGTA, ácido etilenglicol tetraacético.

6.6. Determinación de la participación de la vía del lisosoma en la disminución de los niveles proteicos de TRPV1 por efecto de AEA.

Una de las principales vías de degradación de las proteínas es la vía lisosomal, y esta reportado que el canal TRPV1 luego de ser activado por sus agonistas exógenos es internalizado y posteriormente degradado por esta vía (Sanz-Salvador et al., 2012). Para determinar si la disminución en la expresión de TRPV1 es

mediada por esta vía, se utilizaron células HEK293 con expresión transitoria del canal TRPV1, las cuales fueron incubadas con un inhibidor de los lisosomas el cual aumenta el pH inactivando las enzimas proteolíticas, lo que detiene la degradación por el lisosoma. De acuerdo a los resultados obtenidos la disminución de los niveles de proteína total de TRPV1 por efecto de la AEA es parcialmente revertida en células tratadas con cloroquina en comparación con el grupo control (100 %) (Figura 10) lo que indica que el lisosoma participa de los efectos de la AEA.

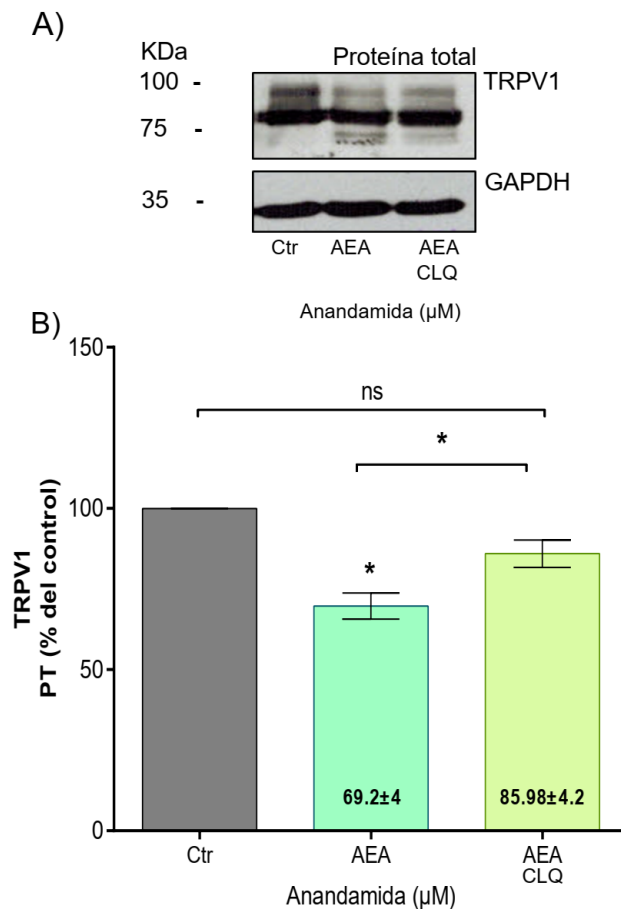


Figura 10. La AEA ocasiona disminución de la proteína TRPV1 por medio de la vía lisosomal. A) WB representativo de la detección de TRPV1 y GAPDH. Se muestra la disminución de la señal para TRPV1 en presencia de AEA en comparación con la incubación con el control (Ct), de forma interesante las células pretratadas con cloroquina no muestran disminución de la señal para TRPV1. **B)** Normalización (%) del tratamiento de AEA y AEA + CL, en comparación con el control. Se encontró que el tratamiento previo con CLQ evita la mayor parte de la degradación provocada por el tratamiento con AEA. La n es de 3 y prueba de *t-student* con * $p < 0.05$. CLQ, cloroquina.

6.7. El efecto negativo de la AEA en los niveles proteicos de TRPV1 se conserva en neuronas DRG.

De forma natural el canal TRPV1 se expresa abundantemente en las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, especialmente en los lumbares (Nilius y Flockerzi, 2014). Para evaluar si los niveles de proteína total de TRPV1 en neuronas DRG también son regulados por la AEA, se dieron tratamientos en neuronas de DRG y se encontró que en los cultivos tratados con AEA se produjo una disminución de la proteína TRPV1 con respecto al control (figura 11).

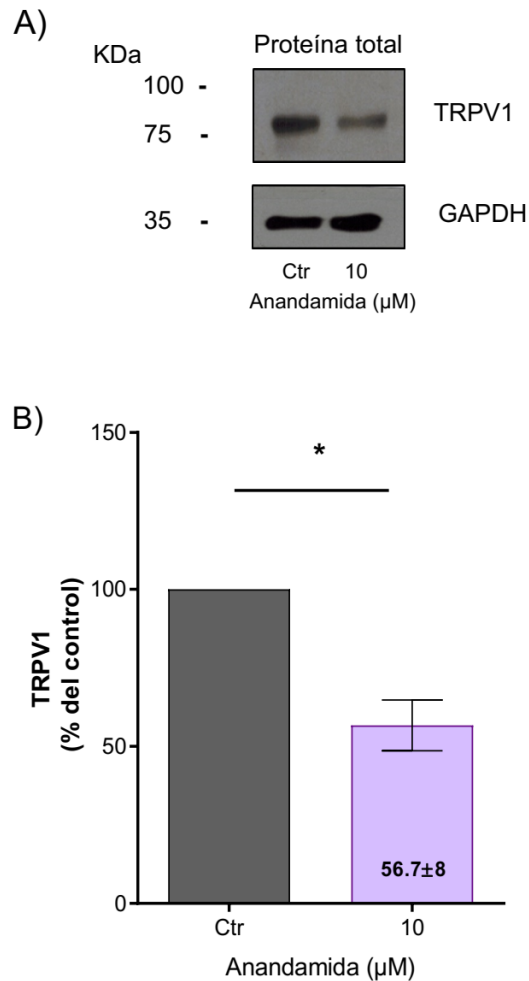


Figura 11. Disminución de la proteína total TRPV1 por efecto de la AEA en cultivos primarios de neuronas DRG. A) WB representativo de la detección de TRPV1 y GAPDH. Se muestra la disminución en la señal para TRPV1 en presencia de AEA en comparación con la incubación con el control (Ctr). **B)** Normalización (%) del tratamiento de AEA en comparación con el control, establecido como el 100 % de TRPV1 presente en los cultivos primarios de neuronas. La n es de 3 y prueba de *t-student* con * $p < 0.05$.

6.8. La AEA disminuye el dolor asociado a la activación del canal TRPV1.

Probablemente la consecuencia fisiológica más importante de la activación de TRPV1 es la sensación de dolor o ardor, por lo que para determinar si la AEA modifica la conducta de dolor mediada por este canal, se realizaron ensayos mediante un modelo de dolor agudo (lamido de la pata). El grupo inyectado con el vehículo presentó poco tiempo de lamido (15 ± 4.5 s); el grupo, administrado con capsaicina ($1 \mu\text{g}$) presentó el mayor tiempo de lamido (36.2 ± 2.8 s); mientras que el grupo, administrado con AEA (50 ng) presentó poco tiempo de lamido (15.9 ± 1.9 s), comparable al grupo control. Finalmente se inyectó a un grupo de animales con capsaicina y AEA ($1 \mu\text{g}$ y 50 ng respectivamente) en la misma solución, en este caso se registró poco tiempo de lamido (16.5 ± 1.4 s), conducta asociada al dolor (Hunskar y Hole, 1987) a pesar de que la capsaicina estaba presente para activar al canal TRPV1 y producir dolor (figura 13).

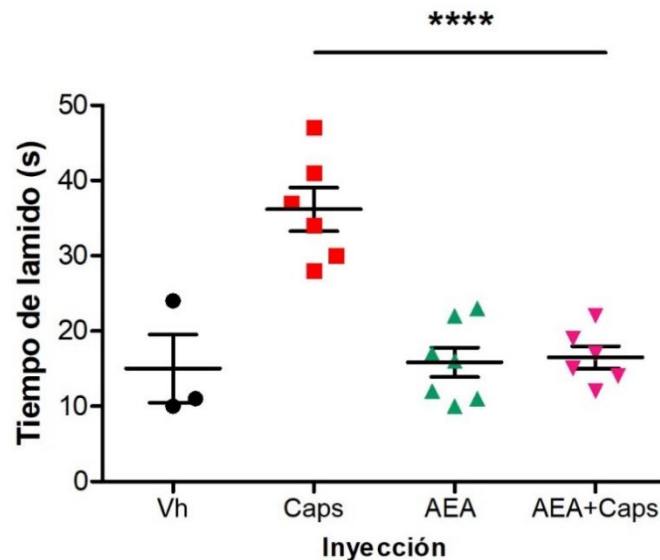


Figura 13. Disminución de la conducta de dolor a capsaicina por efecto de AEA. En la gráfica se muestra el tiempo de lamido como conducta de dolor en cada grupo de animales inyectados en la pata delantera. La inyección con vehículos (Vh) presentó una respuesta de dolor basal (15 ± 4.5 s) mientras que la inyección con capsaicina genera mayor dolor (36.2 ± 2.8 s). Por otra parte, la inyección con AEA presenta poco dolor (15.9 ± 1.9 s), semejante a lo obtenido con el Vh. Finalmente, el dolor provocado por la capsaicina disminuye en la coadministración con AEA (16.5 ± 1.4 s). Cada punto representa a un individuo, se realizó una prueba de ANOVA con análisis post hoc de Tukey **** $p < 0.0001$.

7. Discusión.

La búsqueda de nuevas alternativas analgésicas ha llevado al estudio de la regulación del canal TRPV1, así como el efecto de sus diferentes ligandos. Se sabe que los agonistas exógenos como la capsaicina poseen propiedades analgésicas, ya que al activar a TRPV1 de forma repetida se produce un flujo de calcio al interior celular que puede llevar a la pérdida de función de los nociceptores, en consecuencia, disminuye el dolor (Holzer 2008; Sanz-Salvador 2012). Por otra parte, se sabe poco sobre los mecanismos desencadenados por los agonistas endógenos del canal, uno de ellos es la AEA, un endocannabinoide que podría desencadenar eventos semejantes a los de la capsaicina. A pesar de que existen numerosos reportes sobre el papel analgésico de la AEA, hasta ahora en ningún trabajo se había explorado el posible efecto de esta molécula para regular los niveles proteicos del canal TRPV1.

7.1 Los niveles proteicos del canal TRPV1 disminuyen por efecto de AEA.

Previamente se reportó que la capsaicina la internalización del canal TRPV1 para su posterior degradación por la vía lisosomal, evento dependiente de la dosis y del tiempo de incubación con el agonista (Sanz-Salvador 2012). Este evento es altamente dependiente del número de canales disponibles en la membrana plasmática, por lo tanto, la eficiencia podría cambiar de acuerdo con el sistema celular utilizado (Sanz-salvador et al., 2012; Koplak et al, 1997).

En este trabajo se reprodujo el resultado obtenido por Sanz-Salvador y colaboradores, en el cual se observó reducción en los niveles de proteína de TRPV1 en células tratadas con capsaicina (figura 3). También demostramos que la AEA modifica los niveles de proteína total y de superficie de TRPV1. A diferencia de lo reportado para capsaicina, los efectos mediados por AEA son independientes de la concentración y del tiempo de incubación (figura 4-5). En este punto es importante

considerar que los efectos de la AEA no dependan del tiempo de incubación debido a la vida media de la AEA es breve, ya que es degradada rápidamente por la FAAH lo que indica que sus efectos deben ser locales y de rápida acción (Piomelli, 2003).

Estos resultados, nos sugirieron que la AEA podría estar desencadenando la desensibilización del canal TRPV1, de manera similar al de la capsaicina. Es importante mencionar que por las características de nuestros experimentos, en los que usamos a las células HEK293 como un sistema de expresión transitoria del canal TRPV1, se descarta por completo que la AEA produzca un mecanismo que involucre modificaciones en la transcripción del canal, ya que el plásmido transfectado carece de secuencias reguladoras endógenas propias de TRPV1 y su transcripción está asociada a la presencia del promotor de CMV, que asegura una alta expresión del canal, quedando como posible explicación alteraciones a nivel de proteína, por ejemplo, internalización del canal y degradación proteínica.

Muchos de los efectos de la AEA son dependientes del contexto celular, por esta razón fue importante determinar si este endocannabinoide modifica la cantidad de TRPV1 en cultivos primarios de neuronas de DRG, donde este canal se expresa abundantemente y demostramos que también en estas células, el efecto se reproduce, la AEA disminuye los niveles proteicos de TRPV1 (figura 11). Es importante mencionar que en sistema nervioso periférico, el principal receptor cannabinoide expresado es CB2, lo que está ampliamente relacionado con los efectos analgésicos de la AEA (Anand et al., 2008), al tiempo que no se tiene evidencia suficiente para descartar la posible participación de CB1 en estos efectos (Benarroch, 2015).

A pesar de la semejanza como agonistas que hay entre la capsaicina y la AEA existe evidencia de que los efectos difieren, por ejemplo, los registros realizados con AEA sobre la actividad del canal TRPV1 muestran que las corrientes producidas en el sistema de expresión endógeno (neuronas DRG) son mayores que en el sistema de expresión heterólogo (células HEK293), lo que se atribuye al contexto celular (Hermann et al., 2003; Fenwick et al., 2017). A pesar de que actualmente no existen reportes en los que se muestren cambios en el

número de los canales TRPV1 disponibles luego del tratamiento con la AEA, si existen ensayos en los que se han probado agonistas exógenos específicos para los receptores CB2, los cuales inhiben el efecto de la capsaicina (Sagar et al., 2005). Por esta razón, es posible que los efectos mediados por AEA, sean el resultado de un mecanismo sinérgico, entre la activación del canal TRPV1 y los mecanismos que pudieran estar mediados por los CB, lo cual podría desencadenar internalización y degradación del canal, por ejemplo la activación del receptor CB2, el cual se encuentra acoplado a una proteína $G_{i/o}$, interfiere con la actividad de la PKA (Vetter et al., 2008; Zhang et al., 2017). Esta cinasa es de crucial importancia para fosforilar al canal en serina 116 y conferirle estabilidad en la membrana plasmática y para la formación de los homotetrámeros de TRPV1, ya que sin esta modificación los monómeros no se asocian y son más rápidamente degradados (Vetter et al., 2008).

7.2. Mecanismo molecular que participa en los efectos de la AEA en la desensibilización de TRPV1.

Por la semejanza tridimensional que existe entre la capsaicina y la AEA, durante años se aceptó que podrían unirse al mismo sitio, además de esto, las corrientes generadas por la AEA son sensibles a capzasepina, que compite por el sitio denominado como el *pocket* vaniloide (Zygmunt et al., 1999; Smart et al., 2000). Sin embargo, recientemente se encontró que hay importantes diferencias en las corrientes generadas por AEA y las de capsaicina, que van más allá de la diferencia de afinidad, lo que sugiere la presencia de sitios alostéricos adicionales para la capsaicina que podrían no ser accesibles a la AEA, lo que indica que sus efectos y mecanismos de acción podrían ser distintos (Fenwick, et al., 2017).

Para explorar si ambos compuestos comparten el mecanismo molecular que induce la disminución en los niveles de proteína TRPV1, nos preguntamos si el estado de fosforilación en serina 116, es importante para los efectos inducidos por

AEA, como lo reportado para capsaicina (Sanz-Salvador et al., 2012). Nuestros resultados mostraron que la proteína total TRPV1 que no puede fosforilarse en dicho residuo (S116A) y así como la mutante que mimetiza la carga negativa de un grupo fosfato (S116D) siguen disminuyendo por el tratamiento con AEA (figura 7-8), a diferencia de lo previamente reportado, en donde el canal TRPV1 mutado en S116D es resistente a los efectos mediados por capsaicina, por ende, este canal no se internaliza y no se degrada, indicando que es necesario un canal TRPV1 desfosforilado en S116 para que la capsaicina induzca la disminución de los niveles de proteína TRPV1 (Sanz-Salvador et al., 2012) pero no para los efectos mediados por AEA (figura 8).

Es importante mencionar, que el canal TRPV1 puede ser fosforilado en otros aminoácidos, por lo que no podemos descartar ni su importancia ni su posible acción sinérgica en los efectos provocados por la AEA. Además de esto es necesario explorar con mayor detalle el efecto de la activación de los receptores cannabinoides ya que están acoplados a proteínas $G_{i/o}$ por lo que pueden desencadenar la activación de PKC (en el caso de CB1) o la inhibición de PKA (en el caso de CB2), lo que podría afectar la fosforilación y desfosforilación del canal (Lizanecz, et al., 2006).

Otro aspecto fundamental a considerar para la degradación de la proteína TRPV1 inducida por capsaicina es la entrada de calcio (Sanz-Salvador et al., 2012), de tal manera que, la eliminación del calcio extracelular abate por completo este efecto (Sanz-Salvador et al., 2012; Tian et al., 2019). En este trabajo demostramos que la AEA también requiere de calcio extracelular para inducir cambios en los niveles proteicos de TRPV1 (figura 9). Este flujo activa a enzimas que participan de la fosforilación del canal lo que puede cambiar su estabilidad en la membrana plasmática.

Finalmente determinamos que el tratamiento con AEA promueve la degradación de TRPV1 vía el lisosoma, similar al efecto reportado para capsaicina (figura 10). Debido a que el tratamiento con cloroquina no revierte por completo la disminución de la proteína TRPV1 por el tratamiento con AEA, podríamos

considerar que existe un mecanismo adicional, como la degradación vía el proteasoma, que también se favorezca vía AEA y no por capsaicina.

7.3 La AEA produce analgesia del dolor mediado por la activación del canal TRPV1.

Los efectos analgésicos de la AEA han sido reportados en diferentes modelos de dolor, sin embargo, no se ha reportado si la AEA tiene la capacidad de disminuir el dolor mediado por la activación del canal TRPV1. Los ensayos de dolor agudo en ratones inducido por la administración de capsaicina muestran que la aplicación conjunta de AEA y capsaicina produce una respuesta de dolor menor en comparación con los ratones administrados sólo con capsaicina, los cuales pasan mucho tiempo lamiéndose lo que es una respuesta asociada al dolor (figura 13).

En condiciones normales AEA actúa como un agonista parcial, pero si se realiza pretratamiento con agonistas de la PKC, se favorece un estado fosforilado del canal TRPV1 y la AEA actúa como un agonista completo capaz de inducir la activación del canal (Lizanecz et al., 2006). Un evento semejante al que puede ocurrir en condiciones de daño o inflamación donde se activan cinasas capaces de este cambio en la sensibilidad del canal.

Finalmente es interesante mencionar que la administración crónica de AEA podría ser un tratamiento seguro en dosis moderadas, esto con base en el caso de una mujer en Escocia que de forma natural tiene una microdeleción en un pseudogén de la FAAH, la enzima encargada de la degradación de la AEA (Habib et al., 2019). Este caso llamó la atención luego de que la paciente de 66 años no presentara dolor después de una importante cirugía, inclusive no se requirieron de analgésicos mayores después de la operación por lo que este caso llegó a varios medios de comunicación (Habib et al., 2019). El estudio de este paciente mostró concentraciones elevadas en sangre de AEA y de otras amidas cercanas como la palmitoetanolamida y la oleoiletanolamina, que normalmente también son

degradadas por la FAAH. Al realizar una revisión del historial médico de la paciente se encontró que a pesar de haber sido diagnosticada con osteoartritis no había padecido de dolor, lo que no coincidía con el alto grado de degeneración de sus articulaciones, además de haber pasado por intervenciones de venas varicosas y procedimientos dentales sin necesidad de analgesia. La paciente había pasado también por diferentes lesiones como la sutura por la laceración y la fractura de la muñeca sin requerir ningún tipo de medicamento. Inclusive reportó múltiples quemaduras y cortes sin dolor que había notado solo por las consecuencias como el olor a carne quemada, además de que estas lesiones habían sanado con facilidad. En pruebas realizadas de conducta la paciente no presentó ningún síntoma de ansiedad, depresión o pánico y aunque reporta que usualmente su memoria falla la única medicación que recibe actualmente es para los problemas de artritis que sin embargo son indoloros (Habib et al., 2019). De forma interesante cabe notar que entre las experiencias narradas por este paciente destaca que ingiere sin ninguna incomodidad chiles *Capsicum chinense* de la variedad 'Scotch Bonnet', una variedad del chile habanero cuyos valores de picor se estiman según la escala de Scoville entre 80,000–400,000 SHU, lo que representa un valor alto (Scoville, 1912). Este caso a pesar de ser único, permite la especulación sobre los posibles tratamientos con AEA como un analgésico, dada su capacidad para modular a canales iónicos como TRPV1 (Akopian et al., 2009). Estos tratamientos podrían ser seguros para la salud humana y posiblemente podrían ser controlados con mayor facilidad al ser moléculas que pueden ser degradadas por el mismo organismo, evitando o reduciendo así efectos tóxicos. Se requieren de estudios que aporten mayor detalle a estos procesos sin embargo la evidencia aporta un panorama favorable para el desarrollo de nuevas terapias analgésicas más seguras y eficaces.

8. Conclusiones.

- La AEA disminuye los niveles proteicos totales y de membrana de TRPV1 de manera independiente de la dosis y del tiempo de incubación.
- El efecto de la disminución de la proteína total de TRPV1 inducido por AEA es independiente de la fosforilación en S116.
- Los efectos de la AEA sobre TRPV1 son dependientes del calcio extracelular.
- La AEA induce la degradación de TRPV1 mediante la vía lisosomal.
- La AEA también disminuye los niveles proteínicos de TRPV1 en cultivos primarios de neuronas DRG.
- La AEA disminuye el dolor inducido por la administración de la capsaicina.

La AEA puede inducir la disminución de los niveles de TRPV1 tanto en el sistema de expresión heterólogo como en el nativo, esto ocurre a nivel de proteína total y de membrana. Este evento comparte características con lo reportado para los agonistas exógenos, como la dependencia de calcio y la degradación del canal por la vía lisosomal, sin embargo también tiene características propias importantes, como la independencia de la concentración y del tiempo de incubación, y la independencia de la fosforilación de S116.

9. Perspectivas.

- Determinar si otros endocannabinoides, además de AEA, como el 2-araquidonilglicerol (2-AG), modifican la cantidad de canales TRPV1 en cultivos primarios de neuronas de DRG y en un sistema de expresión transitorio.
- Determinar si los endocannabinoides inducen la internalización del canal TRPV1 en cultivos primarios de neuronas DRG mediante ensayos de inmunolocalización.
- Evaluar la coexpresión de los receptores cannabinoides CB1, CB2 y TRPV1 en DRG.
- Evaluar si el efecto de los endocannabinoides sobre el canal TRPV1 es dependiente de los receptores cannabinoides CB1 o CB2.
- Evaluar el efecto de la AEA sobre el canal TRPV1 en cotratamiento con inhibidores de PKA y PKC.
- Determinar si la AEA también promueve la degradación del canal TRPV1 vía el proteasoma.

10. Bibliografía.

Akopian, A. N., Ruparel, N. B., Jeske, N. A., Patwardhan, A., & Hargreaves, K. M. (2009). Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. *Trends in pharmacological sciences*, 30(2), 79-84.

Anand, U., Otto, W. R., Sanchez-Herrera, D., Facer, P., Yiangou, Y., Korchev, Y., & Anand, P. (2008). Cannabinoid receptor CB2 localisation and agonist-mediated inhibition of capsaicin responses in human sensory neurons. *Pain*, 138(3), 667-680.

Benarroch, E. E. (2015). Ion channels in nociceptors: recent developments. *Neurology*, 84(11), 1153-1164.

Bhave, G., Hu, H. J., Glauner, K. S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., & Gereau, R. W. (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12480-12485.

Breese, N. M., George, A. C., Pauers, L. E., & Stucky, C. L. (2005). Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain*, 115(1-2), 37-49.

Carlton, S. M., & Coggeshall, R. E. (2001). Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization. *Neuroscience letters*, 310(1), 53-56.

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. *Nature*. Vol.389 P. 816-824.

Clapper, J. R., Moreno-Sanz, G., Russo, R., Guijarro, A., Vacondio, F., Duranti, A., & Hohmann, A. G. (2010). Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nature neuroscience*, 13(10), 1265.

Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.

Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M & Patapoutian A, 2009. TRPV1 senses both acidic and basic pH. *J Neurosci*. P. 153–158.

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

Fenwick, A. J., Fowler, D. K., Wu, S. W., Shaffer, F. J., Lindberg, J. E., Kinch, D. C., & Peters, J. H. (2017). Direct anandamide activation of TRPV1 produces divergent calcium and current responses. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 200.

Fine, P. G., & Rosenfeld, M. J. (2013). The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides medical journal*, 4(4).

Goswami, C., Dreger, M., Jahnel, R., Bogen, O., Gillen, C., & Hucho, F. (2004). Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *Journal of neurochemistry*, 91(5), 1092-1103.

Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, 86(8), 1646-1647.

Groninger, H., & Schisler, R. E. (2012). Topical capsaicin for neuropathic pain# 255. *Journal of palliative medicine*, 15(8), 946-947.

Habib, A. M., Okorokov, A. L., Hill, M. N., Bras, J. T., Lee, M. C., Li, S., & Ramirez, J. D. (2019). Microdeletion in a FAAH pseudogene identified in a patient with high anandamide concentrations and pain insensitivity. *British Journal of Anaesthesia*.

Hermann, H., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Moriello, A. S., Lutz, B., & Di Marzo, V. (2003). Dual effect of cannabinoid CB 1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(3), 607-616.

Hill, R. Z., & Bautista, D. M. (2018). A trio of ion channels takes the heat.

Holzer, P. (2008). The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *British journal of pharmacology*, 155(8), 1145-1162.

Howlett, A. C., & Abood, M. E. (2017). CB1 and CB2 receptor pharmacology. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 80, pp. 169-206). Academic Press.

Hunskar, S., & Hole, K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30(1), 103-114.

Hylands-White, N., Duarte, R. V., & Raphael, J. H. (2017). An overview of treatment approaches for chronic pain management. *Rheumatology international*, 37(1), 29-42.

Ibsen, M. S., Connor, M., & Glass, M. (2017). Cannabinoid CB1 and CB2 receptor signaling and bias. *Cannabis and cannabinoid research*, 2(1), 48-60.

Ilescas (2017). Caracterización de la glicosilación del canal TRPV1. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Jancsó, G., Dux, M., Oszlács, O., & Sántha, P. (2008). Activation of the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channel opens the gate for pain relief. *British journal of pharmacology*, 155(8), 1139-1141.

Ji, R. R., Samad, T. A., Jin, S. X., Schmoll, R., & Woolf, C. J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36(1), 57-68.

Juárez-Contreras, R., Rosenbaum, T. L. R., & Morales-Lázaro, S. L. (2018). Lysophosphatidic acid and ion channels as molecular mediators of pain. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 462.

Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annual review of cell and developmental biology*, 29, 355-384.

Koplas, P. A., Rosenberg, R. L., & Oxford, G. S. (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience*, 17(10), 3525-3537.

Lee, S. Y., Lee, J. H., Kang, K. K., Hwang, S. Y., Choi, K. D., & Oh, U. (2005). Sensitization of vanilloid receptor involves an increase in the phosphorylated form of the channel. *Archives of pharmacological research*, 28(4), 405-412.

Leffler, A., Fischer, M. J., Rehner, D., Kienel, S., Kistner, K., Sauer, S. K., ... & Nau, C. (2008). The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 763-776.

Liu, J., Du, J., Yang, Y., & Wang, Y. (2015). Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia. *Experimental neurology*, 273, 253-262.

Lizanecz, E., Bagi, Z., Pásztor, E. T., Papp, Z., Édes, I., Kedei, N.... & Tóth, A. (2006). Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. *Molecular pharmacology*, 69(3), 1015-1023.

Loeser, J. D., & Treede, R. D. (2008). The Kyoto protocol of IASP basic pain Terminology☆. *Pain*, 137(3), 473-477.

Malin, S. A., Davis, B. M., & Molliver, D. C. (2007). Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nature protocols*, 2(1), 152.

Mason, L., Moore, R. A., Derry, S., Edwards, J. E., & McQuay, H. J. (2004). Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *Bmj*, 328(7446), 991.

Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561.

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.

Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61.

Nieto-Posadas, A., Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., & Rosenbaum, T. (2012). Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature chemical biology*, 8(1), 78.

Nilius, B., & Flockerzi, V. (Eds.). (2014). Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels (Vol. 2). Berlin, Heidelberg: Springer.

Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., & Tominaga, M. (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C ϵ and identification of two target serine residues. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13375-13378.

Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(11), 873.

Rice et al, Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (2002) 66(2&3), 243-256.

Ross, R. A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British journal of pharmacology*, 140(5), 790-801.

Sagar, D. R., Kelly, S., Millns, P. J., O'shaughnessey, C. T., Kendall, D. A., & Chapman, V. (2005). Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(2), 371-379.

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

Scoville, W. L. (1912). Note on capsicums. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 1(5), 453-454.

Scherer, P. C., Zaccor, N. W., Neumann, N. M., Vasavda, C., Barrow, R., Ewald, A. J., ... & Snyder, S. H. (2017). TRPV1 is a physiological regulator of μ -opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51), 13561-13566.

Smart, D., Gunthorpe, M. J., Jerman, J. C., Nasir, S., Gray, J., Muir, A. I. & Davis, J. B. (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *British journal of pharmacology*, 129(2), 227-230.

Smith et al, 1994. The Pharmacological Activity of Anandamide, a Putative Endogenous Cannabinoid, in Mice. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*

Steingrimsdóttir, Ó. A., Landmark, T., Macfarlane, G. J., & Nielsen, C. S. (2017). Defining chronic pain in epidemiological studies: a systematic review and meta-analysis. *Pain*, 158(11), 2092-2107.

Tian, Q., Hu, J., Xie, C., Mei, K., Pham, C., Mo, X., & Liu, Q. (2019). Recovery from tachyphylaxis of TRPV1 coincides with recycling to the surface membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(11), 5170-5175.

Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., & Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21(3), 531-543.

Turcotte, C., Blanchet, M. R., Laviolette, M., & Flamand, N. (2016). The CB 2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4449-4470.

Van Der Stelt, M., & Di Marzo, V. (2004). Endovanilloids: putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *European Journal of Biochemistry*, 271(10), 1827-1834.

Veldhuis, N. A., Lew, M. J., Abogadie, F. C., Poole, D. P., Jennings, E. A., Ivanusic, J. J., & McIntyre, P. (2012). N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21765-21772.

Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 387-417.

Vetter, I., Cheng, W., Peiris, M., Wyse, B. D., Roberts-Thomson, S. J., Zheng, J., & Cabot, P. J. (2008). Rapid, opioid-sensitive mechanisms involved in transient receptor potential vanilloid 1 sensitization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19540-19550.

Waxman, S. G., & Zamponi, G. W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature neuroscience*, 17(2), 153.

Woolf, C. J. (2004). Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of internal medicine*, 140(6), 441-451.

Xue, Q., Jong, B., Chen, T., & Schumacher, M. A. (2007). Transcription of rat TRPV1 utilizes a dual promoter system that is positively regulated by nerve growth factor. *Journal of neurochemistry*, 101(1), 212-222.

Zhang, M., Chi, M., Zou, H., Tian, S., Zhang, Z., & Wang, G. (2017). Effects of coadministration of low dose cannabinoid type 2 receptor agonist and morphine on vanilloid receptor 1 expression in a rat model of cancer pain. *Molecular medicine reports*, 16(5), 7025-7031.

Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 833.

Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H. H., Sørsgård, M., Di Marzo, V., & Högestätt, E. D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400(6743), 452.