



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION

LABORATORIO DE BIOLOGÍA SENSORIAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN

PRÍNCIPE FELIPE

PROGRAMA DE DOCTORADO
NEUROCIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA

DESENSIBILIZACIÓN INDUCIDA POR AGONISTA DEL RECEPTOR TRPV1

Tesis Doctoral presentada por: Lucía Sanz Salvador.
Director de Tesis Doctoral: Dra. Rosa M^a Planells Cases.
Tutor de Tesis Doctoral: Dr. Fernando Martínez García.

Valencia, 2014.

Dra. Rosa M^a Planells Cases, investigadora del Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie de Berlín.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada "Desensibilización inducida por agonista del receptor TRPV1", ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Biología Sensorial del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, por Lucía Sanz Salvador, licenciada en Farmacia por la Universidad de Valencia.

Revisado el presente trabajo, considero que cumple los requisitos necesarios para ser presentado ante el Tribunal constituido al efecto, para la obtención del grado de doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado.

Valencia, 24 de Febrero de 2014.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a horizontal line followed by a complex, stylized scribble of loops and curves.

Dra. Rosa M^a Planells Cases

*A las Isabeles de mi vida
por estar siempre*

AGRADECIMIENTOS

Sin duda se trata de una de las partes más complicadas de escribir pero también es la más emocionante y sentimental, no hay nada mejor que dar las gracias a todos los que te rodean, a “tu gente”, por eso debo y quiero hacerlo tal y como ellos se merecen. Pido perdón de antemano por el rollo que viene a continuación. Va ser que al final le he cogido el gusto a esto de escribir ;)

En primer lugar, Rosa gracias por la oportunidad, por las enseñanzas y por la confianza depositada. Espero que nuestros caminos científicos se crucen de nuevo, te deseo lo mejor. A Antonio gracias por tu ayuda, colaboración y por darnos una segunda casa en Elche cuando nos “invitaron” a irnos de la nuestra, fue nuestra esperanza dentro del desastre.

Mis compañeras de laboratorio I-17 han sido tantas y tan diferentes, he aprendido tanto de vosotras... he tenido mucha suerte. María Grazia gracias amiga por tu inteligencia, por tu alegría, esa risa única que reconocería en cualquier parte del mundo, por esas charlas científicas con risas y lágrimas en mezcla perfecta, esos viajes inolvidables, esas cenas con motivo o sin él y que no se me olvide por no enseñarme nada de italiano....quiero tenerte en mi vida. Amparo gracias por todo tu extraordinario apoyo científico y moral en los duros momentos de esta tesis, parte de esto es gracias a ti, no se me ocurre mejor compañía....sé lo que me digo cuando te insisto para que hagas la tesis. Imelda gracias por las risas, lamentos, ideas, consejos, cervezas y cafés compartidos en nuestro querido pisito-despachito y en estos meses pre-tesis que hemos compartido en la facultad. Elena gracias por ser la primera en enseñarme, eres un ejemplo de energía y coraje, para ti siempre seré “Ade”. María gracias por tu ayuda, por transmitir siempre esa calma y buen rollo y también gracias por esa riquísima empanada, nos cuidabas como la mami que ya eres. Majda gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, esos últimos cultivos en los que me ayudaste no los olvidaré. Laura “riquiña” gracias por traerme el soplo gallego que tanto quiero. Judith “chicharrera” gracias por traer tanto entusiasmo y ganas de aprender desde las Afortunadas.

Del CIPF me llevo una mochila llena de amigos únicos. Mi Lore, mi imprescindible, gracias por ser esa amiga que todos querrían tener, cuanta suerte tengo, gracias por estar siempre, aunque estés lejos te siento cerca, sigue en mi vida para siempre. Vero gracias por ser única, por demostrarme de nuevo que la gente diferente es la que más me gusta y más quiero a mi lado, gracias por hacerme reír, por quererme y demostrármelo y muy

importante por tener buen gusto musical, la rubia te quiere. Vane gracias por tanto...por tu ayuda en la vida, en la ciencia, en el amor, gracias por darme prudencia y paciencia, eres tan tan tan brillante que sé que llegarás lejos y yo estaré seguro muy cerca para verlo, te quiero novia. Arantxa amiga, juntas tanto tiempo... eres esa trabajadora incansable, amable, dispuesta, buena, que nunca se queja. Cuanto vales! un tesoro de los buenos, te quise desde mi primer día en el CIPF. Maca gracias por demostrar que la ciencia y el glamour pueden ir de la mano, eres brillante y llegarás lejos, sigue siempre tan flower. Mara eres la sonrisa, esa divina penelope glamour que conoce a todo el mundo y sabe de todo, te deseo todo lo bueno y más porque te lo mereces. Lauri gracias por esas charlas de pasillo que hacían que ninguna trabajara pero que bien venían, por esos bailes con extintor incluido, por esas cenas que nos hacías con tanto cariño, te deseo lo mejor a ti y a José. Lydia gracias por ser mi primera amiga gallega, gracias por ser como eres, impulsiva, inquieta con esa vitalidad y alegría y que no se me olvide gracias por mi primera quemada en esa cena gallega inolvidable. José amigo, gracias por ser fiel, por estar siempre después de tantos años, por preocuparte, por aguantar mis bromas, por ensañarme frikadas de libros, comics y por demostrar que podemos disfrutar trabajando en algo diferente. Anuska gracias por traer ese arte andaluz que despertaba el laboratorio de su letargo, eres una gran científica. M^a Jesús gracias por dejarme compartir esa época tan importante de tu vida, ver crecer a Uriel fue todo un placer. Cris esa murciana cosmopolita afincada en NY, siempre vi en ti la científica que quería ser, que orgullo cuando digo mi amiga de New York. Inma, como buena aragonesa eres leal, justa y de ley, gracias por tu consejos y tus ánimos pasilleros. Rita, la trabajadora incansable, eres la científica por excelencia, no pierdas nunca esas ganas de saber. Laura cuanto me acordé de ti cuando empecé con los arrays, gracias por esa máxima fm que tanto me alegraba. Ana gracias por ayudarme con mis queridos ratones inquietos y ahora en Medicina, una profesional de las grandes.

A todos mis compañeros y amigos del grupo de José y de Javier o también llamado Sigma, Lore, Carmen, Roberto, Pilar, David, Luis, Belén, Ana, Isabel, Satu, Paquita gracias por vuestra ayuda, por tener siempre de todo y prestárnoslo sin intereses y por esas comidas navideñas, esos decimos de ilusión navideña, por esas cerves en Aragón. A las que se unieron las fantásticas chicas de la planta baja, María, Laura, Miriam. Gracias por ese compañerismo, por esa fraternidad, pasar un ERE con todos vosotros fue un drama pero no imagino mejores aliados. Quiero ir a vuestras tesis y... podré preguntar!!! Y como no, gracias al personal de todos los servicios por su ayuda y paciencia infinitas Pilarica, Ali, Alberto, Eva, Virginia, Esther, Viviana, Beth, Carmen, Bea y muchos más que seguro me

dejo... todos ellos profesionales de los buenos. Y al resto de compañer@s-amig@s del CIPF por que juntos levantamos ese centro de la nada, conseguimos hacer nuestro trabajo dignamente y con ilusión a pesar del entorno ensuciado por la política y el dinero, mucha suerte a todos en vuestra vida con ciencia o sin ella, nos vemos por el mundo.

Gracias a todos los compañeros de Elche, Lucía, Aaron, Nuria, María, Natalia, Carol, Cloti, Rober, Roberto, Isabel, Paco (espero no dejarme a nadie) gracias por acogernos siempre tan bien, gracias por ese trasiego de productos Valencia-Elche que tan útil era, esos seminarios eternos se llevaban mejor en vuestra compañía.

Hace apenas dos años caí en la facultad de Medicina y quien me iba a decir que conocería a “mis chicas”, en tan poco tiempo me han dado tanto y tan bueno y claro es imposible no quererlas tanto como las quiero. Horten amiga, la vida nos une continuamente, por algo será, gracias por tu energía, tu lucha, tu constancia, eres un ejemplo para mí y gracias por compartir conmigo tantísimas cosas antes, ahora y seguro después, eres fuerte y no dejes que nadie te diga lo contrario. Mercedes, gracias por ser esa compañera fiel, tan dispuesta siempre a ayudar. Eres un ejemplo de paciencia y inteligencia, ojala exista esa justicia divina y pronto estés donde te mereces, vales mucho amiga. Arantxa “mi peque” gracias por ser esa pequeñaja cariñosa y empalagosa con ojos color mar que tanto quiero y que tanto me ha enseñado y me ha querido en tan poco tiempo, estaré siempre para lo que me necesites. Jessi gracias por traerme la alegría, la niñez, la dulzura y ese arte que tienes, un placer estar y trabajar a tu lado. Carmen “meine Freundin”, el tándem perfecto de belleza e inteligencia, a veces me gustaría ponerte un espejo colgado continuamente delante para que no se te olvide jamás lo muchísimo que vales. Te quiero mucho tostadita y sabes que siempre me tendrás. Gracias a tí conocí a mis extraordinarias y adoradas andaluzas Carol y Roci, espero seguir compartiendo arenals, conciertos, cenas y risas con vosotras. Bea eres esa amiga que siempre está, siempre se preocupa, siempre tiene una palabra dulce y cariñosa, siempre te anima, gracias por llegar a mi vida cuando había dejado de creer en mucha gente y encima gallega, simplemente la perfección, quéroche moito amiga mía!!

En especial quiero agradecer a Leo y a Antonio todo su apoyo, su interés, su preocupación y su disponibilidad y facilidad al permitirme terminar la tesis mientras trabajaba con ellos. Ha sido un placer trabajar a vuestro lado y espero poder seguir haciéndolo.

No quiero olvidar de algunos de mis amigos no científicos, benditos sean por que hacen que vea el mundo desde otro prisma. Isabel, Miriam, Esther, Laura, M^a José, Manu, Soraya, Sophie, Maribel, Ismael, Cris... todos ellos y algunos más que seguro me olvido,

han soportado en distintas etapas de mi vida mi agobio, mi cansancio, mis quejas, mi pobreza, mi falta de tiempo, mi tardanza a responder mails, llamadas, mensajes, por todo eso y más os doy las gracias por animarme, despejarme, hacerme reír y olvidarme de todo.

A ti papa, gracias por enseñarme a ser como soy, aprendí de tu enorme fuerza y coraje, de tu lucha incansable, nunca te rendías, nunca cansado y siempre con ese humor pícaro y burlón que creo haber heredado. Eres la persona más trabajadora e inteligente que he conocido y conoceré. Desde el cielo viste como acababa la carrera, que por cierto elegí gracias a tu consejo, y ahora me ves hacerme doctora, cuanto te echo de menos... sé que estarías orgulloso, eres mi ejemplo en tantas cosas, nada me gusta más en el mundo que me digan que me parezco a ti, que orgullo!. Mi tío Fernando es ese segundo padre que tengo la suerte de tener, ya que el mío ya no está, quien mejor que su hermano. Gracias por quererme y cuidarme desde pequeña cuando iba a despertarte por la mañana, eres un ejemplo para mí de bondad, respeto, saber estar, profesionalidad y dedicación, solo deseo que seas feliz y aunque sé que el trabajo te da la vida ya va tocando disfrutar del esfuerzo de tantos años, te lo has ganado.

Para mis Isabeles es el mayor GRACIAS de todos, ellas son mi vida, mi pilar, mi refugio, esa paz y tranquilidad que solo te puede dar la familia. A mi hermana darle las gracias por protegerme siempre, porque sé que deja todo por venir a ayudarme, por cuidarme desde que nací, por consentirme todo y más, por escucharme, por darme ese hombro para llorar, ese beso y esa risa sanadora en esta última temporada de mi vida y siempre, eres la hermana que todos querrían y que no sé si me merezco en realidad. Crecer, jugar, estudiar, madurar y vivir a tu lado es un inmenso placer para mí.

Mi madre es la dulzura y cariño concentrados en la mujer más buena del mundo, me has educado a base de amor, respecto y trabajo, dándome todo lo que tú no pudiste tener y haciendo que tuviera siempre lo que he necesitado, pero valorando el esfuerzo que supone conseguir las cosas. El ejemplo de que no hace falta tener un título para ser tan inteligente y avispada, absolutamente todos los días sin excepción me enseñas algo, me haces reír, me sorprendes. Eres sin lugar a dudas, la persona que saca lo mejor de mí y al igual que mi hermana no sé si merezco tener la mamá que tengo.

Gracias a mis isabeles por quererme, ayudarme, cuidarme, mimarme y enseñarme tanto cada día, gracias a vosotras soy mejor persona y vivo tranquila porque sé que os tengo conmigo.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	III
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Anatomía y neurobiología del dolor.....	3
1.1.- Definición de dolor.....	3
1.2.- Tipos de dolor.....	4
1.3.- Nociceptores. Fases del proceso nociceptivo.....	6
2.- Receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1) o receptor de capsaicina.....	9
2.1.- Superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRPs).....	10
2.2.- Mecanismos de activación y estructura del receptor TRPV1.....	13
2.3.- Expresión tisular y diversidad funcional del receptor TRPV1 en condiciones fisiológicas y patológicas.....	17
3.- Modulación de la actividad del receptor TRPV1: mecanismos de sensibilización y desensibilización.....	21
3.1.- Inflamación neurogénica. Sensibilización periférica.....	21
3.2.- Desensibilización. Tipos.....	23
3.3.- Mecanismos moleculares implicados en la desensibilización aguda del receptor TRPV1.....	25
3.3.1.- Equilibrio entre los estados de fosforilación-desfosforilación.....	25
3.3.1.1.- Fosforilación: implicación en la sensibilización del receptor.....	25
3.3.1.2.- Desfosforilación: implicación en la desensibilización del receptor.....	26
3.3.1.3.- Refosforilación: implicación en la resensibilización del receptor.....	27
3.3.2. Interacción con calmodulina.....	28
3.3.3. Depleción de PIP2.....	28

3.4.- Funciones fisiológicas del mecanismo de desensibilización.....	30
4.- Regulación del tráfico intracelular de canales iónicos.....	31
4.1.- Tráfico intracelular de los canales TRP.....	34
4.2.- Vías de señalización implicadas en la traslocación de TRPV1 a la membrana plasmática	35
4.3.- Estudio del mecanismo de endocitosis y/o reciclaje del receptor TRPV1.....	36
4.4.- Estudio del mecanismo de degradación del receptor TRPV1.....	39
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1.- Cultivos celulares.....	51
1.1.- Líneas celulares: condiciones de cultivo y transfección.....	51
1.2.- Cultivos primarios neuronales de DRGs de rata.....	51
2.- Tratamientos, anticuerpos y plásmidos.....	53
2.1.- Tratamientos farmacológicos. Condiciones de uso.....	53
2.2.- Anticuerpos empleados.....	54
2.3.- Plásmidos.....	55
3.- Ensayos de Inmunofluorescencia.....	56
3.1.- Marcaje extracelular del receptor y posterior internalización.....	56
3.2.- Marcaje simultáneo de receptores en membrana e intracelulares.	57
3.3.- Eliminación del marcaje del anticuerpo primario mediante solución ácida (técnica de <i>acid-stripping</i>).....	58
3.4.- Microscopía y análisis de imágenes.....	59
4.- Ensayos de biotilación: detección de proteínas de membrana...	59
5.- Medidas de calcio intracelular.....	60
6.- Medidas de electrofisiología: técnica de sello-perforado.....	63
7.- Ensayos de supervivencia celular.....	64

8.- Análisis estadístico de los datos.....	66
RESULTADOS.....	69
1.- Estudio del proceso de internalización del receptor TRPV1.....	71
1.1.- Internalización constitutiva de TRPV1.....	72
1.2.- Internalización de TRPV1 inducida por agonista.....	76
1.2.1.- Localización subcelular del receptor TRPV1 tras exposición a capsaicina en cultivos de neuronas de DRGs.....	76
1.2.2.- Localización subcelular del receptor TRPV1 tras exposición a capsaicina en células HEK293.....	77
1.2.3.- Ensayos de biotilación: efecto de la capsaicina en la expresión superficial y total de TRPV1.....	80
1.2.4.- Internalización de TRPV1 inducida por agonista RTX.....	83
1.3.- Caracterización funcional de la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina	85
1.3.1.- Medidas de Calcio Intracelular.	85
1.3.2.- Electrofisiología: técnica del sello-perforado.....	88
2.- La exposición prolongada a capsaicina induce la degradación de TRPV1 a través de la vía lisosomal.....	90
2.1. - La población de TRPV1 internalizada por exposición prolongada a capsaicina se localiza en los lisosomas	90
2.2.- Efecto de los inhibidores de la degradación proteosomal y lisosomal sobre la población de membrana y total de TRPV1.....	93
3.- Internalización de TRPV1 inducida por capsaicina requiere de la activación del canal.....	97
3.1.- La unión de capsazepina, antagonista competitivo de TRPV1, no provoca la internalización-degradación del receptor	97
3.2.- Un mutante de TRPV1 que carece de la región del poro, TRPV1 _{PORELESS} , no se internaliza después del tratamiento con capsaicina.....	99
4.- Papel del calcio en la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina	101

4.1.- La entrada de calcio al citosol promueve la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina	101
4.2.- El secuestro de calcio intracelular aumenta la corriente residual tras aplicación prolongada de capsaicina.....	102
5.- Determinación del tipo de ruta endocítica seguida por el receptor TRPV1 expuesto a capsaicina.....	104
5.1.- Las condiciones hipertónicas bloquean la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina	104
5.2.- La endocitosis de TRPV1 inducida por capsaicina es independiente de la vía de las clatrin.....	107
5.3.- La endocitosis de TRPV1 inducida por capsaicina es independiente de la vía de las dinaminas.....	110
6.- La fosforilación de TRPV1 por PKA suprime la internalización inducida por capsaicina	113
6.1.- La fosforilación por PKA provoca una disminución de la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina.....	113
6.2.- El mutante TRPV1-S116D presenta una significativa reducción de la desensibilización inducida por capsaicina.....	116
7.- Ensayos de supervivencia celular tras exposición prolongada a capsaicina	118
7.1.- Efecto de la capsaicina en la viabilidad de cultivos neuronales de DRGs de ratas neonatales.....	118
7.2.- Determinación de la viabilidad celular en sistemas de expresión heteróloga mediante ensayos MTT y citometría de flujo.....	119
DISCUSIÓN.....	123
CONCLUSIONES.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	149

ABREVIATURAS

- 12-HPETE:** ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico
- 7-AAD:** 7-aminoactinomicina D
- AC:** adenilato ciclasa
- AKAP150:** proteína de anclaje a quinasa A 79/150
- AMPA:** ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- Arf6:** factor de ribosilación ADP 6
- ASIC:** canales iónicos sensibles al pH (en inglés, *acid sensing ion channels*)
- ATP:** adenosín 5-trifosfato
- BAPTA-AM:** ácido 1,2-bis (o-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetracético
- BCA:** ácido bicinconínico
- CaM:** calmodulina
- CAMKII:** calmodulina quinasa dependiente de calcio tipo II
- Caps:** capsaicina
- CDC42:** proteína control de división celular 42
- CGRP:** péptido relacionado con el gen de la calcitonina
- CIC7:** transportador de cloruro (en inglés, *antiporter Cl/H⁺*)
- Clpz:** clorpromacina
- CN:** calcineurina
- Cpz:** capsazepina
- CQ:** cloroquina
- DAG:** diacilglicerol
- Din:** dinamina
- DMEM:** medio Eagle modificado Dulbecco
- DNA:** Acido desoxirribonucleico
- DRGs:** ganglios de la raíz dorsal (en inglés, *dorsal root ganglion*)
- EDTA:** ácido etilendiamino tetracético
- EEA-1:** marcador de endosomas tempranos (en inglés, *early endosome antigen 1*)
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico
- EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EGTA:** ácido etilenglicol tetracético

ABREVIATURAS

EMEM: medio mínimo esencial Eagle

ERC: compartimentos de reciclaje endocítico

ETAR: receptor de endotelina tipo A

FBS: suero fetal bovino

FRET: transferencia de energía de resonancia de Förster

FSK: forskolina

FURA-2AM: fura-2 acetoximetilester

GABA: Acido γ -aminobutírico

GFP: proteína fluorescente verde

GPI-AP: proteínas ancladas a glicosil fosfatidil inositol

GPRC: receptores acoplados a proteínas G

GRAF1: regulador de GTPasa asociado a quinasa de adhesión focal 1

GST: Glutation S-transferasa

H-89: N-[2-(p-Bromocinnamylamino) etil]-5-isoquinolinsulfonamida dihidrocloro

HEK293: células de riñón embrionario humano

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetanosulfónico

HS: suero de caballo (en inglés, *horse serum*)

IASP: asociación internacional para el estudio del dolor (en inglés, *Internacional Association for the Study of Pain*)

IC: inmunocitoquímica

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1

IP3: inositol tri-fosfato

kDa: kilodaltons

LDL: lipoproteína de baja densidad

Leup: leupeptina

LTP: potenciación a largo plazo

MES: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico

MG132: carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal

MHCI: complejo mayor de histocompatibilidad I

mLCA-ds-Red: cadena ligera A de clatrina de ratón (en inglés, *mouse clathrin light chain A*)

- MTT:** Tiazolil azul formazán
- NADA:** N-araquidonil-dopamina
- NGF:** Factor de crecimiento nervioso
- NMDA:** Receptores de glutamato de tipo N-metil-D-aspartato
- NOMPC:** no mecanoreceptor potencial C (también llamado TRPN).
- PAR2:** receptor activado por proteasas 2
- PBS:** tampón fosfato salino
- PFA:** para-formaldehído
- PGE2:** prostaglandina E2
- PI3K:** fosfoinositol 3-quinasa
- PIP2:** Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato
- PIP3:** Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato
- PKA:** proteína quinasa A
- PKC:** proteína quinasa C
- PLC β :** Fosfolipasa-C tipo β
- PMA:** Forbol éster 12-miristato 13-acetato
- PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PP2B:** proteína fosfatasa de tipo 2B
- r.p.m:** revoluciones por minuto
- Rab:** proteínas Ras asociada al cerebro
- RE:** Retículo endoplásmico
- RTX:** resiniferatoxina
- S.E.M:** error estándar de la media
- Sac:** Sacarosa
- SDS-PAGE:** dodecil sulfato sódico-gel electroforético de poliacrilamida
- SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- SNAP:** Proteína soluble de anclaje a la ATPasa de fusión sensible a N-etilmaleimida
- SNARE:** receptor SNAP
- Sulfo-NHS-SS-Biotina:** sulfosuccinimidil-2-[biotinamido] etil-1,3 ditiopropionato
- Tf:** Transferrina

ABREVIATURAS

TG: ganglios del trigémino

TRP: receptores de potencial transitorio

TRPA: subfamilia de receptores potencial transitorio anquirina

TRPC: subfamilia de receptores potencial transitorio canónica o clásica.

TRPM: subfamilia de receptores potencial transitorio melastina

TRPML: subfamilia de receptores potencial transitorio mucolipina.

TRPML1: receptores potencial transitorio mucolipina tipo 1.

TRPP: subfamilia de receptores potencial transitorio policistina

TRPV: subfamilia de receptores potencial transitorio vanilloide

VGICs: canales iónicos dependientes de voltaje.

WB: western blot

WGA: aglutinina de germen de trigo.

WT: animal silvestre (en inglés, *wild-type*)

YFP: proteína fluorescente amarilla

RESUMEN

El receptor TRPV1 es un canal catiónico capaz de activarse por calor, pH ácido, voltaje y por diferentes sustancias químicas entre las que destacan los agonistas vanilloides capsaicina y resiniferatoxina. En las neuronas aferentes nociceptivas o nociceptores, donde se expresa de forma abundante, TRPV1 actúa como un sensor polimodal cuya actividad se controla por multitud de mecanismos reguladores capaces de causar su sensibilización o desensibilización. La estimulación prolongada por sus agonistas provoca la entrada en un periodo refractario en el que el receptor se vuelve incapaz de responder a ningún estímulo, encontrándose en estado desensibilizado. Dependiendo del tipo de agonista, dosis y tiempo de exposición este periodo puede durar desde minutos hasta días, por tanto, se distinguiría entre desensibilización aguda y a medio-largo plazo.

En el presente estudio hemos determinado que la exposición prolongada a los agonistas vanilloides induce la endocitosis del receptor TRPV1 de forma dosis y tiempo dependiente, empleando para ello ensayos de biotilación de proteínas de membrana y marcajes inmunocitoquímicos diferenciales, así como ensayos funcionales de medidas de Ca^{+2} intracelular y registros electrofisiológicos. Adicionalmente, hemos demostrado que la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina requiere la activación del canal y el flujo de Ca^{+2} a través del poro. Tras analizar las diferentes rutas de endocitosis implicadas, hemos establecido que se trata de un mecanismo independiente de clatras y dinaminas, cuyo destino final es la degradación lisosomal de los receptores TRPV1 internalizados.

Debido a que la fosforilación-desfosforilación del receptor TRPV1 modula su actividad, evaluamos si esta modificación postraduccional de la proteína era capaz de interferir en el proceso de internalización inducida por agonista del receptor. Para ello, se emplearon diversas herramientas farmacológicas y mutantes específicos que permitieron concluir que la fosforilación mediada por PKA era capaz de bloquear casi totalmente la internalización de TRPV1.

En resumen, nuestros resultados indican que la endocitosis del receptor TRPV1 y posterior degradación lisosomal contribuyen notablemente al fenómeno de desensibilización a largo plazo de los nociceptores inducida por los vanilloides. Por ello, la regulación de la densidad de receptores TRPV1 en las terminales

RESUMEN

periféricas nociceptivas supone un mecanismo clave no solo para el desarrollo y mantenimiento de la hiperalgesia inflamatoria sino también para la analgesia. Con este proyecto se aportan datos novedosos acerca del tráfico intracelular del receptor que proporcionan un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento del dolor mediante la modulación de los niveles de expresión del receptor en la membrana plasmática.

INTRODUCCIÓN

1.- Anatomía y Neurobiología del dolor.

1.1.- Definición de dolor.

La sensación de **dolor** es un mecanismo de alarma y defensa que nos alerta de un daño o lesión inminente, y que desencadena la activación de determinadas respuestas protectoras por parte del individuo permitiéndole reconocer un posible daño en su integridad física. Se trata de una experiencia compleja que no implica únicamente la transducción de señales nocivas, sino también un procesamiento de tipo cognitivo y emocional por parte del cerebro (Julius and Basbaum, 2001).

La habilidad para responder a los estímulos nocivos es una característica básica de todos los animales de la escala filogenética, desde los organismos unicelulares hasta los mamíferos. A través de la evolución de las especies, los animales han desarrollado complejos mecanismos para protegerse del entorno. En los humanos, la experiencia dolorosa está íntimamente relacionada con la evolución de la especie y el desarrollo de su sistema nervioso. Tanto el hombre como el resto de animales, han integrado esta reacción emocional en sus estructuras nerviosas más básicas debido al alto valor adaptativo que les proporciona. Por tanto, el dolor provoca un comportamiento complejo que depende de la evolución del sistema nervioso de cada animal y es, por lo tanto, único para cada especie (León Olea, 2002).

Se han propuesto gran número de definiciones del dolor lo cual refleja la enorme dificultad para encontrar una definición exacta de este proceso. Sin embargo, la más aceptada es la propuesta por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, en inglés, *Internacional Association for the Study of Pain*) en su consenso de 1979, que lo define como: *“una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño”*. Esta definición incluye los componentes emocionales y subjetivos asociados al dolor, no lo considera únicamente una experiencia nociceptiva (IASP Pain terms., 1986; Loeser and Melzack, 1999).

1.2.- Tipos de dolor.

Han sido muchos los intentos de clasificación de los diferentes tipos de dolor, proponiéndose múltiples clasificaciones basadas en factores tan diversos como el origen, la expectativa de vida, la región afectada, los mecanismos neurofisiológicos implicados o el tiempo de duración entre otros. Esto supone una fuente permanente de confusiones, por ello el Subcomité de Taxonomía de la IASP desarrolló una clasificación taxonómica del dolor definiendo cinco requisitos para su caracterización: según la región afectada, el sistema involucrado, las características temporales del dolor, la intensidad declarada por el paciente y la etiología (IASP Pain terms., 1986; Merskey, 2007).

En función del factor tiempo se distinguen el dolor agudo del dolor crónico (Loeser and Melzack, 1999). El **dolor agudo** es un dolor de naturaleza nociceptiva, que aparece por estimulación química, mecánica o térmica de determinados receptores específicos. Posee una función protectora, ya que funciona como señal de alarma, además de una función fisiológica manteniendo la homeostasis del organismo. El dolor agudo puede ser superficial (piel, mucosas), profundo (músculos, huesos, articulaciones) o visceral. Se caracteriza por ser un dolor bien localizado, de corta duración (días-semanas) y autolimitado ya que suele cesar cuando desaparece la lesión que lo originó. Los síntomas psicológicos asociados son escasos, habitualmente limitados a una ansiedad leve.

En contraste, el **dolor crónico** no posee una función protectora, y más que un síntoma como en el caso del dolor agudo, se considera en sí mismo una enfermedad. Puede persistir por tiempo prolongado después de la lesión inicial, incluso cuando ésta desaparece. De hecho, una de sus definiciones considera que es aquel dolor que, con una duración superior a 6 meses, se mantiene incluso cuando la causa que lo produjo ha desaparecido. En la mayoría de los casos requiere un enfoque terapéutico pluridisciplinar ya que suele ser refractario a múltiples tratamientos. Lleva asociado importantes trastornos psicológicos como cambios en la personalidad o depresión, insomnio, miedo o ansiedad crónica (Agnew and Merskey, 1976).

En función de los distintos mecanismos neurofisiológicos implicados

se definen dos tipos distintos de dolor, el dolor neuropático y el dolor nociceptivo (Nicholson, 2006). El **dolor neuropático**, llamado también dolor anormal o patológico, se origina por un trastorno funcional del sistema nervioso periférico o central y, al contrario que el dolor nociceptivo, no tiene ninguna función de advertencia o protección. Se caracteriza por una falta total de relación causal entre la lesión tisular y el dolor provocado, debido a un funcionamiento anormal del sistema nociceptivo. Este dolor no solo puede ser un síntoma de enfermedades de tipo neurológico, sino que puede estar relacionado con otro tipo de enfermedades como por ejemplo la neuralgia del trigémino o el dolor del miembro fantasma. Una de las características más típicas asociadas a este dolor neuropático es la **alodinia**, que consiste en la percepción anormal de un dolor provocado por un estímulo que en condiciones fisiológicas resultaría indoloro, como por ejemplo, dolor por el roce con la ropa sobre una zona con neuralgia post-herpética (Merskey, 2002).

Por otro lado, el **dolor nociceptivo**, también denominado dolor normal o fisiológico, aparece como consecuencia de la aplicación de estímulos que producen daño o lesión de órganos somáticos o viscerales y, siempre se debe a la activación del sistema sensorial encargado de su transmisión. Este tipo de dolor tiene una importante función evolutiva, ya que advierte al organismo de un daño inminente cumpliendo además una misión protectora.

Dependiendo del lugar de origen se distingue entre dolor somático y visceral. El **dolor somático** procede de estímulos somáticos superficiales o profundos que activan los nociceptores transmitiendo la señal dolorosa a través de los nervios somáticos. Se caracteriza por ser un dolor bien localizado y que no suele acompañarse de síntomas vegetativos como náuseas o vómitos. Se subdivide a su vez, en **dolor superficial** (cutáneo) cuando la lesión causante del dolor se localiza a nivel de la piel, mucosas o el tejido subcutáneo y, en **dolor profundo** si se origina en músculos, huesos, ligamentos y/o articulaciones.

A diferencia del anterior, el **dolor visceral** es un dolor sordo, difuso y mal localizado, que afecta a órganos internos, aunque no todas las vísceras son sensibles al dolor. Con frecuencia es un dolor de tipo referido, es decir, se localiza en una parte del organismo distante de la víscera que lo origina, por ejemplo el dolor que aparece en la extremidad superior izquierda cuando se padece una angina de pecho. Además suele acompañarse con frecuencia por una intensa respuesta refleja motora y con la aparición de múltiples síntomas vegetativos (Aliaga et al., 1995; Kandel et al., 2001).

1.3.- Nociceptores. Fases del proceso nociceptivo.

Entre el tejido dañado y la percepción de dicho daño se producen una serie de eventos neurofisiológicos que colectivamente comprenden el proceso de **nocicepción**, en el que participan tanto el sistema nervioso periférico como el sistema nervioso central (principalmente el tálamo y el córtex cerebral).

La sensación dolorosa se inicia tras la activación, por estímulos físicos o químicos, de las terminales periféricas de un grupo de neuronas sensoriales primarias de alto umbral, conocidas como **nociceptores**, que se activan por estímulos capaces de causar un daño tisular (ver **figura 1**). Histológicamente, los nociceptores son las terminaciones periféricas de una neurona bipolar, también llamada primera neurona, cuyo cuerpo neuronal o soma se encuentra en el **ganglio raquídeo de la raíz dorsal o DRG** (en inglés, *dorsal root ganglion*) y cuyo axón penetra en el asta dorsal de la médula espinal. Esta primera neurona se bifurca en dos ramas, una se dirige a la periferia innervando dermis, epidermis y vísceras y la otra hace sinapsis en el asta dorsal de la médula (ver **figura 2**). A nivel funcional, los nociceptores son fibras nerviosas periféricas libres que poseen un alto umbral de respuesta, cuya característica primordial es la de poder diferenciar un estímulo inocuo de uno potencialmente dañino (Heppelmann et al., 1991; Kandel et al., 2001; Julius and Basbaum, 2001).

Los nociceptores se clasifican de acuerdo al tipo de vías de conducción por las que se produce la transmisión de la información (**figura 1**):

- **Nociceptores A δ** : son las terminaciones sensoriales de las fibras mielínicas de diámetro medio, con velocidades de conducción rápidas (5-25 m/s).
- **Nociceptores C**: son las terminaciones nerviosas de fibras aferentes amielínicas de diámetro pequeño, con velocidades de conducción lentas (inferiores a 1.5 m/s).

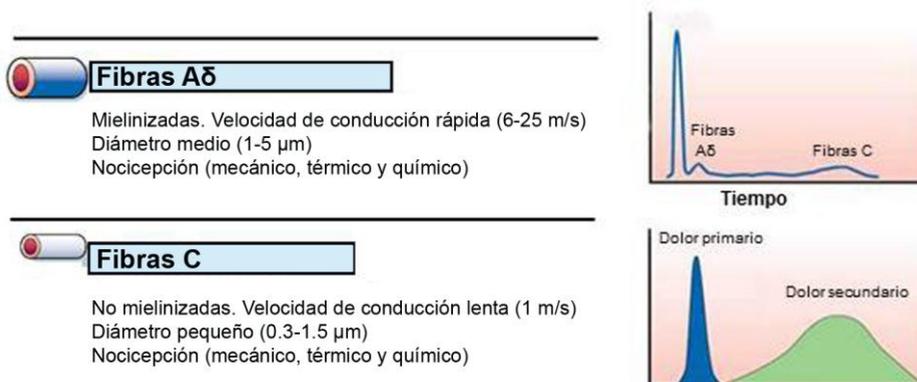


Figura 1.- Los nociceptores son las terminaciones nerviosas de las fibras de tipo A δ y C. Ambos tipos de fibras poseen características bien diferenciadas y participan en distintos tipos de dolor (Julius and Basbaum, 2001).

Las fibras A δ median el dolor primario, que se caracteriza por ser agudo, rápido y brusco, mientras que las fibras C intervienen en el dolor secundario, que es difuso, apagado y más retrasado a nivel temporal. Ambos tipos de fibras son nociceptores polimodales, ya que se estimulan indistintamente por estímulos nocivos de tipo mecánico, térmico y/o químico (Williams et al., 1999; Julius and Basbaum, 2001).

Como muestra la **figura 2**, el proceso nociceptivo comprende cuatro fases bien definidas: transducción, transmisión, modulación y percepción. La **transducción** es el proceso mediante el cual los estímulos nocivos periféricos son

INTRODUCCIÓN

convertidos en estímulos eléctricos, generándose un potencial de acción. Seguidamente, en la fase de **transmisión** ese potencial de acción se propaga de manera centrípeta y ascendente a través de las vías del sistema nervioso periférico y del sistema nervioso central hacia la corteza cerebral. Los impulsos dolorosos se transmiten a través de las vías aferentes primarias (fibras A δ y C), que penetran en la médula por el asta posterior, donde se produce la sinapsis con la segunda neurona (en la médula espinal). Estas segundas neuronas dan origen a los haces ascendentes, entre los que destaca el haz espinotalámico.

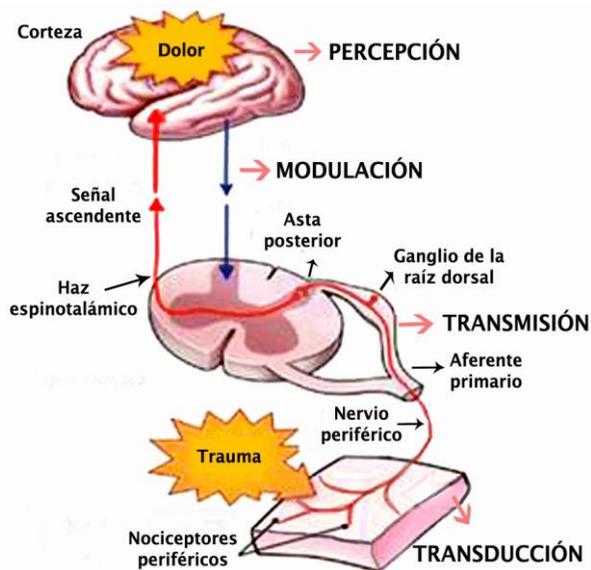


Figura 2.- Fases y vías implicadas en el proceso de nocicepción. Consta de cuatro fases: transducción, transmisión, modulación y percepción. Éstas engloban desde la activación de los nociceptores tras producirse un daño tisular o trauma hasta que se percibe dicho daño o dolor a nivel de corteza cerebral (Kehlet and Dahl, 1993).

Durante la fase de **modulación**, también llamada fase de anti-nocicepción, los sistemas analgésicos endógenos son capaces de modificar la transmisión del impulso nervioso.

Finalmente, en la fase de **percepción** los tres procesos anteriores interactúan con la psicología del paciente para crear la experiencia emocional, y como tal subjetiva, que se conoce como dolor. Estas cuatro fases están íntimamente relacionadas y se realizan de forma simultánea (Heppelmann et al., 1991; Julius and Basbaum, 2001).

2.- Receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1) o receptor de capsaicina.

La clonación y el análisis funcional del receptor de capsaicina o de vanilloides tipo 1 o **TRPV1** (en inglés, *transient receptor potential vanilloid 1*), un miembro de **la superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRP)**, permitió describir por primera vez a nivel molecular cómo las neuronas sensoriales eran capaces de detectar cambios de temperatura (Caterina et al., 1997), y a comprender, al menos parcialmente, los mecanismos implicados en el proceso de termosensación (Clapham et al., 2001; Montell, 2001; Venkatachalam and Montell, 2007). En estas neuronas nociceptivas, TRPV1 actúa como un integrador de estímulos nocivos de tipo químico y térmico, por ello se le considera el **nocisensor polimodal** por excelencia (Holzer, 2008).

La identificación de TRPV1 también supuso un importante avance en la comprensión de los mecanismos implicados en el proceso de inflamación neurogénica, ya que posee un papel clave en la sensibilización central y periférica que se desarrolla después de producirse un proceso inflamatorio (Davis et al., 2000; Caterina and Julius, 2001). Estos procesos en los que participa se desarrollarán a continuación.

2.1.- Superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRPs).

El canal *trp* de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es considerado fundador de esta superfamilia de canales catiónicos (Cosens and Manning, 1969). Desde entonces, han sido clonados más de 30 miembros que comprenden la superfamilia de receptores TRPs (Clapham et al., 2001).

Como fruto de las diversas investigaciones fueron apareciendo canales tanto homólogos como ortólogos en vertebrados, componiéndose de esta forma esta superfamilia que se muestra en el árbol filogenético de la **figura 3** (Pedersen et al., 2005; Montell, 2005).

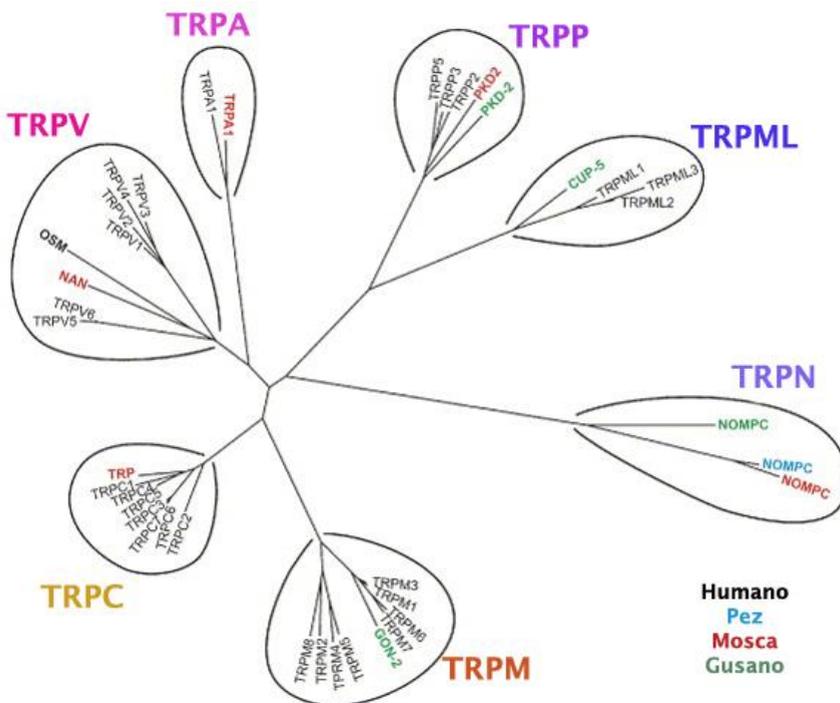


Figura 3.- Árbol filogenético de la superfamilia de receptores TRPs. Muestra las 7 subfamilias y sus miembros en las diferentes especies (humano, pez, mosca y gusano): **TRPC** (clásica), **TRPM** (melastina), **TRPV** (vanilloide), **TRPA** (anquirina), **TRPN** (en inglés, *no mechanoreceptor potencial C*), **TRPP** (policistina) y **TRPML** (mucopolipina) (Pedersen et al., 2005).

Asimismo, ha sido posible caracterizar los diferentes papeles que ejercen estos receptores en gran variedad de organismos multicelulares, incluyendo humanos, ratones, insectos, gusanos, peces cebra y levaduras. Los canales TRP actúan como sensores celulares ya que responden a gran variedad de estímulos como temperatura, osmolaridad, gusto, tacto, feromonas o dolor, llevando a cabo funciones muy diversas que varían según la especie (Clapham, 2003).

Todos ellos son canales iónicos cuya permeabilidad a los diferentes cationes monovalentes y divalentes varía considerablemente entre las distintas isoformas.

Basándose en su homología de secuencia esta superfamilia se divide en 7 subfamilias: familia **TRPC** (canónica o clásica, por ser la fundadora) formada por 7 canales diferentes (TRPC1-7), familia **TRPM** (melastina) formada por 8 miembros (TRPM1-8), familia **TRPV** (vanilloide) compuesta por 6 miembros (TRPV1-6), familia **TRPA** (anquirina) constituida por un único miembro (TRPA1), familia **TRPN** (NOMPC, en inglés, *no mechanoreceptor potential C*) que no se expresa en humanos y las familias **TRPP** (policistina) y **TRPML** (mucolipina), cada una de ellas formada por 3 miembros (TRPP2, 3 y 5 y TRPML1-3) (Clapham et al., 2001; Pedersen et al., 2005; Montell, 2005).

Estructuralmente todos los miembros son tetrámeros, en los que cada una de las subunidades presentan las siguientes características comunes: 6 segmentos transmembrana (S1-S6), un módulo del poro formado por los dominios S5 y S6 y el lazo entre éstos y ambos extremos amino- y carboxilo-terminales citoplasmáticos. Las 4 subunidades se ensamblan para formar homo- o heterotetrámeros, constituyendo de esta forma canales catiónicos no selectivos con elevada permeabilidad al calcio y baja dependencia al voltaje (Pedersen et al., 2005; Venkatachalam and Montell, 2007).

Dentro de los 28 miembros de la superfamilia de canales TRP destacamos un subgrupo de canales TRP sensibles a la temperatura o **termoTRPs**, que se encuentran directamente relacionados con mecanismos de termorregulación. En concreto, seis miembros (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM4 y TRPM5) son sensibles a temperaturas calientes o templadas y dos miembros (TRPA1 y

INTRODUCCIÓN

TRPM8) son activados por temperaturas frías (Jordt et al., 2003; Dhaka et al., 2006).

Como muestra la **figura 4**, entre todos ellos cubren un amplio rango de temperaturas que abarcan desde 10°C (TRPA1) a 53°C (TRPV2). Otra característica que comparten los termoTRPs es que son sensibles a gran variedad de productos naturales, la mayoría de ellos sustancias irritantes. En concreto, TRPA1 se activa por componentes de la canela, mostaza y ajo, TRPM8 responde al mentol y eucalipto, TRPV3 al alcanfor y orégano y finalmente TRPV1 responde a capsaicina, el principal componente de los chilis picantes (en inglés, *Capsicum*) y a sustancias tan variadas como el alcanfor o la alicina del ajo (Dhaka et al., 2006).

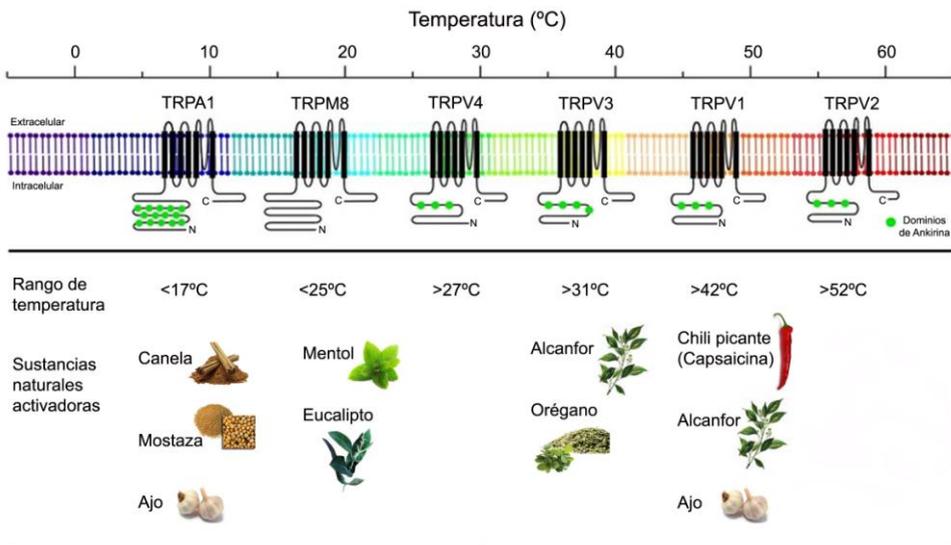


Figura 4.- Esquema del rango de temperaturas de activación de los canales termoTRPs. Estos canales son activados por temperaturas que abarcan desde 10°C hasta 53°C. También se representan algunas de las principales sustancias naturales cuyos componentes son activadores de estos canales (Jordt et al., 2003).

2.2.- Mecanismos de activación y estructura del receptor TRPV1.

El receptor TRPV1 fue identificado por primera vez en 1997 mediante una estrategia genómica de expresión-clonación a partir de una genoteca de DRGs de rata, usando como ligando su agonista capsaicina. Se trata de un canal catiónico no selectivo con elevada permeabilidad al Ca^{+2} (relación de permeabilidad $\text{PCa/PNa}=10$) y al Mg^{+2} ($\text{PMg/PNa}=5$). TRPV1 actúa como efector de las neuronas nociceptoras polimodales periféricas, ya que integra estímulos nocivos de tipo térmico y de tipo químico (Tominaga et al., 1998; Holzer, 2008).

Como muestra la **figura 5**, este receptor polimodal es capaz de responder a calor moderado, activándose a temperaturas $>42^{\circ}\text{C}$, a acidosis (pH ligeramente ácido ≤ 6) y a sustancias de tipo vanilloide como capsaicina o resiniferatoxina (RTX) (Tominaga and Tominaga, 2005). También se activa por anandamida (ligando del receptor cannabinoide), así como por diferentes sustancias proalgésicas como leucotrieno B4, NADA (N-araquidonil-dopamina), 12-HPETE (ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico) y otros derivados del ácido araquidónico (Welch et al., 2000; Caterina and Julius, 2001; Clapham et al., 2001). Recientemente, también se ha demostrado que determinados componentes presentes en sustancias naturales como el alcanfor (Xu et al., 2005) o la alicina del ajo (Macpherson et al., 2005) pueden activarlo, así como también sustancias tan diversas como el óxido nítrico (Yoshida et al., 2006) o péptidos procedentes del veneno de tarántula (Siemens et al., 2006). Además, determinados cationes extracelulares son capaces de modularlo (Ahern et al., 2005).

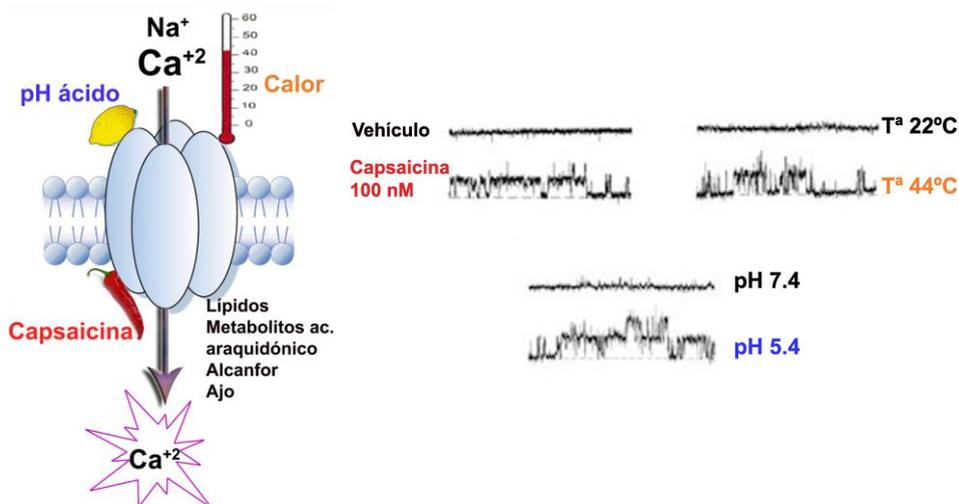


Figura 5.- El receptor TRPV1 actúa como un nocisensor polimodal. Representación de la estructura tipo homotetrámero del receptor y esquema de los diferentes mecanismos de activación del receptor. Se muestran registros de corrientes de TRPV1 activado por su agonista capsaicina 100 nM, por calor (temperatura 44°C) y por acidosis (pH 5.4) (Tominaga and Tominaga, 2005).

En la **figura 6** se muestra un esquema de una de las subunidades del homotetrámero, así como las diferentes regiones y secuencias de aminoácidos implicadas en diferentes funciones específicas del receptor TRPV1. En la figura es posible observar dónde se localizan los sitios de unión a capsaicina y a protones, los dominios relacionados con la oligomerización del receptor o con la interacción con otras proteínas, además de los sitios de fosforilación para las diferentes quinasas (Tominaga and Tominaga, 2005; Planells-Cases et al., 2005).

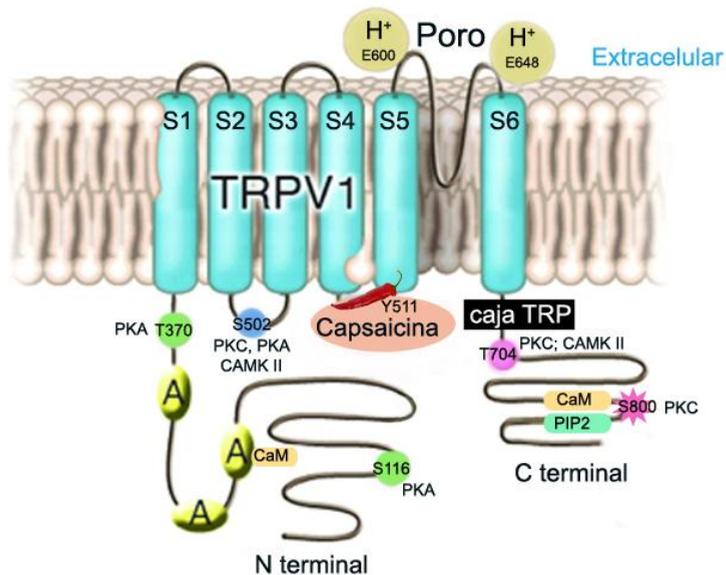


Figura 6.- Modelo estructural de una subunidad del tetrámero TRPV1. Se caracteriza por estar formado por 6 dominios transmembrana (S), entre S5 y S6 se forma el poro del canal, y por poseer dominios carboxilo- y amino-terminales intracelulares. En la figura se representan los sitios de unión a capsaicina y de activación por protones (H^+), además de los residuos susceptibles de ser fosforilados por PKA, PKC y CAMKII. Presenta varios dominios de anquirina (A) en la región amino-terminal y sitios de unión para calmodulina y PIP_2 , así como el dominio tipo TRP en el carboxilo-terminal. (T: treonina, S: serina, Y: tirosina, E: ácido glutámico) (Paus et al., 2006).

El dominio citosólico **carboxilo terminal** de TRPV1 contiene los dominios de unión a calmodulina (CaM) (Numazaki et al., 2003) y fosfoinosítidos (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, PIP_2) (Prescott and Julius, 2003), además de los sitios de fosforilación por proteína quinasa C (PKC) (S800 y T704) (Numazaki et al., 2002) y por calmodulina quinasa dependiente de calcio II (CAMKII) (T704). Próximo al segmento transmembrana S6, se encuentra el dominio tipo TRP, que contiene la denominada “caja TRP” (en inglés, *TRP box*). Este dominio TRP es clave en el proceso de tetramerización de las subunidades del receptor para formar un canal funcional (Garcia-Sanz et al., 2004; Valente et al., 2008).

En el dominio citosólico **amino terminal** de TRPV1 se encuentran los dominios de anquirina, con los que TRPV1 es capaz de interactuar con proteínas citosólicas (Morenilla-Palao et al., 2001), así como con la proteína del citoesqueleto tubulina (Goswami et al., 2004), con la proteína de membrana Pirt, relacionada con la unión a fosfoinosítidos (Kim et al., 2008), o con calmodulina (Rosenbaum et al., 2004). En este dominio amino terminal también se localizan diversos sitios de fosforilación por la proteína quinasa A (PKA), T370 o S116, implicada en el proceso de desensibilización del receptor TRPV1 (Bhave et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2005).

Recientemente, mediante la técnica de crio-microscopía electrónica (cryo-EM) empleando un nuevo detector de electrones, combinado con el uso de nuevos algoritmos de procesamiento de imágenes, se ha logrado determinar la estructura de TRPV1 a una resolución de 3.4 Å en el dominio de membrana, lo que ha permitido determinar estructuralmente no solo el esqueleto proteico sino también la ubicación de las cadenas laterales de los aminoácidos (Cao et al., 2013; Liao et al., 2013). La estructura de TRPV1 muestra una arquitectura tetramérica, con las cuatro subunidades idénticas organizadas simétricamente alrededor del poro central. La estructura de cada subunidad que han obtenido es muy parecida a la de los canales catiónicos dependientes de voltaje (VGICs, del inglés, *voltage-gated ion channels*).

Estos autores han demostrado que existe un amplio solapamiento de interacciones entre los dominios citosólicos, concretamente entre dos de las repeticiones de anquirina en la cola amino terminal de una subunidad con un dominio de hojas plegadas β en la cola amino y una región carboxilo terminal de otra subunidad, lo que implica interacciones intra- e inter-subunidades. Además, la nueva estructura indica que la caja TRP se encuentra estratégicamente situada para interactuar tanto con la pre-hélice S1 como con el lazo S4-S5 (en inglés, *S4-S5 linker*) mediante puentes de Hidrógeno. Este lazo S4-S5 es una hélice α que une dos dominios funcionales fundamentales: el dominio S1-S4, que en VGICs constituye el dominio del sensor de voltaje y que en TRPV1 contiene el sitio de unión de sustancias lipofílicas como los vanilloides, con el módulo S5-P-S6 del

dominio del poro. Esta íntima interacción entre la caja TRP con el lazo S4-S5 permitiría explicar el importante papel de esta caja TRP como modulador alostérico de varios estímulos en el proceso de activación del canal (Cao et al., 2013; Liao et al., 2013).

2.3.- Expresión tisular y diversidad funcional del receptor TRPV1 en condiciones fisiológicas y patológicas.

La expresión tisular del receptor TRPV1 fue inicialmente descrita en una subpoblación de neuronas de pequeño y medio diámetro de DRGs y ganglios del trigémino (TG), en el asta dorsal de la médula espinal y el núcleo caudal del trigémino espinal mediante técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ* (Caterina and Julius, 2001; Iida et al., 2005). Se observó que en los cultivos de DRGs más del 50% de las neuronas expresaban TRPV1 y que la mayoría de éstas también respondían a NGF (factor de crecimiento nervioso) y expresaban los neuropéptidos sustancia P y CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Szallasi and Blumberg, 1999). Posteriormente, se determinó que el receptor TRPV1 también se expresaba en neuronas del hipotálamo (Sasamura et al., 1998), en astrocitos (Doly et al., 2004), así como en otros tipos celulares no neuronales (McGarvey et al., 2013; Yang et al., 2013).

El papel esencial de TRPV1 en el proceso de nocicepción es ampliamente aceptado dado que los ratones que carecen de TRPV1 (TRPV1^{-/-}) presentan deficiencias en los procesos de **nocicepción e inflamación** (Davis et al., 2000; Caterina et al., 2000; Caterina and Julius, 2001), apoyando la hipótesis de que TRPV1 es esencial en la nocicepción termal aguda y en la hiperalgesia tras producirse un daño tisular (Julius and Basbaum, 2001). De hecho, algunos agonistas del receptor se han empleado como potentes analgésicos (Mason et al., 2004).

El receptor TRPV1 se ha relacionado con una amplia variedad de patologías que en su gran mayoría cursan con procesos inflamatorios (Nilius et al., 2007; Cortright et al., 2007). Diversos autores han analizado la expresión de TRPV1 en diferentes tejidos, comparándola en condiciones fisiológicas y en determinados procesos patológicos (Nagy et al., 2004; Nilius et al., 2007).

En la **piel**, se han detectado células TRPV1 positivas (TRPV1+) asociadas a los corpúsculos de Meissner, concretamente en los queratinocitos de la dermis y epidermis (Pare et al., 2001; Southall et al., 2003). Se cree que TRPV1 estaría participando en el proceso de diferenciación y proliferación de los queratinocitos, así como en la regulación de los inhibidores del crecimiento endógeno del pelo, en la transmisión del dolor a nivel cutáneo y en la iniciación del picor (Inoue et al., 2002).

Más recientemente, se ha demostrado la expresión de TRPV1 en los **mastocitos**, donde participa en la liberación de determinados mediadores como histamina y diversas proteasas en las terminaciones sensoriales (Biro et al., 1998; Stander et al., 2004).

TRPV1 también se expresa en el tejido visceral del **tracto gastrointestinal** dentro del plexo mientérico y submucoso. Aunque la capsaicina no actúa directamente desensibilizando las células del epitelio gástrico, la activación de determinadas terminaciones aferentes primarias que expresan TRPV1 parece que aumenta las barreras protectoras del estómago y duodeno (Akiba et al., 2001). Concretamente, la capsaicina parece promover una acción vasorelajante en el endotelio del estómago mediada por la liberación de CGRP (Holzer and Guth, 1991) que induce la producción de prostaglandinas, con una función protectora en el epitelio estomacal (Harada et al., 2003). En condiciones patológicas, TRPV1 se ha relacionado con la hipermotilidad del tracto gastrointestinal, en el dolor abdominal asociado con desórdenes funcionales del intestino, así como en el componente neurogénico de la pancreatitis (Holzer and Holzer-Petsche, 1997; Geppetti and Trevisani, 2004; Holzer, 2004).

En la **vejiga urinaria**, el receptor TRPV1 funcional se expresa en las capas superficiales y basales del uroepitelio y parece estar implicado en el desarrollo del reflejo de micción en condiciones normales y patológicas (Birder et al., 2001; Birder et al., 2002). También se ha demostrado que la expresión de TRPV1 aumenta en el tejido uroendotelial cuando se produce alguna patología inflamatoria relacionada con el aparato urinario. De hecho, se han empleado los agonistas de TRPV1 (capsaicina y RTX) para tratar los síntomas causados por la irritación de vejiga (Apostolidis et al., 2005).

A nivel del **sistema respiratorio**, el canal TRPV1 se expresa en las fibras sensitivas que inervan los pulmones, en el epitelio pulmonar y en los bronquios (Yang et al., 2006). La activación de estas fibras provoca broncoconstricción, secreción de moco, bradicardia e irritación de las vías aéreas, además de liberación de CGRP al ser estimuladas (Lundberg and Saria, 1987). Existen diversas publicaciones que establecen la conexión entre la activación de TRPV1 en las vías respiratorias y el asma (Herd et al., 1995). La capsaicina es capaz de estimular específicamente las fibras C de las vías respiratorias, por ello juega un papel clave en la generación de la tos no productiva (Karlsson, 1993). Bajo condiciones normales, estas fibras C no expresan sustancia P, pero tras la inflamación desencadenada por una alergia o una infección viral comienza a producirse (Hunter et al., 2000; Carr et al., 2002).

A nivel del **sistema nervioso central**, diversos estudios han demostrado que la aplicación de capsaicina en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio provoca la liberación de dopamina y, por el contrario, la yodo-resiniferatoxina, un antagonista de TRPV1, inhibe esta liberación. Sin embargo, el tratamiento con altas dosis de capsaicina en neuronas del ganglio basal provoca su muerte celular y la aplicación de un antagonista de TRPV1 impide este proceso (Kim et al., 2005). Basándose en estos estudios, se ha relacionado el canal TRPV1 con la transmisión dopaminérgica y por extensión con enfermedades como la **esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson**. También se ha determinado que los pacientes con esquizofrenia parecen presentar menor sensibilidad al dolor, lo

que se ha correlacionado con una menor expresión de TRPV1 en las fibras nerviosas aferentes (Waldo, 1999).

A nivel del **sistema cardiovascular**, el receptor TRPV1 se expresa en fibras sensoriales simpáticas cardíacas, desempeñando un papel fundamental en determinadas afecciones cardíacas que cursan con dolor e inflamación, como la angina de pecho (Zvara et al., 2006; Huang et al., 2009). En este sentido, la sensibilización y activación del receptor TRPV1 en las fibras nerviosas que inervan el corazón, desencadenan la liberación de neuroquinina A y CGRP desde la terminal nerviosa, dos sustancias que poseen efectos protectores, por ello en este caso el receptor TRPV1 ejerce un papel cardioprotector (Strecker et al., 2006).

Actualmente existen diversos estudios que relacionan el receptor TRPV1 con el **cáncer**. El cáncer óseo promueve acidosis en el hueso, lo que conlleva a la activación de receptores TRPV1 presentes en las fibras que inervan el hueso (Nagae et al., 2007), junto con un aumento en la expresión del canal en distintas subpoblaciones de DRGs (Niiyama et al., 2007). En modelos *in vivo* de cáncer óseo, los antagonistas de TRPV1 provocan una importante disminución de la respuesta al intenso dolor asociado a este cáncer (Ghilardi et al., 2005), por ello, se están desarrollando tratamientos analgésicos para el osteosarcoma empleando TRPV1 como diana farmacológica. En estudios realizados con ratones TRPV1^{-/-} se ha observado que el progreso del cáncer de piel es mucho más rápido y agresivo que en ratones silvestres (Bode et al., 2009). Dado que TRPV1 interacciona con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), disminuyendo su expresión, se ha sugerido que TRPV1 podría ser un supresor tumoral.

En conjunto, hemos revisado que TRPV1 se expresa en una amplia diversidad de tejidos, participando en el proceso nociceptivo a nivel del sistema nervioso y ejerciendo multitud de funciones en diferentes órganos de tipo no sensorial.

3.- Modulación de la actividad del receptor TRPV1: mecanismos de sensibilización y desensibilización.

3.1.- Inflamación neurogénica. Sensibilización periférica.

En condiciones normales, las neuronas sensoriales primarias permanecen quiescentes. Sin embargo, como muestra la **figura 7**, al producirse un daño tisular causado por un traumatismo o una lesión, o bien como consecuencia de un proceso inflamatorio, infeccioso o isquémico, se activan los nociceptores sensoriales periféricos. Estos nociceptores son capaces de liberar localmente numerosos mediadores químicos pro-algésicos como histaminas, serotoninas, bradiquininas, prostaglandinas, citoquinas, factores de crecimiento, etc. Todos ellos contribuyen a potenciar el proceso de **inflamación local**.

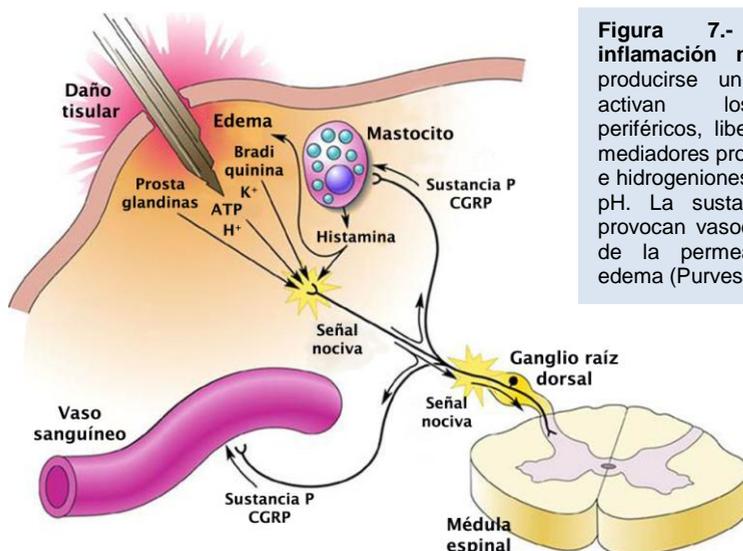


Figura 7.- Proceso de inflamación neurogénica. Tras producirse un daño tisular se activan los nociceptores periféricos, liberándose diferentes mediadores pro-algésicos, K^+ , ATP e hidrogeniones que disminuyen el pH. La sustancia P y CGRP, provocan vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y edema (Purves et al., 2004).

La respuesta inflamatoria también altera el pH, apareciendo acidosis en la zona inflamada. A su vez, las células lesionadas producen ATP, se libera K^+ al medio extracelular y se activa el sistema inmunitario, principalmente los

mastocitos, que junto con la liberación de los neuropéptidos sustancia P y CGRP, desencadenan la aparición de vasodilatación, extravasación plasmática y edema. A su vez, estos dos neuropéptidos actúan sobre distintos tipos celulares (células endoteliales, mastocitos, células inmunes y arteriolas) retroalimentando el proceso. Bajo estas condiciones inflamatorias, estos factores actúan de forma simultánea y sinérgica generando lo que se conoce como “**sopa inflamatoria**” (Julius and Basbaum, 2001).

Cuando se produce una sobrestimulación de los nociceptores periféricos, debido a un traumatismo, lesión tisular, inflamación, infección o isquemia, se produce la inflamación local descrita anteriormente, que se conoce como **inflamación neurogénica**. Este proceso se acompaña de un aumento de la sensibilidad y respuesta de los nociceptores periféricos, que conduce a un descenso del umbral de activación de estas terminales nerviosas periféricas y/o un incremento de la magnitud de su respuesta, este fenómeno es conocido como **sensibilización periférica**. Según el tipo de mecanismo de sensibilización inflamatoria aparecerán distintos signos clínicos, diferenciando entre **hiperalgesia**, respuesta exagerada frente a un estímulo doloroso débil, o **alodinia** cuando un estímulo no nocivo provoca una respuesta dolorosa. El principal signo clínico de la inflamación neurogénica es la aparición de **hiperalgesia térmica** (Williams et al., 1999; Hill, 2001).

Cabe destacar que existen evidentes analogías entre la sensibilización nociceptiva periférica y la **potenciación a largo plazo o LTP** a nivel del sistema nervioso central durante los procesos de memoria y aprendizaje, de hecho se cree que la sensibilización es esencial en el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico (Ji and Woolf, 2001; Ji et al., 2003).

En el caso de TRPV1, en condiciones fisiológicas su actividad es baja y los diferentes activadores del canal lo activan con poca potencia y baja eficacia. Sin embargo, durante la inflamación se potencia la función de TRPV1 por la acción simultánea de las sustancias pro-inflamatorias liberadas, lo que desencadena un incremento de la excitabilidad de los nociceptores. Estos mediadores pro-algésicos potencian sinérgicamente la actividad de TRPV1 a través de diferentes vías:

mediante fosforilación se disminuye el umbral de activación por temperatura del receptor desde 42°C a 36°C, además se reclutan más canales activos a la membrana plasmática y se producen diferentes modificaciones a largo plazo en la transcripción y traducción (Planells-Cases et al., 2005; Planells-Cases et al., 2011). Por lo tanto, la sensibilización inflamatoria con la participación del receptor TRPV1 parece ser clave en el proceso de **hiperalgesia termal** (Davis et al., 2000; Cortright et al., 2007; Patapoutian et al., 2009).

3.2.- Desensibilización. Tipos.

La presencia constante de estímulos nocivos de tipo químico o físico provoca la activación repetida y continuada de los nociceptores, que desemboca en una disminución de su respuesta de forma parcial o total, es decir, se vuelven refractarios, siendo incapaces de responder a nuevos estímulos. En el caso del receptor TRPV1, su agonista capsaicina es capaz de provocar una excitación inicial de las neuronas nociceptivas seguida de un periodo refractario, en el cual las neuronas no solo no responden a capsaicina sino a ningún otro estímulo nocivo. Este estado refractario se conoce como **desensibilización**, un proceso con multitud de mecanismos moleculares implicados y que clínicamente se manifiesta como **analgesia o anestesia**. Por ello, la regulación o modulación de la desensibilización de TRPV1 podría ser una importante diana terapéutica.

El receptor TRPV1 es altamente permeable al Ca^{+2} extracelular (Caterina et al., 1997). De hecho, se ha descrito que los cambios funcionales y morfológicos inducidos por capsaicina en las neuronas surgen como consecuencia del influjo de Ca^{+2} a través del canal TRPV1 (Szallasi and Blumberg, 1999). Diversos autores han demostrado que el proceso de desensibilización del receptor TRPV1 depende no solo de la presencia y entrada de Ca^{+2} , sino del tiempo de exposición al estímulo (Cholewinski et al., 1993; Koplak et al., 1997).

Se puede distinguir entre **desensibilización aguda** y **taquifilaxia**, ambos procesos dependientes de Ca^{+2} . Mientras que la desensibilización aguda se caracteriza por un descenso de la actividad del canal durante la estimulación, en la

taquifilaxia se produce una sucesiva disminución de la respuesta al aplicar estímulos breves y repetidos, que podría asociarse, al menos en parte, a un fallo en la recuperación del canal desde la fase de desensibilización aguda. Estos procesos pueden durar desde minutos a horas y por ello deben diferenciarse claramente de la conocida como **desensibilización a largo plazo**, que puede durar desde semanas a meses e incluso volverse irreversible, reflejando un estado de “**defuncionalización**” de las vías neuronales (Liu and Simon, 1996).

Se han propuesto múltiples vías de señalización celular como las responsables del proceso de desensibilización aguda del receptor TRPV1. Siguiendo el orden cronológico desde que fueron propuestas, destacaríamos tres posibles mecanismos implicados que posteriormente se detallarán por separado: **1) desfosforilación del canal por calcineurina (CN) o proteína fosfatasa de tipo 2B (PP2B)** (Docherty et al., 1996; Bhave et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2003; Jung et al., 2004; Mandadi et al., 2004; Mohapatra and Nau, 2005; Mandadi et al., 2006), **2) interacción con CaM** (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004; Lishko et al., 2007; Chaudhury et al., 2011) y **3) depleción de PIP2 en la membrana plasmática** (Liu et al., 2005; Stein et al., 2006; Lukacs et al., 2007; Qin, 2007; Klein et al., 2008; Yao and Qin, 2009). No existe consenso acerca de qué mecanismo o mecanismos están implicados en la desensibilización aguda, de hecho parece que la hipótesis más aceptada es que varios de ellos o todos participan simultáneamente. También se ha sugerido que la desensibilización aguda en lugar de ser un proceso de pérdida de función del canal, sería más bien un cambio en su sensibilidad (Novakova-Tousova et al., 2007; Yao and Qin, 2009).

Al contrario de lo que sucede en la desensibilización aguda, las vías implicadas en la **desensibilización a medio-largo plazo** del receptor han sido muy poco estudiadas hasta el momento. Por este motivo, en este trabajo nos propusimos analizar los efectos provocados por la exposición prolongada al agonista capsaicina como modelo de desensibilización a medio-largo plazo de los nociceptores polimodales. Basándonos en estudios realizados en otras familias de receptores muy diferentes, como la del receptor activado por proteasas tipo 2 (PAR2), donde la exposición a su agonista desencadena la activación y posterior

desensibilización e internalización del receptor (Ricks and Trejo, 2009) o el caso de los receptores GABA_B, en el que los procesos de internalización, reciclaje y degradación lisosomal se ven acelerados tras exposición a su agonista (Grampp et al., 2008).

Entre los objetivos del presente estudio nos planteamos determinar si entre los efectos de la exposición prolongada a capsaicina se desencadenaba la internalización del receptor TRPV1, contribuyendo de esta manera a su desensibilización.

3.3.- Mecanismos moleculares implicados en la desensibilización aguda del receptor TRPV1.

3.3.1.- Equilibrio entre los estados de fosforilación-desfosforilación.

La actividad del receptor TRPV1 se encuentra estrechamente regulada por un equilibrio entre sus estados de fosforilación y desfosforilación, controlado por diferentes proteínas quinasas y fosfatasa, respectivamente. En general, la fosforilación de TRPV1 lo sensibiliza frente a estímulos activadores, mientras que la desfosforilación lo desensibiliza, volviéndolo menos vulnerable a nuevos estímulos.

3.3.1.1.- Fosforilación: implicación en la sensibilización del receptor.

En la secuencia de TRPV1 se han predicho un importante número de sitios potenciales de fosforilación asignados para las diferentes **proteínas quinasas PKA, PKC y/o CAMKII**, posteriormente verificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro* con fragmentos aislados del receptor. Como ya avanzamos en el **apartado 2.2** y en la **figura 6**, la S502 es un sitio no selectivo que puede ser fosforilado por múltiples quinasas (PKC, PKA y CAMKII) (Numazaki et al., 2002; Bhave et al., 2002; Jung et al., 2004). Además, en el extremo amino terminal del receptor se encuentran varios sitios para PKA como la S116 y T370 (Bhave et al.,

2002; Mohapatra and Nau, 2003), mientras que la S800 del extremo amino terminal es una diana de PKC (Numazaki et al., 2002).

Tanto PKA como PKC se han implicado en procesos de **sensibilización** de los nociceptores por mediadores pro-inflamatorios. Ensayos realizados con forbol éster 12-miristato 13-acetato (PMA), un activador clásico de **PKC**, se observó una disminución del umbral de activación del receptor TRPV1 por calor, por debajo de la temperatura corporal, y por agonistas demostrando que PKC es capaz de modificar directamente el canal haciéndolo más sensible (Premkumar and Ahern, 2000; Vellani et al., 2001; Numazaki et al., 2002).

Numerosos mediadores pro-inflamatorios que actúan a través de sus receptores específicos (como las proteasas a través de sus receptores activados por proteasas, PAR, ATP a través de los receptores purinérgicos, endotelinas a través del receptor ETAR o bradiquininas a través de los receptores B1 y B2) (Cesare and McNaughton, 1996) desencadenan la activación de **PKC** para posteriormente sensibilizar TRPV1 (Premkumar and Ahern, 2000) (ver **figura 8**). Diversos estudios han demostrado que la isoforma de PKC activada es la PKC- ϵ (Cesare et al., 1999).

Otros sustancias que potencian la actividad de TRPV1, como las prostaciclina, la serotonina o la prostaglandina PGE₂, lo hacen mediante la fosforilación por **PKA** (ver **figura 8**), actuando a través de receptores acoplados a proteínas G α_s y de la síntesis de AMPc mediada por adenilato ciclasa (AC) (Lopshire and Nicol, 1998).

3.3.1.2.- Desfosforilación: implicación en la desensibilización del receptor.

Docherty y colaboradores, mediante estudios de desensibilización de las corrientes provocadas por capsaicina en nociceptores, demostraron que la inhibición de proteínas quinasas no influía en la desensibilización del canal, ni tampoco lo hacía la inhibición selectiva de las proteínas fosfatasa 1 y 2A (Docherty et al., 1996).

Bhave y colaboradores demostraron que el canal en reposo estaba fosforilado principalmente en la S116 y en S502, dianas de **PKA**, y que la desfosforilación de estos sitios desencadenaba la **desensibilización** del receptor (Bhave et al., 2002). Además, observaron que el **mutante S116D**, que mimetiza el estado fosforilado del receptor, presentaba una reducida desensibilización. Estos datos permitieron concluir que la fosforilación del canal por PKA evita su desensibilización, mientras que la desfosforilación es necesaria pero no suficiente para desensibilizar el canal. En consonancia con las observaciones anteriores, Mohapatra y colaboradores determinaron que la modificación postraduccional de las dianas de PKA, pero no las de PKC, afectaban la desensibilización aguda del receptor (Mohapatra and Nau, 2003). Finalmente, se demostró que la inhibición de **la fosfatasa 2B o calcineurina** reducía la **desensibilización** del canal TRPV1 (Mohapatra and Nau, 2005).

En conjunto, estos estudios consensuaron que los sitios de fosforilación por PKA del canal están selectivamente implicados en la desensibilización y son dianas para la desfosforilación por calcineurina. No obstante, permanece todavía sin esclarecer el papel que desempeña la desfosforilación de cada sitio diana en TRPV1 en el proceso global de desensibilización.

3.3.1.3.- Refosforilación: implicación en la resensibilización del receptor.

La **resensibilización del receptor** por capsaicina es posible tras el tratamiento con el forbol éster PMA a través de la fosforilación por **PKC** de las serinas S502 y S800 de TRPV1 (Mandadi et al., 2004; Mandadi et al., 2006). Asimismo se ha determinado que tras la desensibilización del receptor, éste puede reactivarse cuando se aplican **concentraciones supramáximas de sus agonistas**. Como consecuencia, se ha propuesto que la desensibilización/resensibilización supone una alteración de la EC_{50} (concentración capaz de producir un 50% de la respuesta máxima) de los agonistas del receptor (Novakova-Tousova et al., 2007; Yao and Qin, 2009).

En cuanto al papel de otras quinasas en la resensibilización del receptor TRPV1 cabe destacar que la activación de **CaMKII** (cuyos sitios diana son S502 y T704) junto con CaM es capaz de recuperar la respuesta a capsaicina del canal (Jung et al., 2004).

3.3.2.- Interacción con calmodulina.

Calmodulina (CaM) es capaz de interactuar, en presencia de Ca^{+2} , con el receptor TRPV1 a través de su dominio carboxilo terminal. La delección de este dominio de interacción con CaM en el receptor se traduce en una reducida desensibilización aguda, por lo que se sugirió que CaM estaría regulando la **desensibilización del receptor** (Numazaki et al., 2003) (ver **figura 8**).

Posteriormente, Rosenbaum y colaboradores detectaron un sitio de interacción adicional para CaM en el extremo amino terminal del receptor TRPV1 (Rosenbaum et al., 2004). Curiosamente este sitio adicional coincidía con el sitio de unión de **ATP**, funcionalmente la unión de ATP potenciaba la actividad del canal, ejerciendo justo el efecto contrario a la unión de CaM a TRPV1 (Lishko et al., 2007). Estos autores mediante el tratamiento con un anticuerpo **anti-CaM**, también demostraron que inhibiendo la unión de CaM se reducía tanto la taquifilaxia como la desensibilización aguda.

Recientemente, se ha descubierto que la unión de **AKAP150** (proteína de anclaje a quinasa 79/150) al receptor TRPV1 produce un efecto similar al que sucede con ATP (Chaudhury et al., 2011).

3.3.3.- Depleción de PIP2.

Los primeros datos acerca de la implicación de **PIP2** en la desensibilización de TRPV1 fueron obtenidos mediante inhibición de la síntesis o por depleción de PIP2 de la membrana plasmática (Liu et al., 2005). De hecho, al inhibir su síntesis se bloquea la recuperación del canal después de

desensibilizarlo, siendo necesario cierto nivel de PIP₂ para que funcione correctamente (Prescott and Julius, 2003) (**figura 8**).

Posteriores estudios corroboraron este mecanismo y demostraron que la aplicación exógena de PIP₂ era capaz de activar directamente el canal, produciéndose la depleción de PIP₂ tanto durante la activación del canal como en su desensibilización (Lukacs et al., 2007; Klein et al., 2008). De hecho, el propio influjo de Ca⁺² a través del canal permite la depleción de PIP₂ en pocos segundos (Qin, 2007; Yao and Qin, 2009).

En la **figura 8** se muestra un resumen de la implicación de los mecanismos de fosforilación-desfosforilación-refosforilación relacionados con los procesos de sensibilización-desensibilización-resensibilización del receptor TRPV1, así como las diferentes quinasas, fosfatasa y demás moléculas implicadas.

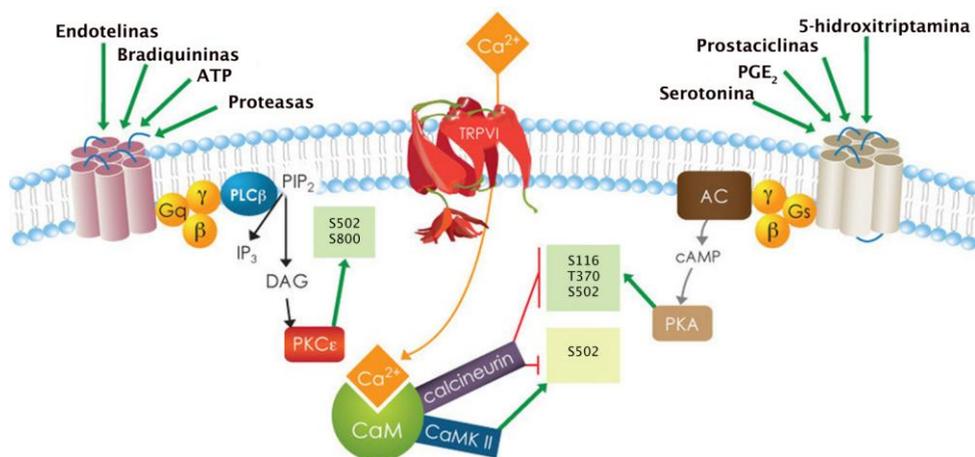


Figura 8.- Papel de la fosforilación en la sensibilización-desensibilización del canal TRPV1.

Varios agonistas (bradiquininas, endotelinas, serotonina, PGE₂ etc.), actuando sobre sus respectivos receptores acoplados a proteínas G, son capaces de activar diferentes quinasas como PKC o PKA, desencadenando la fosforilación y posterior sensibilización del receptor TRPV1 a sus activadores (calor, ácido, agonistas químicos). La activación de TRPV1 permite el flujo de Ca⁺² a su través, esto activa CaM que promueve la desfosforilación del receptor y su desensibilización. A su vez CaM también puede inducir la fosforilación de TRPV1 a través de la quinasa CAMKII. Figura adaptada de *TRPV1: Pain, peppers and Prostaglandins* por Brock, T.G. Cayman Chemicals.

3.4.- Funciones fisiológicas del mecanismo de desensibilización.

La desensibilización es una característica común a muchos canales iónicos, y generalmente se le atribuye una función de **protección frente a la toxicidad celular**. En el caso de TRPV1, debido a su elevada permeabilidad a Ca^{+2} , su desensibilización es esencial para prevenir una sobrecarga de este ión (Szallasi and Blumberg, 1999).

La mayoría de los canales se recuperan del estado desensibilizado inmediatamente después de que el estímulo desaparezca. Por ello, es posible que la prolongada desensibilización característica de TRPV1 pudiera concederle alguna función fisiológica adicional no determinada. Diversos autores han observado que el canal después de desensibilizarse permanece funcional, y aunque no responde a concentraciones saturadas de agonista sí lo hace a concentraciones supramáximas, muy superiores a las saturadas (Novakova-Tousova et al., 2007; Yao and Qin, 2009). Esta propiedad hace pensar que se está produciendo una **adaptación** del receptor, asociada a un cambio de sensibilidad al estímulo activador. La adaptación es una característica esencial para otros receptores sensoriales, como los implicados en la visión o el oído, y en el caso de receptores de dolor como TRPV1 podría explicar la analgesia alcanzada tras la aplicación tópica de capsaicina (Mason et al., 2004; Vyklicky et al., 2008).

4.- Regulación del tráfico intracelular de canales iónicos.

El flujo de iones a través de la membrana plasmática viene determinado no solamente por la apertura y cierre de los canales iónicos, sino también por el número de canales iónicos activos presentes en la superficie celular. De hecho, la regulación de la población de canales iónicos presentes en la membrana plasmática, controlando la traslocación de canales entre los distintos compartimentos celulares, supone un importante mecanismo para el control de funciones celulares tan importantes como la actividad neuronal (Cerny and Huber, 2011). Por todo ello, la regulación de la distribución espacial y temporal de los receptores de membrana se considera un mecanismo clave para el control de las funciones metabólicas celulares.

Un destacado ejemplo de la importancia de regular el tráfico intracelular de los canales iónicos a/desde la membrana plasmática es el de los **receptores de glutamato de tipo AMPA**, encargados de mediar la mayoría de las sinapsis excitatorias rápidas en el sistema nervioso central (Man et al., 2000; Greger and Esteban, 2007). El tráfico intracelular de estos receptores desde y hacia las sinapsis ha sido descrito como el mecanismo central responsable de diversas formas de plasticidad sináptica (Inoue and Okabe, 2003). Así, cuando estos receptores se traslocan desde las membranas endosomales hasta la sinapsis aumentan las corrientes sinápticas, generándose una potenciación a largo plazo que es la base del proceso de aprendizaje asociativo (Rumpel et al., 2005).

Gracias al aumento del número de estudios de tráfico intracelular, se han comenzado a identificar los mecanismos implicados en el trasiego de las proteínas entre los compartimentos intracelulares y la membrana plasmática. Se sabe que las proteínas de membrana son sintetizadas en el retículo endoplásmico y tras sufrir modificaciones postraduccionales, como la glicosilación que tiene lugar en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, son plegadas y ensambladas para posteriormente ser clasificadas en determinadas vesículas que las transportan y liberan en la superficie celular mediante **exocitosis**, que puede ser constitutiva o regulada (ver **figura 9**) (Royle and Murrell-Lagnado, 2003).

La ruta de exocitosis **constitutiva** es un proceso ubicuo, que se produce en todas las células y que se encarga de transportar desde el aparato de Golgi lípidos y proteínas que formarán parte de la membrana plasmática, regenerándola de esta forma, y asegurando la eliminación constante de componentes dañados.

Sin embargo, la vía de exocitosis **regulada** es empleada por las células especializadas como las neuronas, funcionando como mecanismo de comunicación celular. En este tipo de exocitosis, las vesículas no se fusionan espontáneamente con la membrana plasmática sino que lo hacen en respuesta a determinados estímulos, desencadenando la movilización y posterior fusión de un reservorio de vesículas intracelulares almacenadas cerca de la membrana.

Tradicionalmente, la ruta de exocitosis constitutiva se ha asociado al tráfico de proteínas de membrana a la superficie celular, mientras que la ruta regulada se relaciona con la liberación dependiente de actividad de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas (Royle and Murrell-Lagnado, 2003).

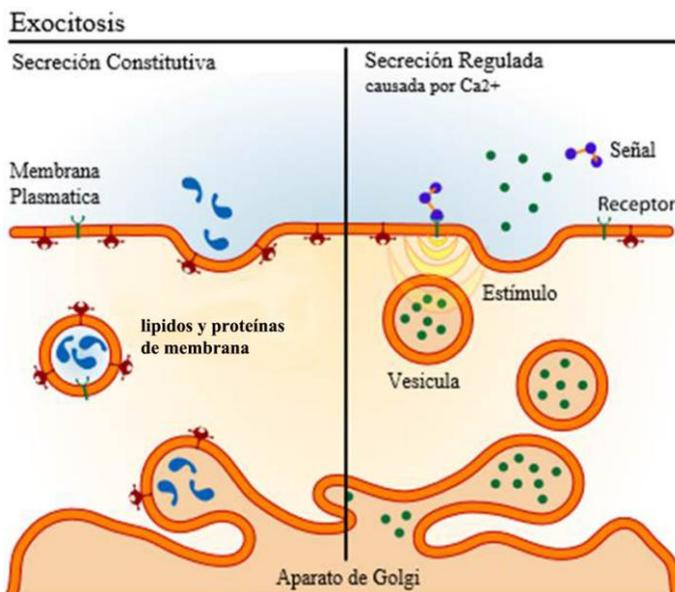


Figura 9.- Tipos de exocitosis. La traslocación de vesículas desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática donde se fusionan puede ser de dos tipos: constitutiva o regulada. (Audesirk and Audesirk, 1996).

En el tráfico de vesículas participan las **proteínas SNARE** (receptor soluble de proteínas de anclaje a la ATPasa de fusión sensible a N-etilmaleimida), una gran familia de proteínas presentes en la mayoría de organelas que intervienen en el tráfico intracelular y la secreción de vesículas. En la mayoría de los casos es necesario un aumento importante de la concentración de Ca^{+2} intracelular para que se produzca la fusión de vesículas mediadas por SNARE. Además, los cambios en esta concentración regulan la velocidad de reciclaje de las vesículas (Jahn et al., 2003).

El proceso global de exocitosis de vesículas es compensado por el proceso de **endocitosis**, asegurando de esta forma el contenido constante de los componentes de la membrana plasmática. Los receptores de membrana y transportadores pueden ser endocitados siguiendo diferentes rutas, la más clásica es la dependiente de **clatrin**s. Independientemente de la ruta de endocitosis seguida, las vesículas endocíticas formadas en la membrana plasmática se fusionarán con los **endosomas tempranos**, una población heterogénea de vesículas en la periferia de la célula, que funcionan como estaciones de clasificación y reparto del contenido de las vesículas endocíticas en los diferentes compartimentos intracelulares, por ello también se les conoce como endosomas de clasificación (ver **figura 10**). Si el destino final de los receptores internalizados es la degradación lisosomal, éstos serán conducidos desde los endosomas tempranos, pasando por los **endosomas tardíos**, hasta los **lisosomas**. Estos últimos son considerados la estación final de la vía endocítica-degradativa, ya que el destino final de las moléculas del interior de los endosomas tardíos es ser digeridas y degradadas por las hidrolasas lisosomales (Sorkin and Von Zastrow, 2002; Ciechanover, 2005).

Si por el contrario, el destino de los receptores internalizados es ser reciclados a la membrana plasmática, pueden seguir varias rutas o bien directamente volver a la membrana plasmática por una vía de reciclaje rápido o a través de los endosomas de reciclaje alcanzar de nuevo la membrana plasmática (ver **figura 10**) (Doherty and McMahon, 2009; Kumari et al., 2010).

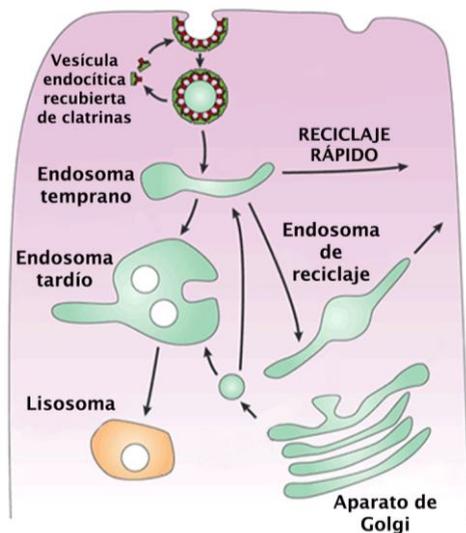


Figura 10.- Esquema general de los procesos de endocitosis, reciclaje o degradación por lisosomas. Tras la endocitosis, las vesículas se localizan en los endosomas tempranos donde se clasifican según vayan a reciclarse de nuevo a membrana o bien siguen una ruta degradativa a través de endosomas tardíos, para finalmente degradarse en los lisosomas (Sorkin and Von Zastrow, 2002).

4.1.- Tráfico intracelular de los canales TRP.

Diversos estudios han planteado que la traslocación regulada de los canales TRP a la membrana plasmática podría ser un posible mecanismo de activación de estos canales, en especial para aquellos canales TRP que están constitutivamente activos y cuya sobreactividad puede conducir a una sobrecarga de Ca^{+2} . El número de miembros de esta superfamilia de canales TRP en los que se comienza a observar este tipo de regulación aumenta cada vez más. Esta hipótesis plantea un mecanismo regulatorio que consistiría en una rápida incorporación dependiente de actividad de los canales TRP desde los reservorios citosólicos en las vesículas hasta la membrana plasmática.

La traslocación regulada de los canales de la **familia TRP** fue inicialmente observada en el canal murino **TRPV2**, que se traslocaba desde los compartimentos intracelulares a la membrana plasmática tras estimulación con IGF-1 (Kanzaki et al., 1999). Desde entonces, este mecanismo de regulación de la actividad del canal ha sido demostrado para los receptores **TRPC5** y **TRPM6** que se traslocan a la membrana plasmática tras estimulación con EGF (Bezzarides et

al., 2004; Thebault et al., 2009) o como el caso del receptor **TRPA1**, que alcanza la superficie celular tras exposición a estímulos de tipo nociceptivo (Schmidt et al., 2009).

4.2.- Vías de señalización implicadas en la traslocación de TRPV1 a la membrana plasmática.

TRPV1 también se trasloca a la membrana plasmática bajo potenciación mediada por **exocitosis regulada**, en la que intervienen **proteínas SNARE** (Morenilla-Palao et al., 2004). Concretamente, mediante ensayos de doble-híbrido con levaduras utilizando una librería de cerebro de rata y empleando como cebo el extremo amino terminal de TRPV1 se identificaron dos proteínas asociadas a vesículas sinápticas, snapin y sinaptotagmina IX, demostrando así la inserción de los canales TRPV1 a la membrana plasmática regulada mediante exocitosis dependiente de Ca^{+2} . Adicionalmente, demostraron que la sobreexpresión de snapin impedía la traslocación de TRPV1 mediada por **PKC**, asignando un papel funcional a la interacción de TRPV1 con esta proteína.

Posteriormente otros autores determinaron que la estimulación con **insulina e IGF-1**, ambos mediadores pro-inflamatorios, también provocaba la traslocación de TRPV1 a la membrana plasmática (Van Buren et al., 2005).

Además, el tratamiento con **NGF** también induce la traslocación de TRPV1, implicando a diversas quinasas PI3K, PKC δ y Src (Zhang et al., 2005; Stein et al., 2006).

Más recientemente, Jekse y colaboradores han mostrado que la proteína de la matriz extracelular **fibronectina** también estimula la traslocación de TRPV1 en neuronas sensoriales del ganglio trigémino por un mecanismo dependiente de la quinasa Src (Jeske et al., 2009).

En cuanto al papel de **PKA**, algunas sustancias pro-inflamatorias como las prostaglandinas son capaces de incrementar los niveles de AMPc, generando hiperalgesia debido a la sensibilización de TRPV1. En este sentido, Vetter y colaboradores señalaron que TRPV1 se traslocaba a la superficie celular en

células HEK293 tras estimulación con **forskolina** (FSK), un activador de la adenilato ciclasa (Vetter et al., 2008).

4.3.- Estudio del mecanismo de endocitosis y/o reciclaje del receptor TRPV1.

En diferentes tipos de receptores se ha observado un estricto control de la cantidad de receptor en la superficie celular dependiente de su actividad, bien los receptores presentes en la membrana plasmática se internalizan para posteriormente reciclarse de nuevo a la membrana plasmática (van de Graaf et al., 2008) o bien se degradan a través de una ruta proteosomal o lisosomal (Grampp et al., 2007). Dependiendo de la vía de reciclaje o vía degradativa que sigan los receptores, se distinguirá entre una regulación a corto o largo plazo, respectivamente.

Dentro de la superfamilia de receptores TRPs, existen pocos estudios relacionados con la internalización de estos receptores. Cabe destacar el caso de **TRPV5**, un canal epitelial de Ca^{+2} , que se internaliza constitutivamente (sin presencia del agonista) mediante una endocitosis dependiente de clatrina y dinamina y que tras su internalización entra en una ruta de reciclaje hacia la membrana plasmática (van de Graaf et al., 2008).

Otra ruta completamente distinta es la internalización del receptor **TRPA1** inducida por su agonista el aceite de mostaza que, tanto en sistemas de expresión heteróloga como en neuronas sensoriales, está regulada por el receptor TRPV1 (Akopian et al., 2007).

A diferencia de lo que sucede en la desensibilización aguda de TRPV1, las vías implicadas en la desensibilización del receptor inducida por su agonista a medio-largo plazo no han sido exploradas hasta el momento. Debido a la falta de datos relacionados con la internalización y/o reciclaje del receptor **TRPV1**, nuestro estudio pretende describir los distintos mecanismos o vías de endocitosis que podría seguir el receptor TRPV1 para internalizarse. Por ello, a continuación, basándonos en el esquema de la **figura 11**, describiremos abreviadamente la

diversidad de rutas endocíticas y de reciclaje que existen y que podrían ser empleadas por el receptor.

En primer lugar, distinguimos la **fagocitosis** que implica partículas grandes (>1µm), con la participación de los filamentos de actina, siendo su destino final la degradación lisosomal. Además, encontramos la **macropinocitosis**, involucrada principalmente en la captación de fluidos, en la que participan los dominios BARS (*Bin-amfifisina-Rvs*) junto con los filamentos de actina (Bonazzi et al., 2005).

La ruta clásica de **endocitosis** implica la participación de las **clatrin**, una proteína especializada de la cubierta, que posee un papel crucial en el mecanismo de escisión de la vesícula y de clasificación de los receptores. De hecho, la participación de esta proteína permite clasificar la endocitosis en rutas dependientes e independientes de clatrin. Las rutas dependientes de clatrin involucran necesariamente la participación de la familia de **GTPasas dinaminas** (Wieffer et al., 2009; Doherty and McMahon, 2009) (**figura 11**). Sin embargo, las rutas independientes de clatrin pueden ser a su vez dependientes o independientes de dinaminas (Mayor and Pagano, 2007; Howes et al., 2010).

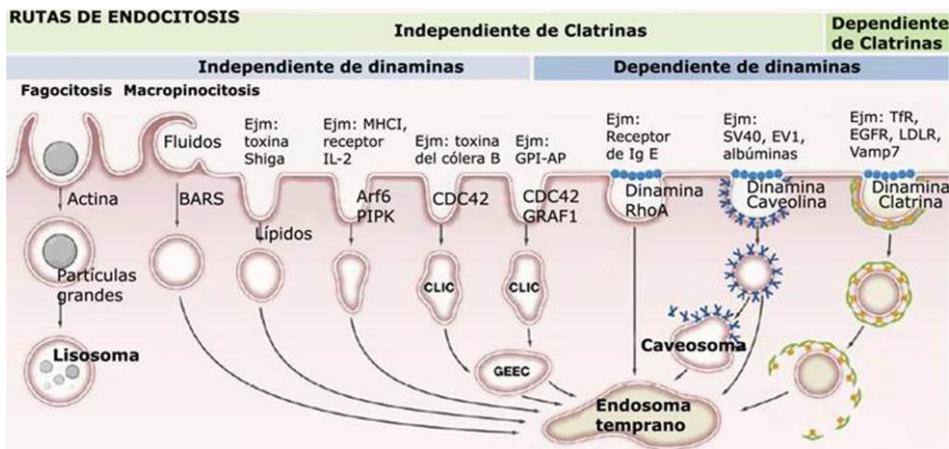


Figura 11.- Tipos de endocitosis. Clasificación de las diferentes rutas endocíticas según participen o no clatrin y/o dinaminas en el mecanismo. Se indican las proteínas características implicadas en el transporte en cada ruta, así como ejemplos de sustancias endocitadas (Wieffer et al., 2009).

Algunos ejemplos de receptores que se internalizan siguiendo la ruta clásica de endocitosis dependiente de clatrin y dinaminas (Mousavi et al., 2004; Doherty and McMahon, 2009; McMahon and Boucrot, 2011) son el receptor de la transferrina (TfR) (Tosoni et al., 2005), el receptor de EGF (Vieira et al., 1996) o el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDLR) (Garuti et al., 2005).

En las rutas de endocitosis dependientes de dinaminas e independientes de clatrin participan diversas proteínas implicadas en el tráfico intracelular como son **RhoA**, una GTPasa de la familia de proteínas Rho (Qualmann and Mellor, 2003) o **caveolina**, con la participación de unas estructuras intermedias llamadas caveosomas (Parton and Simons, 2007). Un ejemplo de internalización mediada por caveolina es el virus simio 40 o SV40 (Anderson et al., 1996).

Por último, existe una amplia variedad de rutas heterogéneas que son independientes de ambas clatrin y dinaminas (Mayr and Pagano, 2007; Howes et al., 2010) (ver **figura 11**), en las que participan otras proteínas como son **Arf6** (factor de ribosilación ADP 6) (Donaldson, 2003), **PIPK** (quinasa fosfatidil inositol), **CDC42** (proteína control de división celular 42) (Sabharanjak et al., 2002), **GRAF1** (regulador de GTPasa asociado a quinasa de adhesión focal 1) (Lundmark et al., 2008). Algunos ejemplos de moléculas o sustancias internalizadas mediante estas rutas independientes de clatrin y dinaminas son las toxinas de Shiga (Romer et al., 2007) o del cólera (Torgersen et al., 2001), el receptor de IL-2 (Lamaze et al., 2001) o los llamados GPI-AP (proteínas ancladas a glicosil fosfatidil inositol) (Sabharanjak et al., 2002).

Como se describió en la **figura 10**, una vez alcanzado el endosoma temprano, el receptor internalizado puede reciclarse rápidamente a la membrana o seguir un reciclaje más lento a través de los endosomas de reciclaje, o bien puede viajar desde el endosoma temprano al endosoma tardío para finalmente terminar degradándose en los lisosomas. La existencia de una **ruta de reciclaje rápido** a la membrana plasmática desde los endosomas tempranos ha sido ampliamente documentada para los glicoesfingolípidos (Choudhury et al., 2004). A su vez diversos estudios han demostrado que las GTPasas Rab4 y Rab35 (en inglés,

Ras-related in brain) son importantes reguladores de esta ruta de reciclaje rápido (Kouranti et al., 2006; Yudowski et al., 2009).

La **ruta de reciclaje lento** involucra el transporte de las proteínas internalizadas desde los endosomas tempranos a los endosomas de reciclaje, para finalmente retornar a la membrana plasmática (Grant and Donaldson, 2009). El término global de endosomas de reciclaje engloba a su vez varios tipos de compartimentos como los llamados ERC o compartimentos de reciclaje endocítico (en inglés, *endocytic recycling compartment*), que se localizan cerca del aparato de Golgi y se definen molecularmente por la presencia de Rab11 (Horgan et al., 2007), y también engloba a los endosomas de reciclaje de tipo tubular que se identifican con los marcadores Rab8 y Rab22a (Weigert et al., 2004; Hattula et al., 2006).

En general, las rutas de reciclaje están sumamente identificadas y existen gran variedad de estudios que determinan qué tipo de marcadores específicos (principalmente de la familia Rab) identifican una ruta determinada de reciclaje a la membrana plasmática (Maxfield and McGraw, 2004).

4.4.- Estudio del mecanismo de degradación del receptor TRPV1.

Si el receptor internalizado TRPV1 no entra en ninguna de las rutas de reciclaje anteriormente descritas, su destino será la degradación que al igual que el resto de proteínas celulares puede ser a través del proteosoma o de lisosomas. En la **figura 12** se representan a modo general estas dos rutas de degradación proteica intracelular (Adams, 2004; Ciechanover, 2005; Saftig and Klumperman, 2009; Settembre et al., 2013).

La **ruta lisosomal** se caracteriza por una disminución progresiva del pH luminal de las organelas, desde los endosomas hasta los lisosomas, llegando a alcanzar pH 5 en el lisosoma maduro (Ohkuma and Poole, 1978). La generación y mantenimiento de este gradiente de pH lisosomal requiere de la actividad de la ATPasa tipo-V, que se encarga de bombear protones al interior del lumen lisosomal (Ohkuma et al., 1982). El lumen ácido de los lisosomas es esencial para

INTRODUCCIÓN

el correcto funcionamiento de varios tipos de hidrolasas ácidas dedicadas a la degradación específica de sustratos (de Duve, 1963). A su vez, la membrana lisosomal posee proteínas implicadas en el transporte de sustancias desde y hacia el interior del lumen lisosomal, así como en la fusión de los lisosomas con otras estructuras celulares (Saftig and Klumperman, 2009). El material extracelular cuyo destino es ser degradado alcanza el lisosoma principalmente a través de rutas endocíticas (Luzio et al., 2009), mientras que los componentes intracelulares son generalmente transportados a los lisosomas por autofagia (Kaushik and Cuervo, 2012).

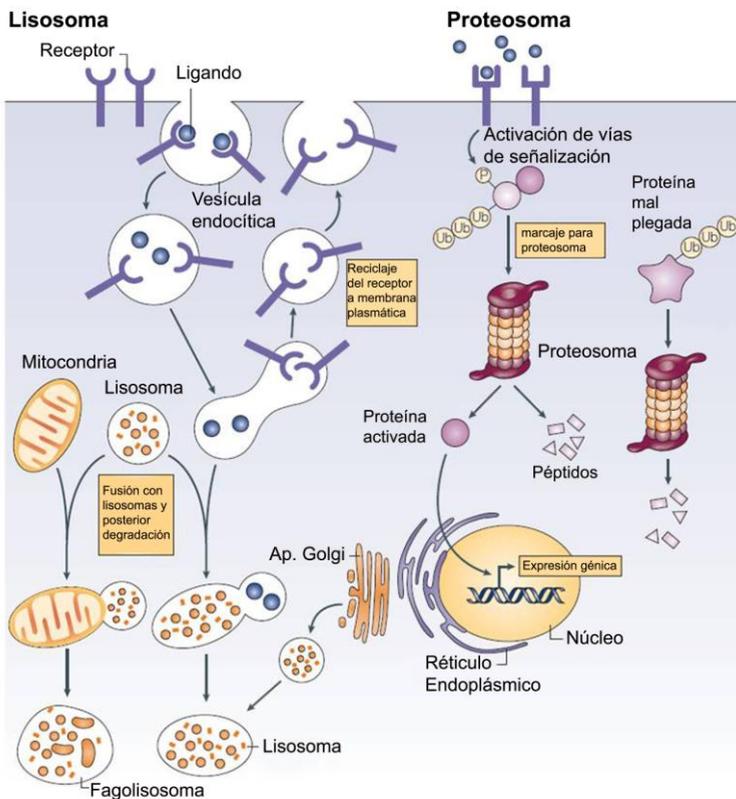


Figura 12.- Mecanismos de degradación proteica intracelular. Podrían dividirse en dos tipos de rutas: lisosomal y proteosomal. Las proteínas extracelulares o transmembrana suelen degradarse a través de los lisosomas, sin embargo las proteínas citosólicas suelen seguir la ruta proteosomal (Adams, 2004).

La **ruta proteosomal** se encarga mayoritariamente de la degradación de proteínas intracelulares, tanto de aquellas marcadas mediante fosforilación, desencadenándose la activación de determinadas vías de señalización intracelular, como de proteínas mal plegadas que están en el citosol.

La degradación dependiente del sistema proteosomal requiere de la participación de una familia de proteínas llamadas **ubiquitinas**, que marcan las proteínas sustrato para su degradación proteosomal. Sin embargo, el proceso de ubiquitinación también puede servir como señal para la activación de quinasas y otro tipo de rutas no proteolíticas (Pickart, 2001).

La ubiquitina se une covalentemente a las proteínas celulares a través de unos residuos de lisina y requiere de la participación de tres enzimas (E1, E2 y E3) que actúan en cascada (Ciechanover, 1998). En un primer paso la enzima E1 (enzima activadora de ubiquitina 1) incorpora una molécula de ubiquitina en presencia de ATP, seguidamente esta es transferida desde E1 a la proteína E2 transportadora de ubiquitina (en inglés, *ubiquitin-conjugating enzyme*). Finalmente en un último paso, tanto E2 como la proteína sustrato susceptible de ser ubiquitinada acaban uniéndose específicamente a la proteína ligasa ubiquitina o E3, produciéndose la transferencia de ubiquitinas activadas desde E2 a la proteína sustrato. La conjugación sucesiva de restos de ubiquitina genera una cadena de poliubiquitinas que funciona como señal para dirigir la proteína sustrato al proteasoma para su degradación. Tras la degradación se generan cortos fragmentos peptídicos y las ubiquitinas liberadas mediante enzimas desubiquitinantes son reutilizadas para marcar nuevamente proteínas susceptibles de degradarse por esta ruta proteosomal. La generación de una cadena de poliubiquitinas puede activar determinados reguladores transcripcionales a nivel nuclear.

OBJETIVOS

Los mecanismos implicados en el fenómeno de desensibilización a largo plazo del receptor TRPV1 inducida por agonistas vanilloides permanecen sin esclarecer, al contrario que lo que sucede con la desensibilización aguda del receptor TRPV1. Inicialmente, nos propusimos **determinar si la internalización inducida por agonista del receptor contribuía al proceso de desensibilización a medio-largo plazo de los nociceptores.**

Una vez confirmada la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina, analizamos la influencia de diferentes factores como la dosis y tiempo de exposición al agonista o el papel del Ca^{+2} . Además, abordamos el estudio de las rutas de endocitosis y/o degradación implicadas, así como el posible papel modulador que podría ejercer la fosforilación del receptor en el proceso de internalización.

Los objetivos concretos de este proyecto de tesis doctoral son:

1.- Verificar la internalización del receptor TRPV1 inducida por exposición prolongada a los agonistas vanilloides. Para ello, se realizarán ensayos de biotinilación de proteínas de membrana así como marcaje inmunocitoquímico diferencial que permitirá separar la población de membrana de la internalizada. Conjuntamente, se emplearán ensayos funcionales para corroborar la posible disminución de la población de receptor en la membrana.

2.- Investigar los factores que afectan la internalización inducida del receptor. Para ello, se estudiará la dependencia de la magnitud de la dosis y el tiempo de exposición a los diferentes agonistas y el papel del Ca^{+2} . Además, se analizará si la activación del canal es un factor determinante en el proceso de internalización.

3.- Estudiar las vías de endocitosis y posterior degradación asociadas con la internalización inducida del receptor TRPV1. Para ello, se emplearán diferentes inhibidores específicos que bloquean dichas rutas con el fin

OBJETIVOS

de esclarecer el tráfico intracelular y destino final del receptor una vez internalizado.

4.- Analizar el papel modulador de la fosforilación del receptor en la endocitosis inducida del receptor. Se evaluará la posible implicación de los procesos de fosforilación-desfosforilación de TRPV1 en el tráfico desde o hacia la membrana plasmática, contribuyendo así a la sensibilización-desensibilización del receptor.

5.- Determinar si el tratamiento prolongado con el agonista desencadena citotoxicidad celular. Se realizarán estudios de supervivencia celular en las condiciones experimentales empleadas para descartar que la internalización del receptor TRPV1 inducida por su agonista esté relacionada con un proceso de muerte celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Cultivos celulares.

1.1.- Líneas celulares: condiciones de cultivo y transfección.

La mayoría de los ensayos del presente trabajo se realizaron en la línea celular de riñón embrionario humano HEK293. Las células se cultivaron en medio DMEM (Sigma) suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% (Gibco), penicilina-estreptomicina 1% (Gibco) y L-glutamina 1% (Gibco) y se incubaron a 37°C con atmósfera humidificada saturada de CO₂ al 5%. Para la transfección, las células se crecieron en monocapa hasta alcanzar una confluencia aproximada del 90% y 24 h después se transfectaron empleando Turbofect (Fermentas Life Sciences), siguiendo las condiciones aconsejadas por el fabricante ($\mu\text{g DNA}:\mu\text{l Turbofect 1:2}$). Todos los ensayos se realizaron a las 48 h post-transfección y siempre se emplearon pases celulares inferiores a 15.

En los ensayos para la caracterización del anticuerpo extracelular α -TRPV1e, se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y-TRPV1, línea que expresa establemente TRPV1 (Lilja et al., 2007). Las células se mantuvieron en cultivo en monocapa con medio EMEM (Invitrogen) suplementado con FBS 10%, penicilina-estreptomicina 1%, L-glutamina 1%, aminoácidos no esenciales 1% (Gibco) y con el antibiótico puromicina 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma) para forzar la expresión del plásmido que contiene TRPV1.

1.2.- Cultivos primarios neuronales de DRGs de rata.

Las ratas tipo Wistar empleadas en el presente estudio se adquirieron con un peso entre 200-250 g (Laboratorios Charles River) y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (23°C) y humedad del 60%, con ciclos de luz/oscuridad (12 h/12 h) en el estabulario del servicio de animalario del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Las hembras preñadas se aislaron durante el periodo de gestación, para posteriormente emplear tanto crías neonatales de 1 a 3 días de edad como ratas adultas para la obtención de los cultivos primarios.

Para los ensayos inmunocitoquímicos y la técnica In Cell Analyzer[®] se emplearon cultivos de DRGs de ratas neonatales (1-3 días). Aproximadamente se extrajeron 40 DRGs por animal, que se trataron con colagenasa tipo IA 0.25% (Sigma) en medio DMEM sin FBS durante 90 min a 37°C. Posteriormente, los ganglios se lavaron con medio DMEM suplementado con FBS 10%, penicilina-estreptomicina 1% y L-glutamina 1% (Gibco). Tras la disgregación enzimática, se realizó la disgregación mecánica empleando pipetas pasteur con puntas estrechadas secuencialmente hasta obtener finalmente una suspensión celular. Las células se concentraron mediante centrifugación a 1000 r.p.m durante 5 min y el pellet resultante se resuspendió en medio DMEM conteniendo FBS 10%, penicilina-estreptomicina 1%, L-glutamina 1%, NGF 50 ng/ml (Promega) y citosina-arabinósido 1.25 µg/ml (Sigma).

Los ensayos de biotilación se efectuaron a partir de cultivos de DRGs aisladas de ratas adultas. La obtención de estos cultivos se realizó siguiendo un protocolo similar al empleado para las DRGs neonatales a excepción del medio de cultivo, que en este caso contiene DMEM, suero de caballo (HS, en inglés, *horse serum*) 10% (Gibco), penicilina-estreptomicina 1%, L-glutamina 1%.

Para facilitar la adherencia neuronal, antes de la siembra de las células, los cubres de vidrio se pretrataron con poli-ornitina solución 0.01% (Sigma) y laminina 1 mg/ml (Sigma). En el caso de los cultivos neonatales, se sembraron todas las neuronas de DRGs de un animal por pocillo de una placa de 12 pocillos, sin embargo para los cultivos de ratas adultas, se utilizaron todas las neuronas de un animal para sembrar dos pocillos de una placa de 6 pocillos. Transcurridas 48 h se cambió el medio de cultivo con el fin de mantener la viabilidad y eliminar restos celulares no adheridos. Todos los experimentos con cultivos primarios de DRGs se realizaron tras 3-4 días *in vitro*.

2.- Tratamientos, anticuerpos y plásmidos.

2.1.- Tratamientos farmacológicos. Condiciones de uso.

Las distintas herramientas farmacológicas empleadas, su mecanismo de acción, condiciones de uso y marca comercial se recogen en la **tabla 1**:

Droga	Mecanismo	Concentración	Tiempo	Marca Comercial
Capsaicina (Caps)	Agonista de TRPV1	0.1 μ M-100 μ M	5-60 min	Sigma-Aldrich
Resiniferatoxina (RTX)	Agonista de TRPV1	1-100 nM	20 min	Sigma-Aldrich
MG132	Inhibidor del proteosoma	10 μ M	24 h	Enzo Life Sciences
Cloroquina (CQ)	Inhibidor de función lisosomal	200 μ g/ml	2 h	Sigma-Aldrich
Leupeptina (Leup)	Inhibidor proteasas lisosomales	75 μ M	10 h	Sigma-Aldrich
Capsazepina (Cpz)	Antagonista competitivo de TRPV1	10 μ M	20 min	Sigma-Aldrich
BAPTA-AM	Quelante intracelular de Calcio	50 μ M	30 min	Merck
Sacarosa hipertónica (Sac)	Inhibidor inespecífico de endocitosis	250 mM (600 mOsm)	1 h	Sigma-Aldrich
Clorpromacina (Clpz)	Inhibidor de endocitosis mediada por clatrin	50 μ M	1 h	Sigma-Aldrich
Forskolina (FSK)	Aumenta AMPc vía adenilato ciclasa, activando PKA	20 μ M	15 min	Sigma-Aldrich
H-89	Potente inhibidor de PKA	10 μ M	1 h	Sigma-Aldrich

2.2.- Anticuerpos empleados.

Los anticuerpos utilizados, sus características y condiciones de uso para el marcaje específico de diversos compartimentos subcelulares empleados en los ensayos inmunocitoquímicos, para aislar poblaciones fluorescentes en los ensayos de citometría de flujo, así como para revelar los *western blot* en los ensayos de biotilación se incluyen en la **tabla 2**.

Antígeno	Especie	Técnica (Dilución)	PM (kDa)	Marca Comercial
Suero anti-TRPV1 extracelular (α-TRPV1e)	Conejo	WB (1:2000) IC (1:1000)	95	GenScript (USA)
Lectina WGA-Texas Red	Conejo	IC (1:200)		Invitrogen
Anti-EEA-1	Ratón	IC (1:200)	180	BD Biosciences
Suero anti-TRPV1 (C-terminal)	Conejo	WB (1:1000)	90-95	Diver Drugs S.L.
Anti-Actina	Ratón	WB (1:10000)	42	Sigma-Aldrich
Anti-Calnexina	Ratón	WB (1:200)	90	Abcam
Anti-ATPasa Na⁺/K⁺	Ratón	WB (1:5000)	100	Abcam
Transferrina-Texas Red	Suero humano	IC (1:200)		Invitrogen
Anti-Lamp-2	Ratón	IC (1:50)	120	Santa Cruz Biotechnology
Anti-TRPV1-ATTO488 (extracelular)	Conejo	In Cell Analyzer® (1:200)		Alomone Labs

Anti-mouse y Anti-rabbit fluorescentes (Alexa 568 y 488)	Cabra	IC (1:200)		Jackson ImmunoResearch
Anti-mouse HRP Anti-rabbit HRP	Cabra	WB (1:10000)		Molecular Probes

IC: Inmunocitoquímica; WB: *western blot*

2.3.- Plásmidos.

Durante la realización de este estudio se han empleado diferentes construcciones, que se describen a continuación:

- **TRPV1_{PORELESS}**: mutante no funcional de TRPV1 que tiene delecionada la región del poro iónico ($\Delta 629-647$). Esta deleción no impide la oligomerización y expresión a nivel de membrana de la proteína truncada (García-Sanz et al., 2004).
- **mLCA-ds-Red**: plásmido que expresa la cadena ligera de la proteína clatrina fusionado con una fluoróforo rojo, de forma que permite detectar específicamente las vesículas de clatrina. Cedido por I. Pérez-Otaño (CIMA, Navarra).
- **GFP-Dinamina WT y GFP-Dinamina K44A**: Dos construcciones de la dinamina 1a que llevan fusionadas la molécula fluorescente GFP: i) La dinamina 1a silvestre (Din-WT), que se utilizó como control positivo y ii) el mutante dominante negativo K44A (Din-K44A), que carece de actividad GTPasa, y se utiliza para bloquear la endocitosis mediada por dinaminas. Ceditas por M. McNiven (Fundación Clínica Mayo, Minnesota, USA).
- **TRPV1-S116D**: mutante que emula el estado de fosforilación por PKA de la serina 116 del dominio N-terminal de TRPV1, caracterizado por presentar una reducida desensibilización (Bhave et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2005). Obtenido en nuestro grupo por la técnica de mutagénesis dirigida (sustitución de la serina por ácido aspártico).

3.- Ensayos de Inmunofluorescencia.

A lo largo de este trabajo se han empleado diferentes protocolos de marcaje de receptores para distinguir varias poblaciones subcelulares simultáneamente (membrana e intracelular) o bien para localizar el destino del receptor una vez internalizado. Los distintos protocolos se ilustran en el esquema de la **figura 13** y se detallan en los **apartados 3.1 al 3.3** de esta sección.

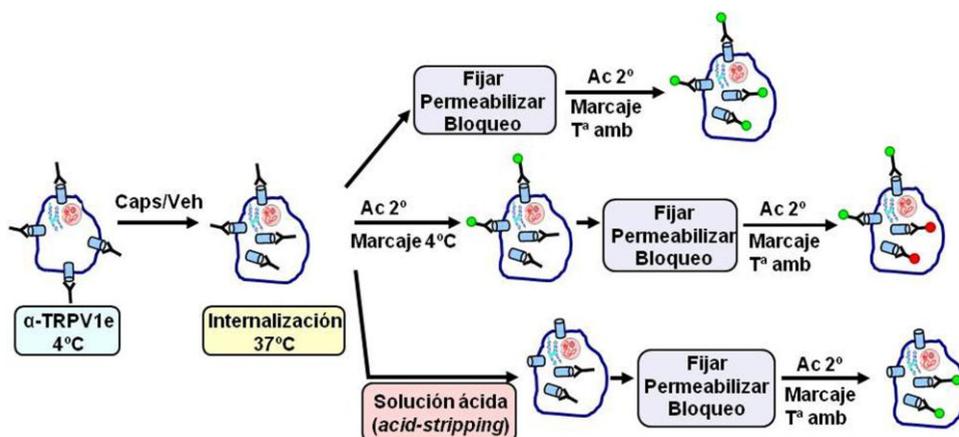


Figura 13.- Esquema de los protocolos de inmunofluorescencia empleados. Inicialmente las células se marcaron extracelularmente con el anticuerpo α -TRPV1e 1 h 4°C, para posteriormente ser tratadas con vehículo, capsaicina sola o combinada con otros tratamientos a 37°C. Dependiendo qué población subcelular se pretendiera detectar se empleó un protocolo determinado, la parte superior corresponde al **apartado 3.1**, la parte media al **apartado 3.2** y la parte inferior al **apartado 3.3 de materiales y métodos**.

3.1.- Marcaje extracelular del receptor y posterior internalización.

Inicialmente se marcó la población de receptores TRPV1 residentes en la membrana plasmática de células no permeabilizadas empleando el anticuerpo extracelular α -TRPV1e 1 h 4°C, con el objetivo de bloquear la endocitosis y marcar exclusivamente la población de receptores superficiales. Seguidamente, se trataron las células con vehículo (etanol) o con el agonista capsaicina o con

capsaicina combinada con otros tratamientos a 37°C, temperatura permisiva para la endocitosis. Las muestras control se mantuvieron constantemente a 4°C, condiciones no permisivas para la internalización.

A continuación, las células se fijaron con p-formaldehído (PFA) al 4%, se permeabilizaron y se bloquearon con suero de cabra al 3% + NP40 0.1% en PBS (tampón fosfato salino) durante 30 min a temperatura ambiente. Mediante un anticuerpo secundario fluorescente se detectaron los receptores TRPV1 que permanecen en la membrana plasmática así como los que han sido internalizados.

Para delimitar la membrana plasmática y diferenciar los receptores TRPV1 en superficie de los que han sido internalizados, se empleó un marcaje con la lectina fluorescente roja WGA (en inglés, *wheat germ agglutinin* fusionada al fluorocromo *Texas Red*), que marca selectivamente la membrana plasmática. Alternativamente, se utilizó el anticuerpo α -EEA-1 para detectar los endosomas tempranos y el anticuerpo α -Lamp2 para detectar los endosomas tardíos y lisosomas (ver **tabla 2**).

En algunos casos en los que no se disponía de marcadores de organelas intracelulares, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el receptor TRPV1-WT coexpresado con determinados plásmidos como mLCA-ds-Red (marcador de vesículas de clatrina) o bien se emplearon dos construcciones GFP-Dinamina WT y GFP-Dinamina K44A (control y dominante negativo de dinamina 1a) para el estudio de la endocitosis mediada por dinaminas.

3.2.- Marcaje simultáneo de receptores en membrana e intracelulares.

Este tipo de marcaje diferencial, comúnmente utilizado en estudios de internalización de receptores, permite distinguir en el mismo cultivo simultáneamente la población que ha sido internalizada de la que permanece en la membrana (Grampp et al., 2007).

Concretamente, consiste en marcar en células no permeabilizadas la fracción de receptores TRPV1 de membrana con el anticuerpo extracelular α -

TRPV1e durante 1 h a 4°C para bloquear la endocitosis y marcar exclusivamente la población de receptores superficiales. Posteriormente, las células se incubaron 20 min con el vehículo control o con el agonista capsaicina a 37°C. A diferencia del protocolo del **apartado anterior 3.1**, para detectar los receptores que permanecen en la membrana tras dar el estímulo a 37°C con agonista/vehículo, se procedió a lavar con PBS a 4°C para posteriormente incubar con un anticuerpo secundario Alexa 488 durante 1h a 4°C (verde). A continuación, se fijaron las células con PFA 4% y se permeabilizaron y bloquearon con suero de cabra al 3% + NP40 0.1% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. La población de receptores internalizados se detectó mediante marcaje con un anticuerpo secundario Alexa 568 (rojo), de la misma especie que el anterior, incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Con esta técnica de marcaje empleando dos anticuerpos secundarios distintos (Alexa 488 y 568 de la misma especie) y un único anticuerpo primario extracelular (α -TRPV1e) es posible diferenciar las dos poblaciones del receptor, de membrana e internalizada.

3.3.- Eliminación del marcaje del anticuerpo primario mediante solución ácida (técnica de *acid-stripping*).

Mediante esta técnica es posible eliminar el marcaje del anticuerpo extracelular unido a la membrana plasmática, sin afectar los complejos anticuerpo-receptor ya internalizados ya que no son accesibles a la acción del ácido (Carroll et al., 1999). Así pues, inicialmente las células se marcaron extracelularmente con el anticuerpo α -TRPV1e durante 1 h a 4°C, posteriormente se incubaron a 37°C con vehículo o capsaicina, durante distintos periodos de tiempo, para inducir la internalización del receptor TRPV1. Para eliminar específicamente el marcaje extracelular de los receptores que permanecen en la membrana plasmática, es decir, que no han sido internalizados, se aplicó una solución ácida (NaCl 0.5 M + ácido acético 0.2 M) durante 5 min a 4°C. Después de lavar las células abundantemente, se fijaron con PFA 4% y se permeabilizaron y bloquearon con suero de cabra al 3% + NP40 0.1% en PBS durante 30 min a temperatura

ambiente. Finalmente, los receptores intracelulares se detectaron con un anticuerpo secundario Alexa 488 (verde) durante 1 h a temperatura ambiente.

3.4.- Microscopía y análisis de imágenes.

Todas las imágenes fueron tomadas con un microscopio láser confocal Leica TCS-SP2 disponible en el Servicio de Confocal del CIPF y analizadas con el programa del equipo Leica Confocal Software LCS y con Adobe Photoshop CS2.

4.- Ensayos de biotilación: detección de proteínas de membrana.

Los ensayos de biotilación de proteínas de membrana permiten detectar y cuantificar una determinada proteína en la membrana plasmática, basándose en el marcaje en superficie de proteínas de membrana en células no permeabilizadas con sulfo-NHS-SS-biotina y en la alta afinidad y especificidad de la interacción biotina-avidina.

En primer lugar, las células se incubaron durante diferentes periodos de tiempo con el vehículo (control) o con los distintos tratamientos de agonista (capsaicina, RTX) solo o en combinación con otras drogas a 37°C. Tras lavar las células abundantemente con PBS frío, se expusieron a sulfo-NHS-SS-biotina (Thermo Fisher Scientific) durante 30 min a 4°C.

A continuación, se inactivó el exceso de moléculas de biotina, presentes en el medio debido a que no han reaccionado, empleando una disolución de bloqueo (Tris 10 mM pH 7,4; NaCl 154 mM) durante 30 min a 4°C, y se procedió a realizar la lisis celular con una disolución que contenía HEPES 50 mM pH 7.4; NaCl 140 mM; Glicerol 10%; Tritón X-100 1% v/v; EDTA 1 mM; EGTA 2 mM; Deoxicolato Sódico 0.5%; Iodoacetamida (1:50) y PMSF (1:50) durante 1 h a 4°C. Estos lisados corresponden a la llamada fracción “total” en los *western blot*.

La concentración de proteína total de cada muestra, determinada mediante el ensayo colorimétrico *BCA (ácido bicinonínico) Protein Assay Kit*

(Thermo Fisher Scientific), se normalizó a igual cantidad de proteína total en todas las muestras antes de incubar con la resina de estreptavidina-agarosa (Sigma-Aldrich) a 4°C toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugaron las muestras y se separó la fracción de receptores TRPV1 de membrana (biotinilados, unidos a la resina) de la fracción de receptores intracelulares (en el sobrenadante). Finalmente, las proteínas se desnaturalizaron en condiciones reductoras a 100°C durante 5 min, se separaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que fueron ensayadas con los diferentes anticuerpos contra TRPV1, actina (como control de carga de la fracción total y control de posibles contaminaciones intracelulares en la fracción de membrana), ATPasa Na^+/K^+ (como control de carga de la fracción de membrana).

Las bandas obtenidas se cuantificaron con el programa de análisis Quantity One (Bio-rad) y con Adobe Photoshop CS2. Para el análisis estadístico de los ensayos de biotinilación se analizaron los niveles de expresión de TRPV1 en la fracción de membrana y fracción total por separado. Todos los datos se expresaron normalizando la fracción de TRPV1 frente a tratado con vehículo (control). Los datos representados se muestran como media \pm S.E.M. (error estándar de la media) y n= número de experimentos.

5.- Medidas de calcio intracelular.

Estos ensayos funcionales se basan en la medida de los cambios transitorios de las concentraciones de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{+2}]_i$), empleando para ello un fluorocromo capaz de quelar el calcio libre. Las fluctuaciones de calcio intracelular se registraron en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT, solo o cotransfectado con alguna de las construcciones de dinaminas-GFP, o con el mutante TRPV1-S116D para compararlo con el receptor silvestre.

El día del ensayo las células se cargaron con el fluorocromo FURA-2AM (Fura-2 acetoximetilester) (Biotium) 10 μM durante 1 h 37°C disuelto en una solución estándar (en mM: 140 NaCl; 4 KCl, 2 CaCl_2 ; 2 MgCl_2 ; 10 HEPES; 5 D-

Glucosa, pH 7.4; osmolaridad ≈ 320 mosmol/kg con manitol, todos los reactivos de Sigma-Aldrich). Asimismo, se utilizó una disolución ácida de igual composición a la solución estándar, pero el HEPES se sustituyó por MES y se ajustó el pH a 5.5.

Los cristales se montaron sobre una cámara de registro adaptada para el microscopio invertido Leica modelo DM IRE2 acoplado a una cámara ORCA-ER CCD (Hamamatsu Photonics). Las células se perfundieron con la solución estándar o con los distintos tratamientos y se registró la fluorescencia tras excitación a dos longitudes de onda, 340 nm y 380 nm (intensidades de excitación del FURA-2AM). Como software se usó el programa informático de análisis AquaCosmos Photonics (Hamamatsu Photonics). La $([Ca^{+2}]_i)$ se correlacionó con la relación de las intensidades de excitación registradas a 340 nm y 380 nm del FURA-2AM (F_{340}/F_{380}), frente al tiempo del registro en min, que se representaron utilizando los programas GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, <http://www.graphpad.com>) y Origin 7.0 (Enterprise edition server).

Para el estudio específico de la endocitosis de TRPV1 inducida por su agonista se aprovechó la capacidad del receptor para responder a diversos estímulos como pH ácidos y diversos agonistas. Para ello se diseñó un protocolo de estimulación, que consistía en aplicar dos pulsos de pH 5.5 de 1 min de duración intercalados por un tratamiento de 20 min con vehículo, con capsaicina sola o combinada con otra droga (ver ejemplo en la **figura 14 panel A**). Este protocolo pretende evidenciar las posibles diferencias entre el pulso inicial de pH (pH_1) y el segundo pulso de pH tras aplicar el tratamiento (pH_2), calculando la relación del segundo respecto al primero (RpH_2/pH_1). Este valor, que cuantifica la respuesta al pH del receptor tras aplicar el tratamiento, se empleó como indicador del grado de desensibilización del receptor. En las gráficas de cuantificación de estos resultados se muestran los valores RpH_2/pH_1 expresados como media \pm S.E.M. siendo n= número de células ensayadas y N= número de experimentos independientes realizados (ver ejemplo en **figura 25** de sección de resultados).

Este mismo tipo de ensayos de calcio intracelular fueron también empleados para determinar la capacidad de respuesta de los receptores TRPV1 que permanecen en la membrana tras producirse la internalización inducida por el

agonista. Se diseñó un protocolo que consistía en tratar las células durante 20 min con capsaicina, a tres concentraciones distintas (0.1-1-10 μM), seguido de un estímulo supramáximo conseguido con una combinación de pH ácido y alta concentración de capsaicina (pH5.5+Caps100 μM) durante 10 s (ver ejemplo en la **figura 14 panel B**). En estos ensayos se cuantificó la magnitud de la respuesta de TRPV1 tras este último estímulo máximo de activación (pH5.5+Caps100 μM) en células previamente tratadas a distintas concentraciones de capsaicina durante 20 min, siendo posible observar diferentes respuestas según la concentración de capsaicina aplicada inicialmente (ver ejemplo en **figura 26** de sección de resultados).

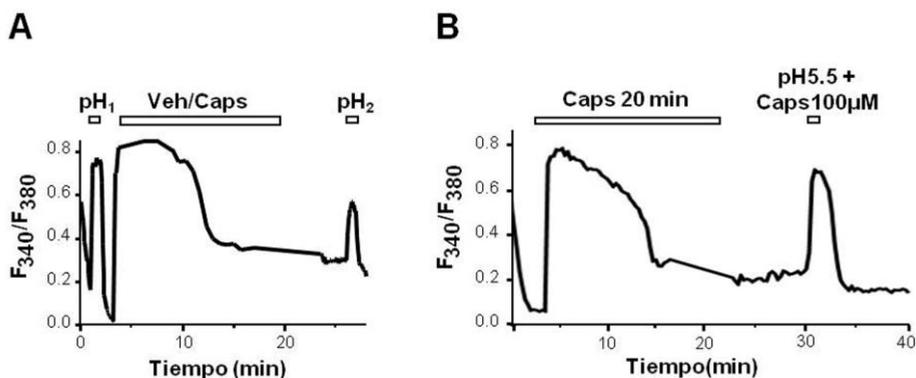


Figura 14.- Protocolos de estimulación empleados para los ensayos de calcio intracelular. (A) Inicialmente se aplicó un pulso de pH 5.5 de 1 min, para posteriormente tratar con vehículo, capsaicina sola o combinada con otra droga durante 20 min y finalmente se aplicó un segundo pulso de pH ácido. Se registraron las intensidades de excitación de FURA-2AM a 340nm y 380 nm (F_{340} y F_{380}) y se representa la relación F_{340}/F_{380} frente al tiempo. (B) Se trató durante 20 min con diferentes concentraciones de capsaicina (0.1-1-10 μM), y tras lavar abundantemente con solución estándar se aplicó un potente estímulo combinando pH 5.5 y capsaicina 100 μM durante 10 s.

6. – Medidas de electrofisiología: técnica de sello-perforado.

Para la realización de los estudios de electrofisiología empleamos la configuración sello-perforado (en inglés, *perforated-patch*), que se basa en la aplicación de una pequeña cantidad de anfotericina B en la solución del electrodo, antibiótico que difunde a través de la membrana plasmática creando un acceso eléctrico al interior celular. La ventaja de esta técnica es que el interior celular sufre un lavado menor por las soluciones de electrofisiología, y en principio cabe esperar una menor alteración de la maquinaria de tráfico celular y de su capacidad endocítica, si se compara con otras técnicas de electrofisiología.

Se emplearon cultivos de células HEK293 cotransfectadas con TRPV1-WT y un plásmido que expresa YFP en proporción 3:2, sembradas sobre cristales previamente tratados con poli-L-lisina 10 µg/ml 1 h 37°C y analizadas tras 48 h de cultivo.

Los registros se realizaron usando el amplificador EPC-10 (HEKA). Las pipetas de cristal borosilicato (WPI) se estiraron con un puller P-97 (Sutter Instruments Co) y se pulieron con la micro-forja MF-830 (Narishige) hasta obtener una resistencia de 2-5 MΩ. La solución extracelular empleada contenía (en mM): 140 NaCl; 4 KCl; 2 CaCl₂; 2 MgCl₂; 10 HEPES; 5D-glucosa; 20 manitol (pH ajustado a 7.4 o 6 con NaOH y osmolaridad ~320 mosmol/kg). Para inhibir los canales iónicos sensibles a ácidos llamados ASIC (en inglés, *acid sensing ion channels*) que interferirían en el registro, la solución de pH ácido se suplementó con 50 µM amilorida. La solución de la pipeta contenía (en mM): 144 KCl; 2 MgCl₂; 10 HEPES; 5 EGTA, pH 7.2 ajustado con KOH, ~295 mosmol/kg, junto con 240-120 µg/ml de anfotericina B recién preparada. Las diferentes disoluciones se aplicaron con un sistema de perfusión controlado por gravedad que se sitúa cercano a la célula a registrar. Todos los registros se obtuvieron a temperatura ambiente (~22°C), aplicando un voltaje continuo, siguiendo un protocolo de rampas con un potencial de reposo de 0 mV, desde -60 a + 60 mV aplicado cada 3 s a lo largo de todo el registro. El protocolo diseñado es semejante al utilizado para los registros de calcio intracelular y consistió en intercalar dos pulsos de pH 6

de 1 min de duración con el tratamiento de 20 min con el vehículo o con el agonista capsaicina, solo o combinado con otras drogas. El muestreo de las corrientes iónicas se tomó cada 3 s.

El grado de desensibilización del receptor se calculó con la siguiente fórmula: Grado de desensibilización = $1 - (I_{pH_2} / I_{pH_1})$. Donde I_{pH_2} corresponde al máximo de corriente del segundo pulso de pH ácido registrado tras 20 min de tratamiento y I_{pH_1} corresponde al máximo de corriente del primer pulso de pH ácido antes de aplicar el tratamiento.

El papel que desempeña la entrada de calcio o liberación del calcio intracelular se evaluó preincubando las células con BAPTA-AM 50 μ M (Calbiochem) a 37°C en medio libre de suero 1 h antes del registro.

Los registros se representaron con el programa Origin 7.0 (Enterprise edition server) y en la cuantificación se muestran los valores de I_{pH_2} / I_{pH_1} expresados como media \pm S.E.M. siendo n = número de células ensayadas y N = número de experimentos independientes realizados. Estos datos se compararon estadísticamente mediante el test Mann-Whitney no paramétrico con el programa GraphPad Prism 4.0. Los niveles de significancia se muestran como: ns, no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7.- Ensayos de supervivencia celular.

Para analizar la posible citotoxicidad celular producida por el agonista capsaicina en los cultivos celulares del presente estudio se emplearon diferentes técnicas de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

En el caso de los cultivos primarios de neuronas de DRGs de ratas neonatales, se sembraron con medio suplementado con 50 ng/ml NGF (Promega) y 1.25 μ g/ml citosina arabinósido (Sigma), inhibidor del crecimiento de los fibroblastos, en placas de 24 pocillos 48 h antes de tratarlas por duplicado con diferentes concentraciones de capsaicina (10, 100 y 1000 nM) durante 20 min 37°C, con vehículo (control) o con un control positivo de muerte celular (Etanol 1:5). Tras 24 h se realizó un triple marcaje con: 1) Anti-TRPV1-ATTO488

extracelular (Alomone Labs), anticuerpo contra TRPV1 que reconoce un epítipo extracelular del receptor marcado con un fluorocromo verde, 2) Ioduro de Propidio para marcar las células muertas y 3) Hoescht que se une al DNA tanto de células vivas como fijadas, permitiendo de esta forma contar el número total de células. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia automatizado con analizador lector de microplacas (In Cell Analyzer 1000, GE Healthcare), con un objetivo 10X Nikon TE2000 y cámara Roper CoolSNAP HQ CCD. Para cada tratamiento se analizaron dos pocillos tomando 90 campos/pocillo al azar. El análisis de las imágenes se realizó con el programa In Cell Analyzer 1000 Workstation versión 3.5 (GE Healthcare).

Por otro lado, para determinar la viabilidad celular en sistemas de expresión heteróloga se emplearon ensayos colorimétricos con MTT (Tiazolil azul formazán), así como estudios de citometría de flujo.

El reactivo MTT, soluble y de color amarillo, es captado por las células vivas mediante endocitosis donde es reducido a formazán (sal insoluble, color púrpura) por las enzimas mitocondriales, para finalmente ser transportado a la superficie celular por exocitosis. Tras solubilizar los cristales de formazán es posible medir su intensidad de fluorescencia a 570 nm y determinar el porcentaje de viabilidad celular. Para realizar este ensayo colorimétrico los cultivos de células HEK293 se transfectaron transitoriamente con TRPV1-WT, pasadas 48 h se trataron con el agonista capsaicina 1 μM durante 20 min a 37°C o con vehículo (control). Transcurridos los distintos tiempos post-capsaicina (1, 3, 6, 12 y 24 h) se analizó el porcentaje de viabilidad del cultivo expresado como porcentaje respecto a 100% (células transfectadas pero no tratadas). Mediante este método fue posible determinar la viabilidad total del cultivo, pero no la viabilidad específica de las células TRPV1⁺.

Con el objetivo de cuantificar la supervivencia celular tras 24 h de exposición a capsaicina de la población TRPV1⁺, los cultivos de células HEK293 se transfectaron transitoriamente con YFP-TRPV1, o con el plásmido YFP como control, para posteriormente ser incubadas con diferentes concentraciones de capsaicina (0.1, 1 y 10 μM) durante 20 min. Tras aplicar los tratamientos a las

distintas concentraciones, las células se lavaron con medio de cultivo completo y se mantuvieron a 37°C durante 24 h. Para este estudio de citometría de flujo se empleó el reactivo 7-Aminoactinomicina D (7-AAD, Sigma-Aldrich) 2 µg/ml, como marcador fluorescente que se intercala a las cadenas de DNA, para determinar el porcentaje de supervivencia celular respecto al valor control del vehículo (100%). La suspensión de células fue analizada en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter). El análisis de las imágenes se realizó con el programa WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

Los datos se representaron como media \pm S.E.M.; siendo n=número de células por muestra y N=número de experimentos. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney aplicando un intervalo de confianza * $p < 0.05$.

8. – Software y análisis estadístico de los datos.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, <http://www.graphpad.com>) empleándolo para el cálculo de las medias y S.E.M., así como para la construcción de las gráficas mostradas. También se utilizó en el análisis de la significación estadística de los resultados, aplicando el test Mann-Whitney. Se consideró estadísticamente significativo un nivel de significancia igual o menor del 5 ($p \leq 0.05$). Los niveles de significancia se muestran como: ns, no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Para determinar la densidad de las bandas en los ensayos de *western blot* se emplearon los programas de análisis Quantity One (Bio-rad) y Adobe Photoshop CS2. Los registros de electrofisiología se representaron con el programa Origin 7.0 (Enterprise edition server).

RESULTADOS

1.- Estudio del proceso de internalización del receptor TRPV1.

Como se detalló en la introducción, la activación repetida y continuada de los nociceptores provoca su entrada en un estado refractario o desensibilizado, es decir, se vuelven incapaces de responder a nuevos estímulos durante un periodo de tiempo que puede durar desde minutos hasta varios días. Nos preguntamos si en la desensibilización a medio-largo plazo del receptor TRPV1 intervendría un proceso de internalización inducida por los agonistas vanilloides.

Inicialmente se estudió el proceso de internalización constitutiva del receptor TRPV1 (en ausencia de agonista), para posteriormente evaluar la posible internalización inducida por la exposición prolongada a su agonista, para ello se emplearon dos estrategias: 1) ensayos inmunocitoquímicos utilizando un anticuerpo que detecta exclusivamente la población extracelular del receptor TRPV1 (Camprubi-Robles et al., 2009) y 2) ensayos de biotilación de proteínas de membrana que permiten cuantificar la población de receptor en la superficie celular con respecto a la población total en la célula.

En el trabajo de Camprubí-Robles y colaboradores desarrollaron un anticuerpo policlonal en conejo contra la secuencia peptídica ⁶⁰⁷LPMESTPHKCRGSA⁶²⁰, un epítipo localizado en un lazo extracelular del receptor de TRPV1 de rata, que se denominó α -TRPV1e (Camprubi-Robles et al., 2009). Este anticuerpo se validó inicialmente por *Western blot* a partir de un lisado de células HEK293 que expresaban TRPV1 transitoriamente, detectando una banda de aproximadamente 95 KDa que corresponde al tamaño esperado para TRPV1. Posteriormente, se detectó el receptor en la superficie celular mediante inmunocitoquímica, tanto en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, que expresa establemente TRPV1, como en neuronas de DRGs. En estas últimas, el marcaje de α -TRPV1e en células no permeabilizadas colocalizaba específicamente con el detectado por la lectina fluorescente verde WGA (en inglés, *wheat germ agglutinin-Alexa488*), un marcador característico de membrana plasmática. De esta forma,

demonstraron que el anticuerpo marcaba específicamente la población extracelular de TRPV1 y por ello fue empleado para el presente trabajo.

1.1.- Internalización constitutiva de TRPV1.

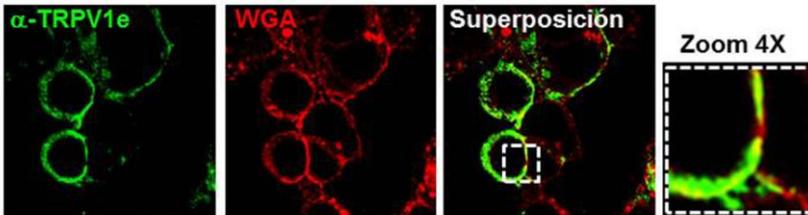
La magnitud y la cinética de la internalización constitutiva de TRPV1 se estudió mediante ensayos inmunocitoquímicos empleando el anticuerpo extracelular α -TRPV1e en células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV1-WT. La población de TRPV1 en membrana se localizó incubando las células no permeabilizadas con α -TRPV1e a 4°C durante 1 h. Posteriormente, se restauró el tráfico desde/hacia la membrana a distintos tiempos de incubación (10, 20 y 60 min) a 37°C. El control de no endocitosis se obtuvo manteniendo la temperatura de 4°C durante todo el ensayo. Para poder delimitar claramente la membrana plasmática, las células se incubaron con la lectina fluorescente WGA unida al fluorocromo *Texas Red* (roja).

La **figura 15** muestra imágenes de microscopía confocal representativas de TRPV1 marcado en membrana y su internalización en ausencia de estímulos. En el **panel A** se muestra el bloqueo de la endocitosis manteniendo las células a 4°C durante todo el procedimiento y en consecuencia se aprecia un marcaje clásico de membrana. En la imagen de la superposición (amarillo) se observa una completa colocalización de TRPV1 (verde) y la lectina WGA (roja). En el **panel B** se muestra el resultado de incubar las células durante 10 min a 37°C (temperatura permisiva para la internalización), en ella se aprecia una casi completa colocalización del receptor y la lectina WGA, sugiriendo que la fracción de TRPV1 internalizado en estas condiciones es poco significativa. Sin embargo, a tiempos de incubación más prolongados de 20 y 60 min (**paneles C y D**), comenzaron a observarse algunos acúmulos de TRPV1 muy cercanos a la membrana plasmática.

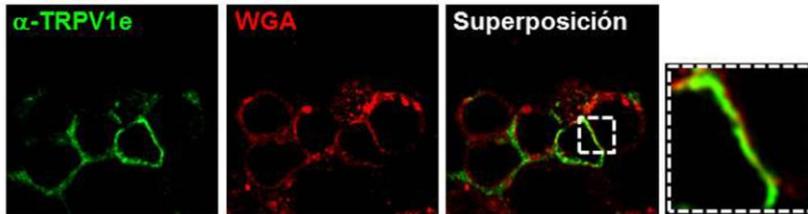
En conjunto, estos resultados sugieren que en ausencia de agonista y a tiempos de incubación prolongados, la población del receptor TRPV1 de membrana movilizada hacia el citosol es escasa y es probable que se encuentre

localizada en los endosomas tempranos, esta posibilidad será estudiada a continuación.

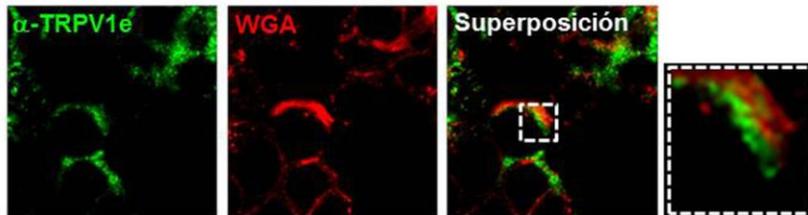
A. Control. No endocitosis



B. 10 min



C. 20 min



D. 60 min

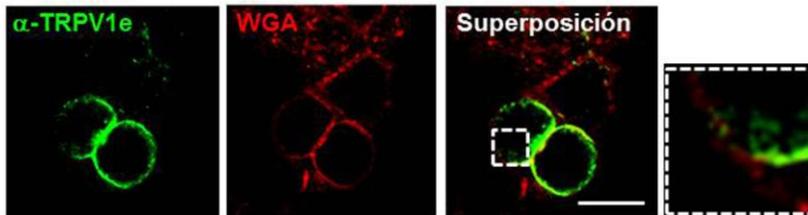


Figura 15.- El receptor TRPV1 muestra escasa internalización constitutiva, en ausencia de agonista. Marcaje de membrana con α -TRPV1e (verde) en células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV1. Lectina WGA (*Wheat germ agglutinin*) (rojo) marca glicoproteínas de la membrana plasmática. (A) Condiciones control de bloqueo de la endocitosis a 4°C. (B-D) Colocalización del anticuerpo α -TRPV1e con la lectina a distintos tiempos de incubación (10-60 min) a 37°C. A tiempos prolongados se aprecia escasa internalización del receptor TRPV1. Barra de escala 20 μ m. Zoom 4X.

RESULTADOS

Para comprobar la implicación de la ruta endosomal en la internalización constitutiva de TRPV1, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos en células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV1-WT y se utilizó el anticuerpo anti-EEA-1 que marca específicamente los endosomas tempranos. Estas organelas que permanecen próximas a la membrana plasmática, reciben las vesículas procedentes de la endocitosis, las clasifican y las reparten a los diferentes compartimentos subcelulares.

En las imágenes de la **figura 16 paneles A y B** se muestra que a tiempos cortos (10 min a 37°C) no se aprecian receptores TRPV1 internalizados constitutivamente, por ello no se observa colocalización con el marcador de endosomas tempranos. Mientras que a tiempos de incubación más prolongados (60 min a 37°C) los escasos acúmulos intracelulares de TRPV1 cercanos a la membrana plasmática presentan una marcada colocalización con anti-EEA-1 (**figura 16 paneles C y D**) sugiriendo que, en ausencia de agonista, el tráfico endocítico de TRPV1 es muy lento y se localiza al menos parcialmente en los endosomas tempranos.

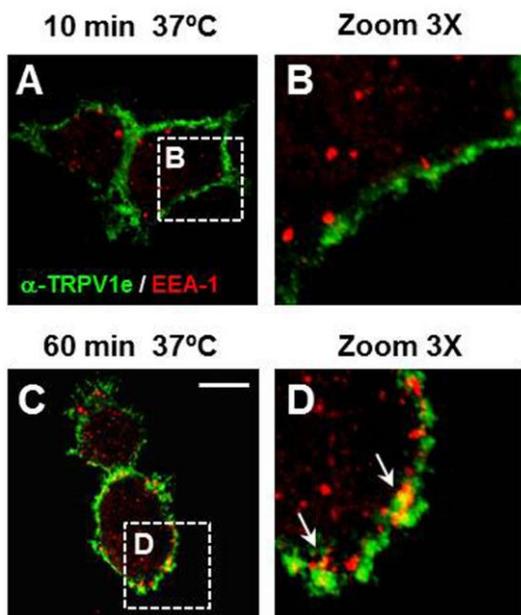


Figura 16.- La escasa población de receptores TRPV1 internalizados constitutivamente a tiempos prolongados colocaliza con anti-EEA-1, marcador de endosomas tempranos. Marcaje de membrana con α -TRPV1e (verde) y anti-EEA-1 (rojo) en células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV1-WT. (A) No existe colocalización entre TRPV1 y anti-EEA-1 a los 10 min a 37°C sin agonista. (C) A los 60 min, los receptores TRPV1 internalizados parecen localizarse en los endosomas tempranos (flechas) (B y D Zoom 3X). Barra de escala 10 μ m.

Con el fin de completar estos resultados, se usó una técnica de inmunofluorescencia que consiste en marcar el receptor en la membrana, permitir la internalización a distintos tiempos a 37°C, y a continuación eliminar el anticuerpo que permanece en la membrana con un tratamiento con ácido (*acid-stripping*) (Carroll et al., 1999). Como ya se detalló en el **apartado 3.3 de materiales y métodos**, este método permite visualizar únicamente la población del receptor internalizada. Como control, las membranas plasmáticas se delimitaron con la lectina WGA fluorescente (roja).

La **figura 17** muestra las imágenes de inmunofluorescencia de células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV1-WT, marcadas con α -TRPV1e (verde) e incubadas a 37°C durante 10, 20 ó 60 min. La técnica de *acid-stripping* permitió distinguir un claro punteado intracelular cercano a la membrana característico de los receptores TRPV1 internalizados (**paneles F-H, flechas**). Sin embargo, en las células no tratadas con ácido esa población de receptores internalizados es indistinguible por su proximidad a la marca de la membrana plasmática (**paneles A-D**).

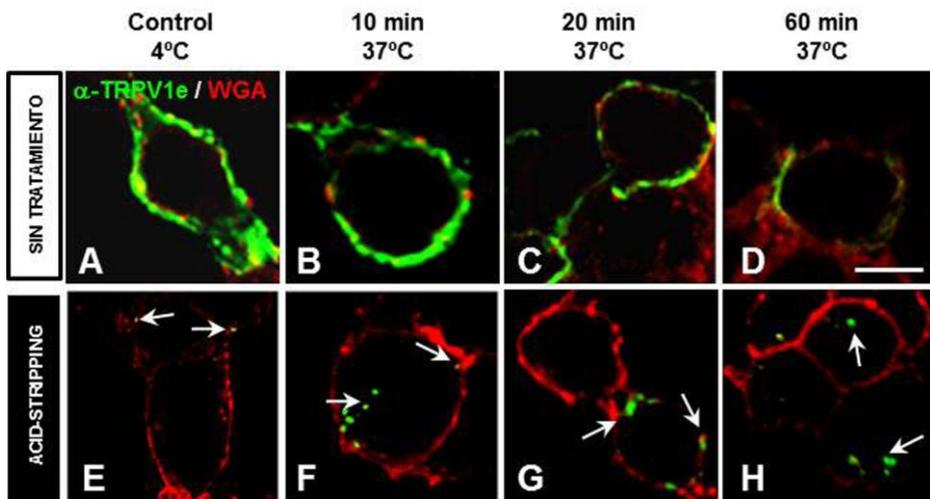


Figura 17.- Internalización constitutiva de TRPV1 eliminando el marcaje de membrana con tratamiento ácido (técnica de *acid-stripping*). Células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV1-WT, marcadas con α -TRPV1e (verde) y lectina WGA (rojo) e incubadas a diferentes tiempos a 37°C. (A y E) En condiciones control a 4°C se bloquea la endocitosis. Marcaje de receptores TRPV1 tras el tratamiento ácido (F-H, flechas) comparado con células no tratadas (A-D). Barra de escala 10 μ m.

1.2.- Internalización de TRPV1 inducida por agonista.

Una vez definida la escasa internalización constitutiva del receptor a tiempos prolongados de incubación a 37°C, nos propusimos determinar si la exposición a algún agonista del receptor aceleraría el proceso de internalización, en analogía a otros receptores como los receptores AMPA en cultivos de neuronas de hipocampo (Carroll et al., 1999).

1.2.1.- Localización subcelular del receptor TRPV1 tras exposición a capsaicina en cultivos de neuronas de DRGs.

Para abordar el estudio de la internalización del receptor TRPV1 inducida se comenzó empleando capsaicina como agonista. Inicialmente, se utilizaron cultivos primarios de DRGs de ratas neonatales, modelo neuronal clásicamente utilizado para el estudio de TRPV1 por los niveles elevados de expresión del receptor que presentan (Oh et al., 1996; Szallasi and Blumberg, 1999).

Mediante un marcaje inmunocitoquímico diferencial distinguimos la población de TRPV1 en membrana de la población internalizada, siguiendo el protocolo detallado en el **apartado 3.2 de la sección materiales y métodos** y previamente descrito por Grampp y colaboradores (Grampp et al., 2007). Inicialmente, se marcó de forma específica la población de TRPV1 en membrana con el anticuerpo α -TRPV1e a 4°C y, tras incubar a 37°C en presencia de agonista o de vehículo (como control), se detectó la población remanente de receptores superficiales con un anticuerpo secundario marcado con Alexa 488 (verde) a 4°C. A continuación, las muestras se fijaron y permeabilizaron, para posteriormente incubarse a temperatura ambiente con otro anticuerpo secundario marcado con Alexa 568 (rojo), de la misma especie que el anterior, que permitió detectar los receptores TRPV1 internalizados.

Las imágenes de microscopia confocal de la **figura 18** muestran que en condiciones no permisivas para la endocitosis (4°C, **panel A**) no se detectan receptores TRPV1 internalizados (rojo). Sin embargo, tras incubación de las

neuronas con vehículo 20 min a 37°C (**panel B**) se observó que, aunque la población de TRPV1 permanece mayoritariamente en la membrana (verde), aparecen algunos acúmulos de receptores internalizados cercanos a la superficie (rojo). Curiosamente, el tratamiento con capsaicina 100 nM durante 20 min a 37°C (**panel C**) provocó que la población de receptores internalizados fuera significativamente más cuantiosa, apreciándose una importante redistribución del receptor TRPV1 desde la superficie celular hacia compartimentos intracelulares.

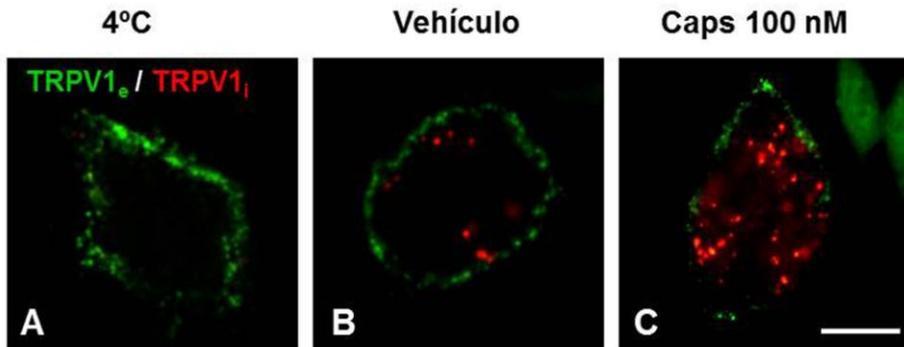


Figura 18.- Internalización de TRPV1 inducida por capsaicina en cultivo de neuronas de DRGs. Marcaje de membrana (verde) e intracelular (rojo). (A) Condiciones de bloqueo de la endocitosis a 4°C. (B) Internalización inducida por vehículo 20 min a 37°C (C) Internalización inducida por capsaicina a 100 nM 20 min. Barra de escala 20 μ m.

1.2.2.- Localización subcelular del receptor TRPV1 tras exposición a capsaicina en células HEK293.

Para determinar si la internalización inducida por agonista de TRPV1 se reproducía en la línea celular HEK293 transfectada transitoriamente con TRPV1-WT, repetimos ensayos inmunocitoquímicos similares, marcando inicialmente con α -TRPV1e y posteriormente tratando con capsaicina 1 μ M o vehículo durante distintos tiempos a 37°C. Para visualizar únicamente la población de receptores internalizados se empleó nuevamente la técnica de eliminación del marcaje superficial con ácido (*acid-stripping*). Como control de membrana plasmática se incubaron las células con la lectina fluorescente roja WGA.

RESULTADOS

En las imágenes representativas de la **figura 19 paneles F-H**, se observa una mayor presencia de acúmulos intracelulares de TRPV1 (verde, flechas) en presencia de agonista en comparación a las imágenes de internalización basal, en presencia del vehículo (**paneles B-D**). Estos datos indican que la presencia del agonista promueve una mayor internalización del receptor, especialmente a partir de 20 min de exposición (**panel G**).

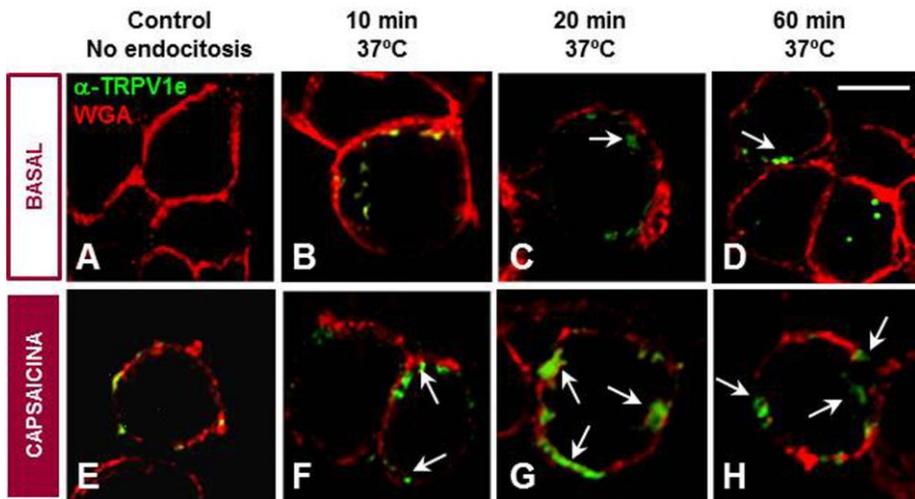


Figura 19.- Internalización de TRPV1 basal e inducida por capsaicina. Marcate con α -TRPV1e (verde) en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT y lectina WGA (rojo). Se aplicó el tratamiento ácido para eliminar el marcaje de membrana (*acid-stripping*) (A y E). Condiciones de bloqueo de endocitosis a 4°C. (B-D) Internalización sin agonista a distintos tiempos a 37°C. (F-H) Capsaicina 1 μ M provoca la internalización de TRPV1, observándose importantes acúmulos intracelulares (marcados con flechas). Barra de escala 10 μ m.

Utilizando la estrategia de marcaje inmunocitoquímico diferencial de las subpoblaciones de receptor mediante anticuerpos marcados con distintos fluoróforos, se distinguieron los receptores TRPV1 en membrana (verde) de los receptores internalizados (rojo) después de tratar con capsaicina.

Como muestran las imágenes de microscopía confocal de la **figura 20 panel A**, en condiciones de bloqueo de la endocitosis a 4°C, el marcaje de TRPV1 aparece únicamente en la membrana. Mientras que las células tratadas con vehículo a 37°C durante 20 min (**panel B**) presentaron unos niveles muy restringidos de internalización del receptor, que se visualiza como un extenso marcaje superficial (verde) junto con escasos acúmulos de receptores internalizados cercanos a la membrana plasmática (rojo). Sin embargo, el tratamiento con capsaicina 1 μM durante 20 min provocó la drástica internalización de TRPV1 (**panel C**), observándose una escasa población de receptores en la membrana (verde) acompañada de abundantes acúmulos intracelulares de receptores internalizados (rojo).

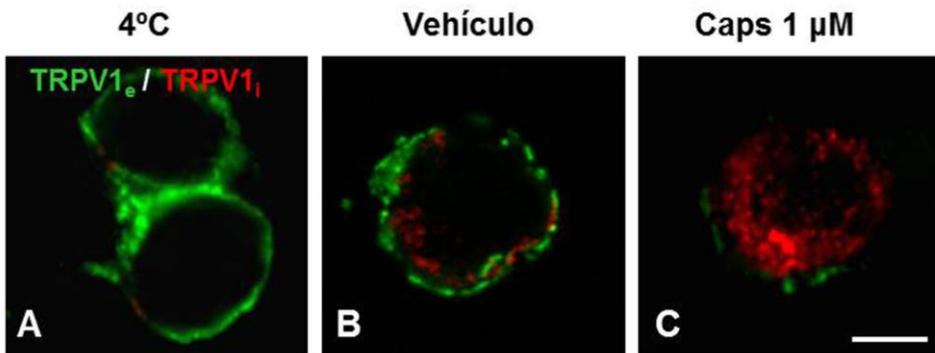


Figura 20.- Internalización de TRPV1 inducida por capsaicina en células HEK293. Marcaje de membrana (verde) e intracelular (rojo). (A) Bloqueo de la endocitosis en condiciones control a 4°C. (B) Internalización inducida por vehículo durante 20 min a 37°C. (C) Internalización inducida por capsaicina 1 μM durante 20 min. Barra de escala 10 μm .

1.2.3.- Ensayos de biotilación: efecto de la capsaicina en la expresión superficial y total de TRPV1.

La magnitud y la cinética de la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina se estudiaron mediante ensayos de biotilación que permitieron la separación de la fracción de proteínas en membrana de la fracción total.

Inicialmente valoramos si la internalización de TRPV1 inducida podría ser un proceso dependiente de la dosis de agonista. Para ello, se utilizaron células HEK293 expresando transitoriamente TRPV1 que se expusieron a diferentes concentraciones de capsaicina, entre 0.1 μM y 100 μM , durante un periodo de 20 min a 37°C.

Como se puede observar en el *western blot* de la **figura 21 panel A**, la población de TRPV1 en membrana disminuyó progresivamente conforme aumentaba la concentración de capsaicina. Curiosamente la población total de TRPV1 también disminuyó de forma inversamente proporcional a la concentración de capsaicina, de forma paralela a lo que ocurre con la población de receptor en superficie. Estos datos sugieren que una vez internalizado el receptor no se acumula en reservorios intracelulares, sino que con toda probabilidad sigue una vía degradativa.

La cuantificación de la proteína en superficie y total relativa a condiciones control (vehículo) se muestra en el **panel B** de la **figura 21**. El tratamiento con capsaicina 1 μM durante 20 min fue capaz de disminuir hasta un 66% la cantidad de TRPV1 en membrana (nivel expresión de proteína en membrana= $34 \pm 6\%$ respecto a 100% con vehículo) y hasta un 68% la población total de TRPV1 (nivel expresión de proteína total= $32 \pm 9\%$).

En conjunto, los resultados de este ensayo indican que la internalización del receptor TRPV1 inducida por agonista es un proceso dependiente de la dosis de capsaicina empleada.

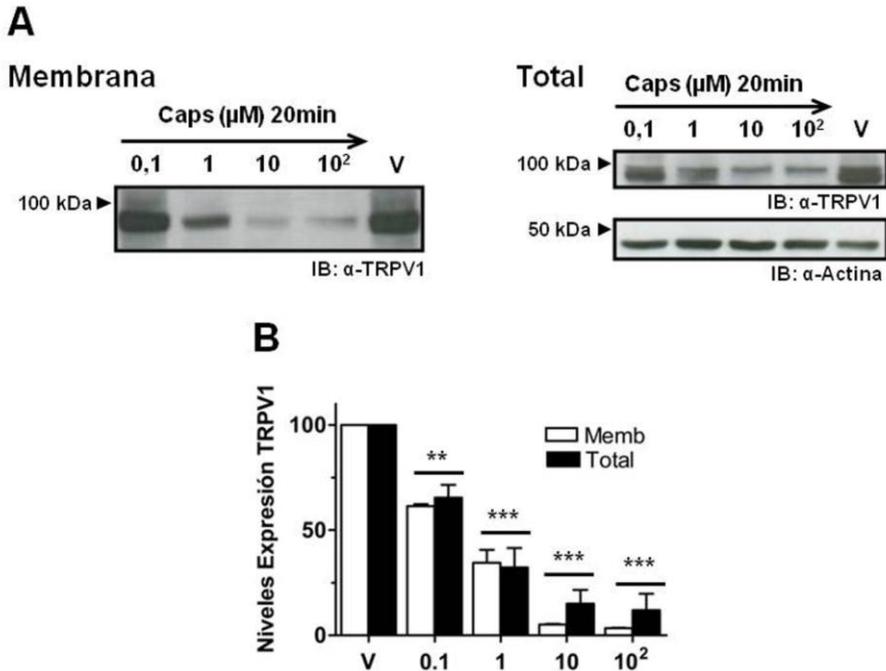


Figura 21.- Efecto de la dosis de capsaicina en la internalización inducida de TRPV1. (A) Células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV1-WT se trataron con vehículo (V) o capsaicina (entre 0.1 μM y 100 μM) durante 20 min a 37°C. Las proteínas de membrana se biotinilaron y separaron mediante una resina estreptavidina-agarosa. Se muestra *western blot* representativo de 4 experimentos independientes. (B) Cuantificación de los niveles de expresión de la fracción de TRPV1 en membrana y total. Resultados expresados como media \pm S.E.M. (Diferencias son consideradas significativas cuando ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al valor control (V, vehículo) mediante test Mann-Whitney).

A continuación, se analizó la cinética del proceso de internalización tras exposición al agonista, fijando la concentración de capsaicina a 1 μM durante diferentes periodos de tiempo a 37°C. Igualmente se cuantificó la población de receptor en superficie y total mediante ensayos de biotinilación de proteínas de membrana.

En las **figuras 22, paneles A y B**, se puede apreciar que tanto la población de membrana como la población total de TRPV1 disminuyeron progresivamente en función del tiempo de exposición a capsaicina.

RESULTADOS

El ajuste del curso temporal del proceso (**panel C**) muestra un descenso inicial muy acusado en el porcentaje de TRPV1 en membrana y aproximadamente a partir de los 30-35 min de tratamiento con capsaicina 1 μM la población en membrana parece ser más estable.

En resumen, estos datos indican que la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina además de ser un proceso dosis-dependiente también lo es dependiente del tiempo de exposición al agonista.

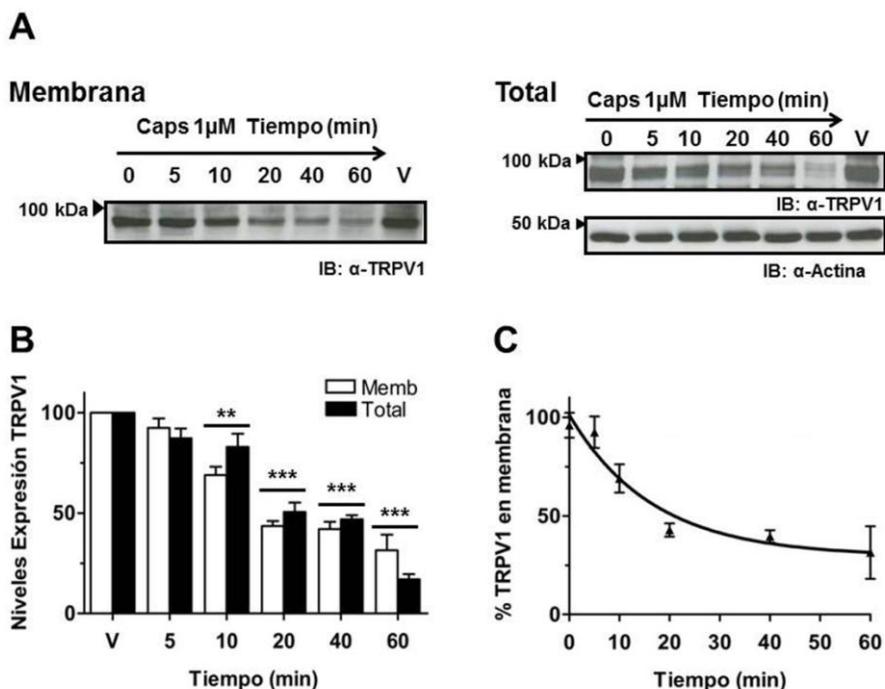


Figura 22.- Cinética de la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina. (A) Células HEK293 transfectadas transitoriamente con TRPV1-WT se trataron con vehículo o capsaicina 1 μM durante distintos tiempos de incubación a 37°C (entre 5 y 60 min). Las fracciones de TRPV1 aisladas se muestran en un *western blot* representativo de 4 experimentos independientes. (B) Cuantificación de las fracciones de membrana y total en función del tiempo de incubación con capsaicina normalizadas frente a vehículo (V) expresados como media \pm S.E.M. (C) Ajuste del curso temporal de la expresión de TRPV1 en membrana. (** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al valor vehículo mediante test Mann-Whitney).

La disminución de la cantidad de receptor detectada tras la exposición prolongada al agonista podría ser resultado inespecífico de una alteración de la integridad de la membrana plasmática o incluso de los organelas intracelulares. Para descartar esta posibilidad, se evaluaron los niveles de expresión de la proteína integral de membrana ATPasa Na⁺-K⁺ y de la proteína integral de membrana del retículo endoplásmico calnexina. Como muestra la **figura 23**, el tratamiento con capsaicina 1 μM durante 20 min no afectó la expresión de ambas proteínas en sus respectivas localizaciones subcelulares, confirmando que capsaicina provoca la internalización específica de su receptor.

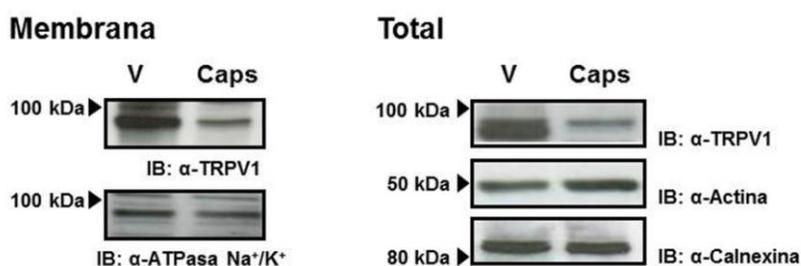


Figura 23.- La exposición prolongada a capsaicina no afecta la integridad de la membrana plasmática ni del retículo endoplásmico de células que expresan TRPV1. Western blot representativo de tres ensayos de biotilación con células HEK transfectadas transitoriamente con TRPV1-WT y posteriormente tratadas con vehículo o capsaicina 1 μM durante 20 min. Inmunodetección de la proteína de membrana plasmática ATPasa Na⁺-K⁺ y de la proteína integral del retículo endoplásmico, calnexina.

1.2.4.- Internalización de TRPV1 inducida por agonista RTX.

Con el fin de determinar si el proceso de internalización inducida por agonista era exclusivo de capsaicina o un fenómeno universal que podría ser producido por otros agonistas del receptor, se realizaron similares ensayos de biotilación de proteínas de membrana con el agonista vanilloide resiniferatoxina (RTX) a diferentes concentraciones durante 20 min a 37°C (Szallasi and Blumberg, 1989).

RESULTADOS

Como se puede observar en la **figura 24 panel A** tanto la población en membrana como la población total de TRPV1 disminuyeron drásticamente al aplicar el tratamiento con RTX a concentración 10 nM y superiores. La cuantificación de la cantidad de receptor en membrana y total normalizada frente al vehículo del **panel B** muestra que la población de TRPV1 en membrana disminuyó alrededor del 55% y del 65% tras exposición a RTX 10 y 100 nM, respectivamente. En la población total, ese descenso fue del 56% y del 67% al tratar con RTX 10 y 100 nM, respectivamente.

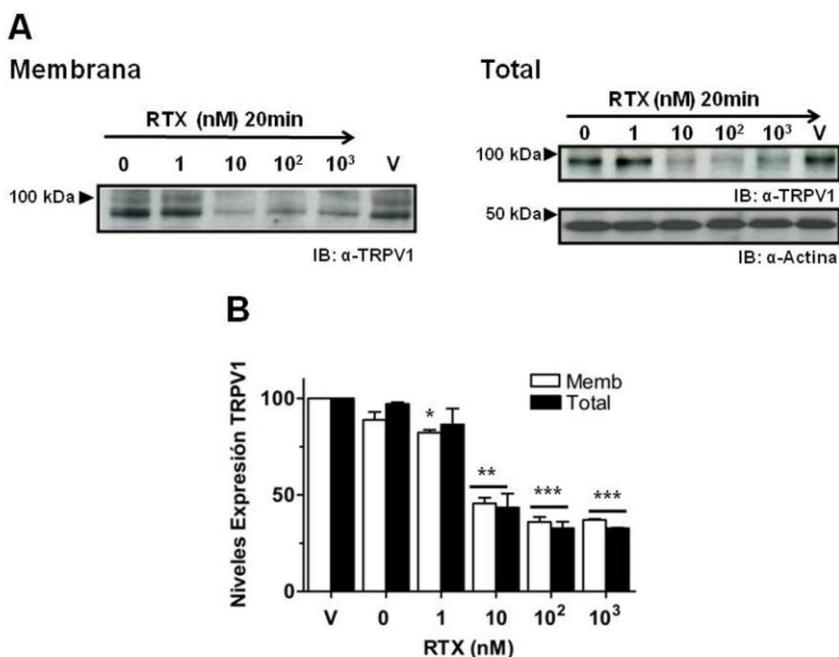


Figura 24.- Efecto de la dosis de RTX en la internalización de TRPV1. (A) Células HEK293 transfectadas con TRPV1 se trataron con vehículo (V) o RTX (1 - 1000 nM) 20 min. Se muestra *western blot* representativo de 4 experimentos independientes. (B) Cuantificación de la expresión de la fracción de TRPV1 en membrana y total. Representación media \pm S.E.M. (Diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al valor control (vehículo) mediante test Mann-Whitney).

Por lo tanto, el descenso observado en la población de TRPV1 en membrana y total tras incubación con ambos vanilloides, capsaicina y RTX, permite asegurar que la exposición prolongada de TRPV1 a estos agonistas produce una significativa endocitosis de los receptores superficiales y posterior degradación.

Nuestros resultados anteriores mostraron claramente que la presencia prolongada de los agonistas vanilloides promueve la internalización de TRPV1 en neuronas de DRGs. Dado que este proceso se reproducía idénticamente en las líneas celulares que expresan transitoriamente TRPV1, nos planteamos abordar el estudio de los aspectos mecánicos de este fenómeno en la línea celular HEK293 expresando transitoriamente TRPV1-WT. Para ello, establecimos unas condiciones experimentales de dosis de agonista y tiempo de internalización en las que se producía aproximadamente un 50% de la internalización, estas fueron capsaicina 1 μM durante 20 min a 37°C, que servirán como criterio común en todos los ensayos.

1.3.- Caracterización funcional de la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina.

Para correlacionar funcionalmente la actividad del receptor en estas condiciones experimentales con los resultados inmunocitoquímicos y bioquímicos previos, se efectuaron medidas de calcio intracelular y electrofisiológicas mediante la técnica de sello-perforado.

1.3.1.- Medidas de calcio intracelular.

Dado que TRPV1 es un canal catiónico no selectivo con elevada permeabilidad al Ca^{+2} , comenzamos realizando medidas de calcio intracelular en células cargadas con FURA-2AM, un fluoróforo capaz de unir Ca^{+2} libre. Para ello, se tomaron medidas ratiométricas de Ca^{+2} intracelular tras excitación a 340 y 380 nm (intensidades de excitación del FURA-2AM) (Roe et al., 1990). Los cambios

RESULTADOS

transitorios de Ca^{+2} en respuesta a pH ácido o por aplicación del agonista (o vehículo) se representaron con la relación F_{340}/F_{380} en función del tiempo.

La internalización inducida por agonista se estudió utilizando un protocolo experimental que consistía en la aplicación de dos pulsos de solución ácida (pH 5.5) de 1 min intercalados por un estímulo más prolongado de 20 min de tratamiento con vehículo (control) o con el agonista capsaicina, solo o combinado con otra droga.

La **figura 25 panel A** muestra un registro representativo en respuesta a este protocolo en células tratadas con vehículo (traza gris, línea discontinua) o con capsaicina 1 μM (traza negra, línea continua). Para cuantificar las diferencias observadas en la respuesta a pH ácido tras el tratamiento prolongado con capsaicina comparándolo con vehículo, se calculó la relación $R_{\text{pH}_2/\text{pH}_1}$ entre el incremento de fluorescencia del segundo pulso de pH (pH_2) tras el tratamiento, frente al del primer pulso de pH (pH_1) antes del tratamiento. Esta medida de las respuestas al pH se empleó como indicador del grado de desensibilización del receptor.

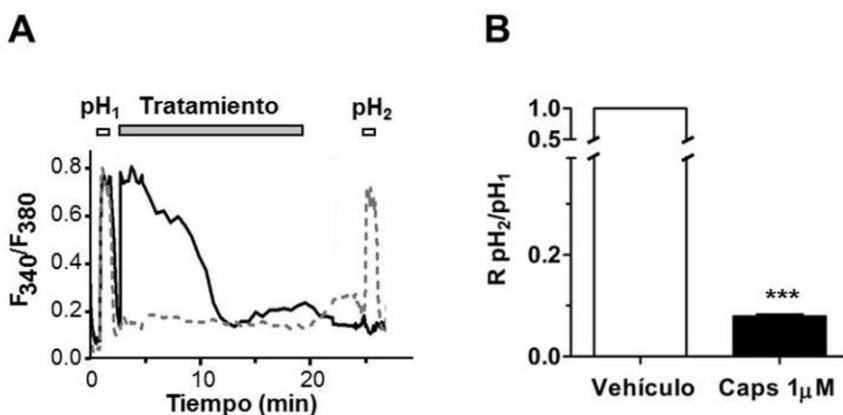


Figura 25.- Estudio de la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina mediante medidas de calcio intracelular. Células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT cargadas con FURA-2AM. (A) Registros representativos de las intensidades de excitación obtenidas a 340 nm y 380 nm representadas como la relación F_{340}/F_{380} en condiciones control vehículo (línea gris discontinua) y capsaicina 1 μM 20 min (línea negra continua). (B) Cuantificación de la relación $R_{\text{pH}_2/\text{pH}_1}$ entre segundo pulso de pH (pH_2) y el primer pulso de pH (pH_1) para cada tratamiento. Asignado al vehículo valor $R_{\text{pH}_2/\text{pH}_1}=1$ (n=270 células para vehículo y n=306 Capsaicina *** $p < 0.001$ test Mann-Whitney).

Como muestra **la figura 25 panel B**, el tratamiento con capsaicina 1 μM disminuyó $\approx 90\%$ el segundo pico de pH respecto al primer pico de pH ($R_{\text{pH}_2/\text{pH}_{1\text{Caps}}} = 0.079 \pm 0.004$) cuando se normaliza con la respuesta del vehículo (cuyo valor asignado es $R_{\text{pH}_2/\text{pH}_1} = 1$). Estos resultados funcionales concuerdan, al menos en parte, con una menor población de TRPV1 remanente en la membrana tras la exposición prolongada al agonista.

Dado que, tras aplicar capsaicina 1 μM 20 min, existía una importante diferencia entre el porcentaje de TRPV1 residente en la membrana plasmática calculado mediante ensayos de biotilación (aproximadamente 40%) y la magnitud de la respuesta a Ca^{+2} calculada con medidas de calcio intracelular (aproximadamente 10%), diferencia que podría atribuirse a la desensibilización intrínseca de los receptores en la membrana, nos propusimos determinar la capacidad de respuesta de esos receptores TRPV1 remanentes en la membrana tras inducir la internalización con el agonista. Para ello, empleamos un estímulo final supramáximo que consistía en un breve pulso de 10 s de pH ácido (5.5) combinado con capsaicina 100 μM .

Los registros de Ca^{+2} de la **figura 26 panel A** muestran la respuesta de los receptores TRPV1 a tres concentraciones distintas de capsaicina (0.1, 1 y 10 μM) durante 20 min y la posterior respuesta al estímulo supramáximo de pH 5.5 + Caps 100 μM . Como se puede observar en la cuantificación de la respuesta a pH 5.5 + Caps 100 μM del **panel B**, la magnitud de la respuesta supramáxima se redujo proporcionalmente conforme aumentaba la concentración de agonista aplicada, tendencia que se correlaciona con una menor población de receptores residentes en la membrana a mayores concentraciones de capsaicina. De hecho, las condiciones que inducían un 50% de internalización (1 μM durante 20 min) provocan una reducción de la magnitud de la respuesta de aproximadamente 50%.

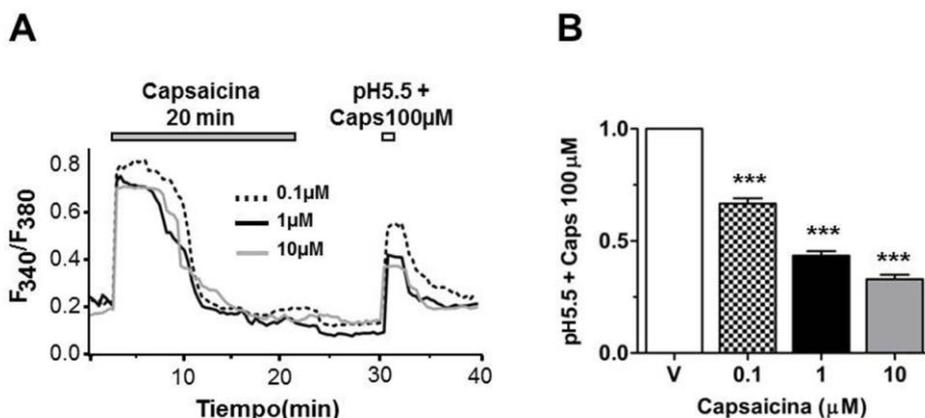


Figura 26.- Respuesta frente a un corto e intenso estímulo (pH5.5+Caps100μM) de los receptores TRPV1 no internalizados tras tratamiento prolongado con capsaicina. (A) Registros representativos de las medidas de calcio intracelular, se muestran las intensidades de excitación obtenidas a 340 nm y 380 nm representadas como relación F_{340}/F_{380} frente al tiempo. Tratamiento con diferentes concentraciones (0.1, 1 y 10 μM) de capsaicina durante 20 min y posterior aplicación de un estímulo combinando pH 5.5 y capsaicina 100 μM durante 10 s. (B) Correlación de la respuesta a pH5.5+Caps100μM (representada como F_{340}/F_{380}) frente a la concentración de capsaicina empleada para inducir la internalización. (n>150 todas condiciones. N=3 *** p< 0.001 test Mann-Whitney).

1.3.2.- Electrofisiología: técnica de sello-perforado.

La caracterización funcional se complementó registrando electrofisiológicamente las corrientes eléctricas del canal TRPV1 con el objetivo de determinar la posible pérdida o ganancia de corriente tras la aplicación de un tratamiento prologando con el agonista. De entre las diferentes configuraciones electrofisiológicas, se eligió la de tipo sello-perforado porque presenta la ventaja de perturbar en menor medida la maquinaria intracelular. Esta configuración utiliza anfotericina B, un antibiótico capaz de difundir a través de la membrana plasmática perforándola, permitiendo acceder al entorno eléctrico intracelular, provocando de esta forma un menor lavado del interior celular.

Se aplicó un protocolo de rampas sucesivas de -60 (línea continua) a +60 mV (línea discontinua) cada 30 s a células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT, para posteriormente registrar las corrientes eléctricas a ambos potenciales. Simultáneamente, se aplicó un protocolo de estimulación, similar al empleado para las medidas de calcio intracelular, que consistía en dos pulsos de pH ácido (pH 6) de 1 min de duración intercalados por un tratamiento con capsaicina 1 μ M durante 20 min o vehículo (control). Los registros representativos de las corrientes obtenidas se ilustran en la **figura 27 panel A**.

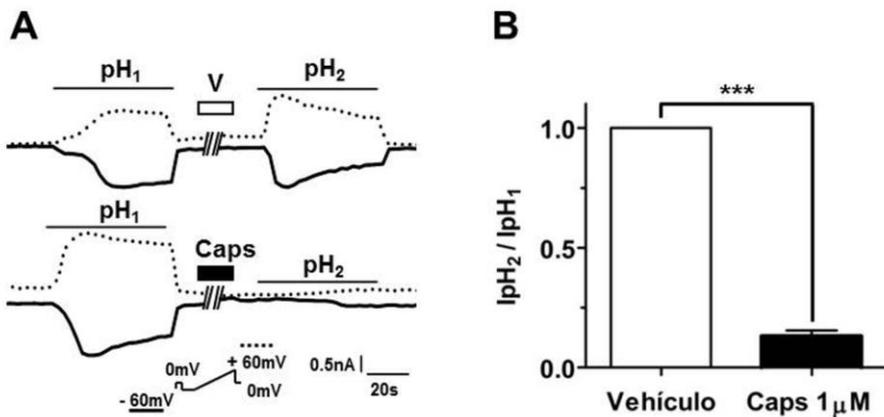


Figura 27.- Disminución de la actividad de TRPV1 tras exposición prolongada a capsaicina. (A) Registros representativos electrofisiológicos obtenidos con la configuración de sello-perforado en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT tratadas con vehículo (V, registro superior) y con capsaicina 1 μ M 20 min (Caps, registro inferior) intercalados entre dos pulsos de pH 6 de 1 min. Protocolo de rampas sucesivas de -60 (— línea continua) a + 60 mV (--- línea discontinua) repetidas cada 30 s. (B) Cuantificación de la intensidad de la corriente máxima del 2º pulso de pH (IpH₂) respecto a la intensidad de corriente máxima del primer pulso de pH (IpH₁), representación de la relación IpH₂/IpH₁ (media \pm S.E.M). Vehículo n=10 y Capsaicina n=5, siendo n=número de células. *** p< 0.001 test Mann-Whitney).

Para cuantificar la pérdida o ganancia de corriente después del tratamiento con capsaicina o vehículo, se midió la intensidad de la corriente máxima del segundo pulso de pH respecto a la intensidad de corriente máxima del primer pulso de pH (IpH₂/IpH₁). En la cuantificación de la **figura 27 panel B**, se puede

observar como la corriente residual sufre un descenso $\approx 90\%$ al tratar con capsaicina respecto al vehículo, es decir, se produce una significativa desensibilización del receptor (I_{pH_2}/I_{pH_1} Caps= 0.13 ± 0.02 respecto vehículo=1).

Estos datos en conjunto correlacionan funcionalmente la disminución de receptor en la membrana tras exposición al agonista con la observación por métodos bioquímicos del proceso de internalización de la proteína inducida por capsaicina.

2.- La exposición prolongada a capsaicina induce la degradación de TRPV1 a través de la vía lisosomal.

La **figura 21** del apartado anterior muestra como la población total de receptor TRPV1 disminuye proporcionalmente conforme aumenta la concentración de capsaicina empleada. A su vez, la población total de TRPV1 también muestra un descenso paralelo al aumentar el tiempo de exposición a capsaicina $1 \mu\text{M}$ (**figura 22**), sugiriendo que el receptor internalizado no se recicla a la membrana sino que se está degradando. Para confirmar esta observación y dilucidar qué tipos de rutas degradativas están implicadas, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos y de biotilación de proteínas de membrana empleando diferentes marcadores e inhibidores selectivos.

2.1.- La población de TRPV1 internalizada por exposición prolongada a capsaicina se localiza en los lisosomas.

Para determinar qué tipo de ruta endocítica y/o degradativa sigue el receptor TRPV1 internalizado por el tratamiento prolongado con el agonista, se estudió la colocalización del receptor TRPV1 con distintos marcadores específicos de las diferentes poblaciones subcelulares u organelas. Específicamente, se ensayó el marcador de endosomas tempranos EEA-1 (Haugsten et al., 2011) y el marcador de endosomas tardíos y lisosomas Lamp2 (Shenoy et al., 2008).

Como muestra la **figura 28**, al incubar las células con el anticuerpo extracelular α -TRPV1e durante 1 h a 4°C, para posteriormente inducir la internalización del receptor y eliminar el marcaje de receptores remanentes en la membrana utilizando el tratamiento con ácido (técnica *acid-stripping*), se observó que a tiempos cortos (10 min) de incubación con capsaicina 1 μ M, la escasa población de receptores internalizados (verde) colocalizaba con el marcador de endosomas anti-EEA-1 (rojo) (**panel A, flechas**). Sin embargo, a tiempos más prolongados (20 y 60 min) de incubación con el agonista, el mayor número de receptores internalizados (verde) que se observaba no colocalizaba con este marcador (**paneles B y C**), probablemente debido a que se han desplazado a otro compartimento subcelular, posiblemente a los endosomas tardíos y/o a los lisosomas.

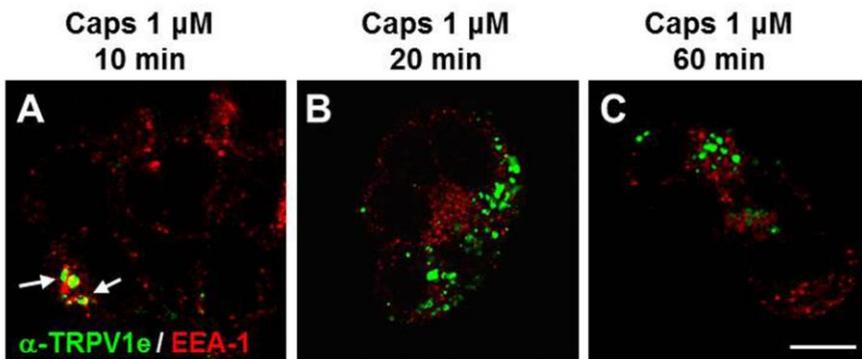


Figura 28.- Receptores TRPV1 internalizados por exposición prolongada al agonista, no se localizan en los endosomas tempranos. Marcaje con α -TRPV1e (verde) y anti-EEA-1, marcador de endosomas tempranos (rojo) en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT. Mediante *acid-stripping* solo se detecta el receptor internalizado, se elimina marcaje de membrana. (A) Internalización inducida por capsaicina 1 μ M 10 min, si colocaliza en los endosomas tempranos (flechas). (B y C) A tiempos de 20 min y 60 min con Caps no colocaliza con EEA-1. Barra de escala 20 μ m.

RESULTADOS

Para comprobar si el destino final de los receptores TRPV1 internalizados era la degradación en los lisosomas, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos con el marcador de endosomas tardíos y lisosomas Lamp2 (Shenoy et al., 2008). Para evitar la degradación masiva de receptores en estas organelas, las células se pretrataron con cloroquina (CQ), un inhibidor de la actividad lisosomal (Grampp et al., 2007). Específicamente se incubaron con 200 $\mu\text{g/ml}$ cloroquina (CQ) durante 2 h antes y durante los 20 min de tratamiento con capsaicina 1 μM o vehículo.

En las imágenes de **la figura 29 paneles C y D** se observa que, como cabía esperar, en ausencia del agonista la escasa población de receptores internalizados (verde) no colocalizaba con Lamp2 (rojo), confirmando así los resultados obtenidos previamente (**figura 16**) donde se determinó que tras 60 min a 37°C la minoritaria población de TRPV1 internalizado se localizaba en los endosomas tempranos. Sin embargo, los receptores internalizados tras el tratamiento con capsaicina sí colocalizaban con Lamp2 (**paneles E-F, flechas**). Adicionalmente, cuando las células son pretratadas con el inhibidor lisosomal cloroquina (**paneles G-H**) se observa una mayor población de receptores TRPV1 internalizados por la presencia del agonista, que a su vez colocalizan significativamente con las vesículas Lamp2 positivas (marcado con flechas).

Estos resultados sugieren que los receptores TRPV1 internalizados por la presencia del agonista son transportados a los lisosomas donde son rápidamente degradados.

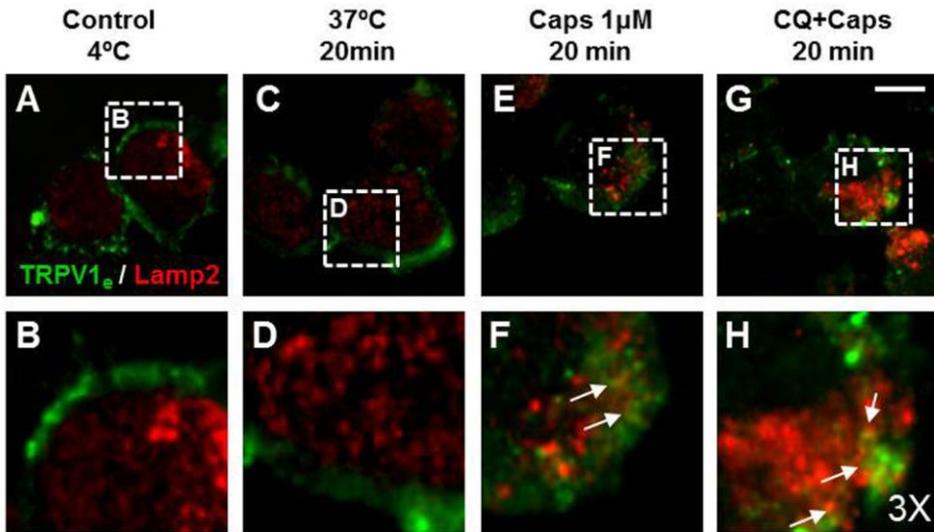


Figura 29.- TRPV1 internalizado por exposición al agonista se localiza en los lisosomas. Marcaje con α -TRPV1e (verde) y α -Lamp2, marcador de lisosomas (rojo), en células HEK293 transfectadas con TRPV1. (A-B) Condiciones de bloqueo de la endocitosis a 4°C. (C-D) Internalización constitutiva. (E-F) Internalización inducida por capsaicina 1 μ M 20 min. Se observa distribución de TRPV1 en los lisosomas. (G-H) Cloroquina (200 μ g/ml 2 h) inhibe la degradación lisosomal, aumentando la población de receptores internalizados que colocalizan con Lamp2. Barra de escala 10 μ m. Zoom 3X.

2.2.- Efecto de los inhibidores de la degradación proteosomal y lisosomal sobre la población de membrana y total de TRPV1.

Con el fin de confirmar y cuantificar bioquímicamente la anterior observación, se emplearon diferentes pretratamientos con inhibidores del proteosoma y de los lisosomas, antes y durante el tratamiento con capsaicina.

Para estudiar el papel del proteosoma en el proceso de degradación se preincubaron las células con el inhibidor proteosomal MG132, a concentración 10 μ M durante 24 h, y posteriormente se aplicó combinado con capsaicina.

RESULTADOS

Como se puede observar en la **figura 30**, el pretratamiento con MG132 no varió significativamente la cantidad de TRPV1 total en condiciones control (vehículo). La cuantificación del **panel B** muestra que tampoco se observaron cambios significativos entre células no tratadas y pretratadas con MG132 tras el tratamiento con capsaicina a dos concentraciones distintas (1 y 10 μM) durante 20 min. Estos resultados sugieren que el proteosoma no estaría participando en la degradación de los receptores TRPV1 internalizados por exposición a capsaicina.

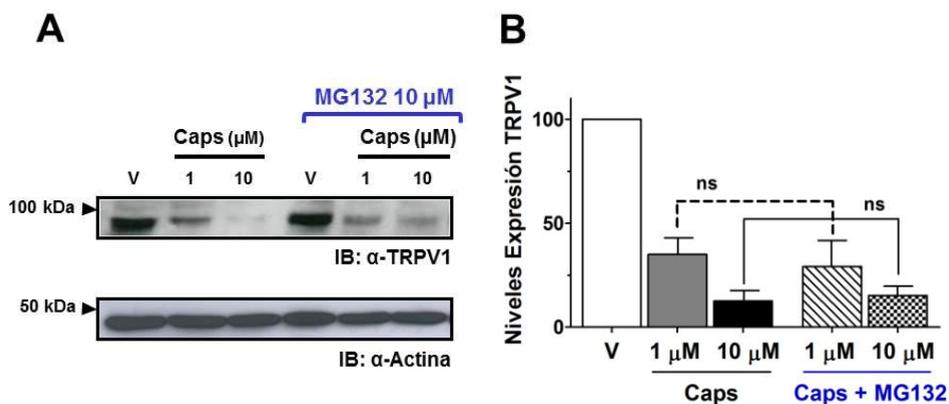


Figura 30.- Proteosoma no participa en la degradación de los receptores TRPV1 internalizados por exposición a capsaicina. (A) *Western blot* de extractos de células HEK293 transfectadas con TRPV1, pretratadas con el inhibidor del proteosoma, MG132 10 μM durante 24h. *WB* representativo de 3 experimentos independientes. (B) Cuantificación de la expresión total de TRPV1. Resultados expresados como media \pm S.E.M. (ns: diferencias no significativas mediante test Mann-Whitney).

El efecto de la inhibición lisosomal también se determinó mediante ensayos de biotilación en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT, para ellos se pretrataron con cloroquina 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 2 horas y durante el tratamiento con capsaicina 1 μM 20 min.

En la **figura 31 paneles A y B**, se observa un significativo aumento en las fracciones de membrana y total de TRPV1 al inhibir la degradación lisosomal con cloroquina comparado con células no pretratadas. El pretratamiento con cloroquina

bloqueó la degradación de TRPV1 internalizado por exposición a capsaicina. Concretamente, los niveles de TRPV1 en la fracción total de células tratadas con cloroquina fue de $83 \pm 2\%$ comparado con $30 \pm 10\%$ en ausencia del inhibidor con respecto a 100% del vehículo. Asimismo, los niveles de TRPV1 en membrana fueron de $85 \pm 1\%$ en presencia del inhibidor de la degradación lisosomal frente a $28 \pm 7\%$ en ausencia de cloroquina con respecto a 100% del vehículo, estos datos sugieren que el pretratamiento con cloroquina también parece bloquear la internalización del receptor TRPV1 inducida por capsaicina.

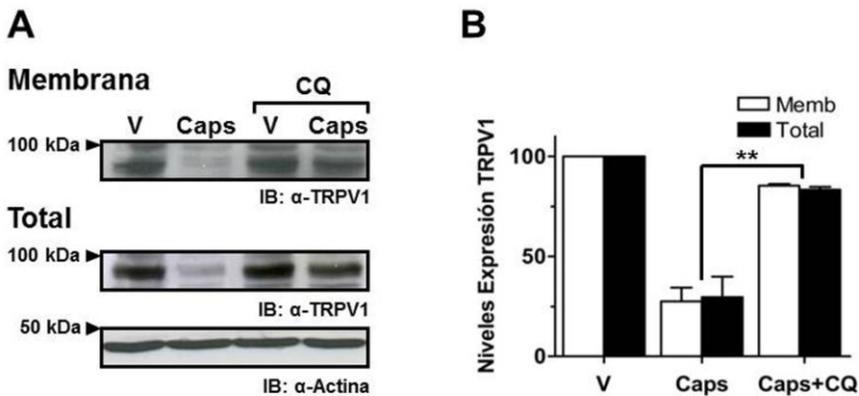


Figura 31.- Cloroquina, un inhibidor de la degradación lisosomal, inhibe la internalización y degradación de TRPV1 tras exposición a capsaicina. (A) Ensayos de biotilación en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT tratadas con o sin cloroquina 200 μ g/ml 2 h antes y durante el tratamiento, con vehículo o capsaicina 1 μ M 20 min a 37°C. *Western blot* representativo de 3 experimentos independientes. (B) Resultados expresados como media \pm S.E.M. (Diferencias significativas ** $p < 0.01$ test Mann-Whitney).

La vía endosomal-lisosomal se caracteriza por un gradiente de acidificación de las vesículas desde los endosomas tempranos hasta los lisosomas, imprescindible entre otras funciones para el transporte y clasificación de las vesículas. Dado que la cloroquina actúa generando la alcalinización generalizada de esta vía, la inhibición de la degradación de TRPV1 que produce este agente podría ser resultado de una inhibición del proceso de internalización

RESULTADOS

del receptor, independiente por tanto de su acción lisosomal. Por ello, decidimos emplear adicionalmente el inhibidor lisosomal leupeptina, que actúa inhibiendo específicamente las proteasas lisosomales.

Como se observa en la **figura 32**, la fracción total de TRPV1 obtenida tras exposición a capsaicina en células pretratadas con leupeptina (75 μ M 10 h) es significativamente mayor ($80 \pm 6\%$) que la obtenida en células no pretratadas con este inhibidor lisosomal ($31 \pm 3\%$, datos expresados respecto a 100% del vehículo). A diferencia de lo ocurrido con cloroquina, la población de membrana de TRPV1 no se vio alterada significativamente por la presencia de leupeptina, este inhibidor de las proteasas lisosomales no bloqueó la internalización de los receptores TRPV1 expuestos al agonista, sino que solo inhibió su degradación lisosomal (**panel B**).

En conjunto, estos resultados indican que la prolongada exposición de TRPV1 a su agonista capsaicina conduce a su internalización y posterior degradación en los lisosomas.

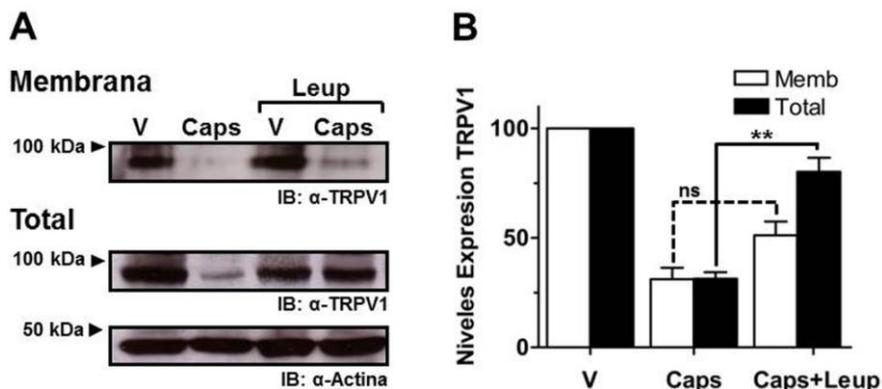


Figura 32.- Leupeptina, inhibidor de proteasas lisosomales, inhibe la degradación lisosomal pero no la internalización del receptor TRPV1 inducida por capsaicina. (A) Ensayos de biotilación en células HEK293 transfectadas con TRPV1, pretratadas con o sin leupeptina 75 μ M 10 h y durante el tratamiento con vehículo o capsaicina 1 μ M 20 min. Se muestra un *western blot* representativo de 3 experimentos independientes. (B) Resultados expresados como media \pm S.E.M. (Diferencias significativas ** $p < 0.01$ con test Mann-Whitney).

3.- Internalización de TRPV1 inducida por capsaicina requiere de la activación del canal.

Hasta este punto hemos determinado que los procesos de internalización y posterior degradación del receptor TRPV1 se producen por la exposición al agonista. Sin embargo cabe la posibilidad de que la unión del ligando al receptor dispare directamente la internalización, o bien que sea necesaria la activación del canal y consiguiente entrada de Ca^{+2} al interior celular. Para discernir ambas posibilidades se emplearon dos estrategias distintas: i) un antagonista competitivo capaz de bloquear el sitio de unión de la capsaicina (Bevan et al., 1992) y ii) un mutante no funcional del receptor TRPV1, que carece de la región del poro del canal y por tanto no permea cationes (Garcia-Sanz et al., 2004).

3.1.- La unión de capsazepina, antagonista competitivo de TRPV1, no provoca la internalización-degradación del receptor.

A fin de determinar si la unión del antagonista vanilloide capsazepina (Cpz), un antagonista competitivo específico de TRPV1 con estructura química y afinidad por TRPV1 muy similares a capsaicina (Bevan et al., 1992), promovía la internalización del receptor se realizaron ensayos de biotinylación.

La **figura 33** muestra que en las células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT e incubadas únicamente con capsazepina 10 μM durante 20 min no se produjo una significativa internalización del receptor, manteniéndose una población en membrana del $86 \pm 2\%$ (datos expresados respecto a 100% del vehículo). Tampoco se observó una degradación de los receptores TRPV1 tras el tratamiento con capsazepina, cuantificándose una población total del $94 \pm 5\%$ (respecto a 100% del vehículo).

RESULTADOS

Curiosamente, cuando las células se trataron con capsaicina 1 μM combinada con capsazepina 10 μM durante 20 min, Cpz bloqueó de forma significativa la internalización y posterior degradación del receptor TRPV1 inducida por Caps. El tratamiento combinado Cpz+Caps produjo una significativa recuperación de las poblaciones en membrana y total de TRPV1 ($\text{TRPV1}_{\text{memb}} = 77 \pm 5\%$; $\text{TRPV1}_{\text{total}} = 78 \pm 2\%$) comparado con la importante internalización y degradación observadas al aplicar solo capsaicina (**figura 33 panel B**).

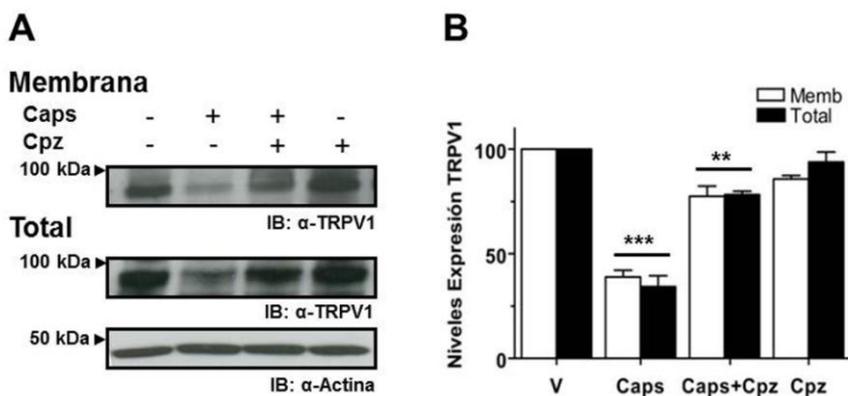


Figura 33.- Capsazepina, antagonista competitivo de TRPV1, bloquea la internalización inducida por capsaicina, recuperando la población en membrana y total del receptor. (A) Ensayos de biotilación con células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT, tratadas con capsaicina 1 μM o Capsazepina 10 μM o ambas 20 min. *Western blot* representativo de 4 experimentos independientes. (B) Resultados expresados como media \pm S.E.M. (Diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ respecto al vehículo mediante test Mann-Whitney).

Estos resultados sugieren que la unión del agonista al receptor, que conduce a la activación del canal, es necesaria para que se produzca la endocitosis.

3.2.- Un mutante de TRPV1 que carece de la región del poro, TRPV1_{PORELESS}, no se internaliza después del tratamiento con capsaicina.

Para determinar si la internalización y posterior degradación de TRPV1 inducidas por exposición al agonista requiere la activación del receptor y la consiguiente entrada de Ca^{+2} , se estudió el proceso de internalización de un mutante no funcional de TRPV1 que tiene delecionada la región del poro iónico, TRPV1_{PORELESS} (García-Sanz et al., 2004). Se llevaron a cabo ensayos de biotilación en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT o con el mutante TRPV1_{PORELESS}, que se trataron con capsaicina a dos concentraciones distintas 1 μ M y 10 μ M durante 20 min.

Como muestra la **figura 34 panel A**, el receptor mutante resultó ser resistente a la internalización y degradación provocadas por el agonista, de hecho su expresión superficial así como su fracción total no se vieron significativamente afectadas al tratar con capsaicina a ambas concentraciones comparado con la importante internalización-degradación que sufre el receptor silvestre.

En este sentido, tras incubar con capsaicina 1 μ M, la cantidad de TRPV1_{PORELESS} en membrana resultó ser del $90 \pm 9\%$ y la cantidad total del $89 \pm 10\%$ (datos expresados respecto a 100% del vehículo). Un aumento de la concentración de capsaicina hasta 10 μ M resultó en valores semejantes, obteniéndose niveles de expresión de TRPV1_{PORELESS} en membrana y total próximos al 80% respecto al 100% del vehículo (**figura 34 panel B**).

Todos estos resultados corroboran que la función del canal TRPV1 es crucial para que se produzca su endocitosis inducida por capsaicina, ya que cuando se compite por el sitio de unión del agonista con un antagonista o se deleciona el poro iónico deja de producirse la internalización.

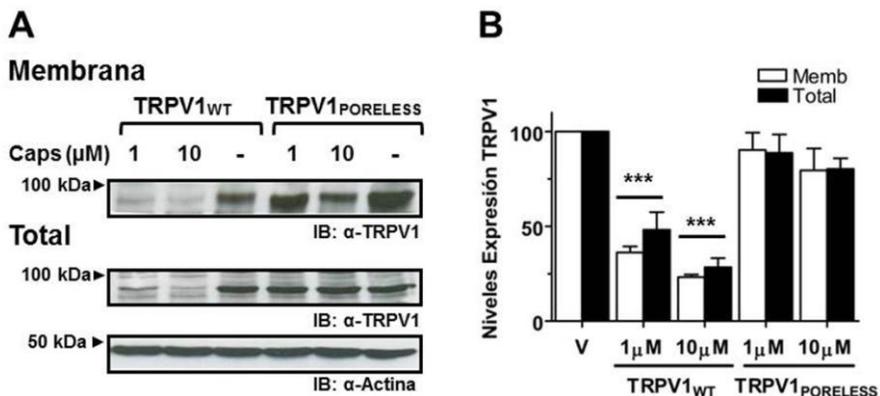


Figura 34.- TRPV1_{PORELESS}, mutante no funcional de TRPV1 con la región del poro iónico delecionada, no se internaliza al tratar prolongadamente con capsaicina. (A) Ensayos de biotilación con células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT o con mutante TRPV1_{PORELESS}, tratadas con capsaicina 1μM y 10μM 20min. *Western blot* representativo de 4 experimentos independientes. (B) Resultados expresados como media ± S.E.M. (*p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 respecto al valor control (vehículo) mediante test Mann-Whitney).

4.- Papel del calcio en la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina.

Dado que el receptor TRPV1 permea preferentemente Ca^{+2} , nos preguntamos si ese aumento citosólico del catión podría ser determinante en el proceso de internalización inducida por exposición al agonista (Koplas et al., 1997). Basándonos en esta hipótesis, se diseñaron diferentes ensayos de biotilación y de electrofisiología con la técnica de sello-perforado, en presencia y ausencia de Ca^{+2} , para determinar el papel del catión en la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina.

4.1.- La entrada de calcio al citosol promueve la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina.

El papel del Ca^{+2} citosólico se evaluó mediante ensayos de biotilación en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT que se incubaron con capsaicina 1 μM 20 min utilizando tres condiciones experimentales diferentes: i) en presencia de 2 mM Ca^{+2} extracelular, ii) en ausencia de Ca^{+2} extracelular (0Ca^{+2}) y iii) 0Ca^{+2} extracelular más BAPTA-AM (50 μM durante 30 min). Este último actúa como un agente permeable a la membrana plasmática, que queda atrapado en el citosol donde es capaz de secuestrar el Ca^{+2} intracelular liberado desde los reservorios intracelulares (van de Graaf et al., 2008).

Como muestra la **figura 35**, en presencia de 2 mM Ca^{+2} extracelular (2Ca^{+2}) las fracciones de membrana y total de TRPV1 disminuyen significativamente tras la exposición prolongada a capsaicina 1 μM , como consecuencia de la internalización y degradación del receptor TRPV1. Sin embargo, en ausencia de calcio extracelular (0Ca^{+2}), el tratamiento prolongado con capsaicina no alteró significativamente las fracciones de membrana y total del receptor TRPV1, permaneciendo un $85 \pm 5\%$ de la población en la membrana y un $82 \pm 8\%$ de la población total respecto a 100% del vehículo. Estos datos mostraron

RESULTADOS

que en ausencia de calcio extracelular la internalización de TRPV1 inducida por agonista disminuye drásticamente. La posible contribución del aumento de Ca^{+2} citosólico desde los reservorios subcelulares se evaluó empleando el quelante de calcio intracelular BAPTA-AM. En estas condiciones, la cantidad de TRPV1 remanente en las fracciones de membrana y total resultaron ser próximas al 90% respecto a 100% del vehículo (**panel B**). Estos datos sugieren que la activación del canal TRPV1 y la entrada de Ca^{+2} a través del poro son imprescindibles para que el receptor se internalice en presencia de su agonista.

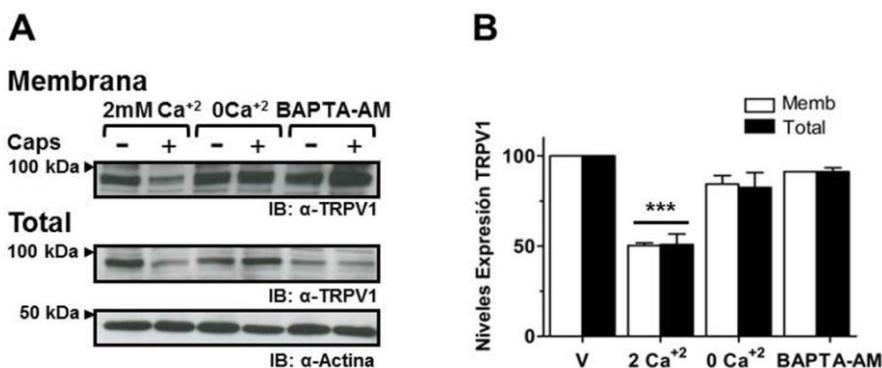


Figura 35.- En ausencia de calcio extracelular, la internalización de TRPV1 inducida por agonista disminuye drásticamente. (A) Ensayos de biotinilación en células HEK293 en presencia de 2 mM Ca^{+2} extracelular, en ausencia de Ca^{+2} (0 Ca^{+2}) solo o con BAPTA-AM (50 μM 30 min). Western blot representativo de 3 experimentos independientes. (B) Resultados expresados como media \pm S.E.M. (Diferencias significativas *** $p < 0.001$ respecto al control (vehículo) mediante test Mann-Whitney).

4.2.- El secuestro de calcio intracelular aumenta la corriente residual tras aplicación prolongada de capsaicina.

Para complementar el estudio del papel del Ca^{+2} en el proceso de internalización de TRPV1 inducido por agonista, se incluyó el tratamiento con el quelante BAPTA-AM en los registros electrofisiológicos realizados mediante la técnica de sello-perforado.

En la **figura 36 panel A** se muestran los registros representativos obtenidos en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT, pretratadas con o sin BAPTA-AM (50 μ M durante 30 min) en respuesta a dos pulsos de pH 6 de 1 min de duración intercalados por la exposición prolongada a capsaicina 1 μ M durante 20 min.

El **panel B** muestra la cuantificación de la relación I_{pH_2}/I_{pH_1} , la intensidad de la corriente máxima del segundo pulso de pH después de tratar con capsaicina respecto a la intensidad de corriente máxima del primer pulso de pH. Al pretratar con BAPTA-AM se observó un incremento de I_{pH_2}/I_{pH_1} de hasta 40% comparado con 13% remanente cuando no se emplea el agente quelante (I_{pH_2}/I_{pH_1} Caps= 0.13 ± 0.02 n=5; I_{pH_2}/I_{pH_1} Caps+BAPTA= 0.39 ± 0.05 n=9, normalizados frente al vehículo I_{pH_2}/I_{pH_1} Veh= 1). El grado de desensibilización inducido por el tratamiento prolongado con capsaicina se redujo en presencia de BAPTA-AM, es decir, el calcio contribuye a la desensibilización a medio-largo plazo de TRPV1 inducida por su agonista.

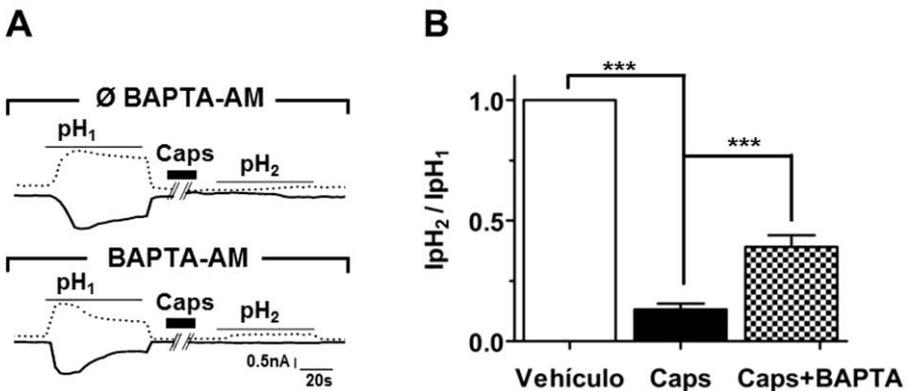


Figura 36.- BAPTA-AM, quelante intracelular de calcio, recupera la corriente residual tras aplicación de capsaicina. (A) Registros representativos electrofisiológicos obtenidos en células tratadas con (parte inferior) o sin BAPTA-AM (parte superior) 50 μ M durante 30 min. Protocolo químico: caps 1 μ M 20 min intercalado entre dos pulsos de 1 min de pH 6. Protocolo de rampas sucesivas de -60 (— línea continua) a +60 mV (---línea discontinua) cada 30 s. (B) Cuantificación de la relación I_{pH_2}/I_{pH_1} para cada tratamiento. Vehículo n=10, Caps n=5 y Caps+BAPTA n=9 (media \pm S.E.M. n=n^o de células *** p< 0.001 test Mann-Whitney).

5.- Determinación del tipo de ruta endocítica seguida por el receptor TRPV1 expuesto a capsaicina.

A fin de determinar el tipo de ruta endocítica que sigue el receptor TRPV1 tras exposición a su agonista, se realizaron ensayos inmunocitoquímicos, de biotilación y medidas de Ca^{+2} intracelular con diferentes inhibidores específicos de las diferentes rutas.

5.1.- Las condiciones hipertónicas bloquean la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina.

En primer lugar, estudiamos si la endocitosis del receptor TRPV1 inducida por su agonista se veía afectada por el tratamiento durante 1 h con una solución hipertónica de sacarosa 250 mM (600 mOsm), empleando ésta como bloqueador inespecífico de la endocitosis. Aunque la hipertonicidad ha sido clásicamente utilizada por su efecto inhibitorio de la endocitosis mediada por clatrin (Hansen et al., 1993), también se ha demostrado que no es específica de esta vía, sino que inhibe otras vías no dependientes de clatrin (Roseberry and Hosey, 2001; Fourgeaud et al., 2003).

Para realizar los registros de Ca^{+2} intracelular se aplicaron dos pulsos de pH 5.5 de 1 min de duración intercalados por una incubación con vehículo o capsaicina 1 μM a distintos tiempos (5, 20 y 60 min), comparando entre células no tratadas y pretratadas con sacarosa hipertónica (250 mM; 600 mOsm; 1 h). Cabe destacar que el tratamiento con/sin sacarosa hipertónica se aplicó previamente pero también se mantuvo durante todo el protocolo de estimulación (ver similar protocolo de estimulación en la **figura 25** de medidas de calcio intracelular).

En la **figura 37 panel A** se muestran los registros representativos de Ca^{+2} intracelular correspondientes a la incubación con capsaicina 1 μM durante 20 min con/sin pretratamiento con sacarosa hipertónica. Se puede apreciar que en medio

hipertónico las células exhibieron una respuesta al segundo pulso de pH considerablemente mayor (línea azul) que en condiciones isotónicas (línea negra).

En el **panel B** se muestra la cuantificación de los valores de R_{pH_2/pH_1} para cada tiempo de exposición a capsaicina 1 μ M, esta relación se empleó como indicador del grado de desensibilización del receptor. En general, en presencia de la solución hipertónica la desensibilización obtenida fue mucho menor comparada con la alcanzada en condiciones isotónicas. Tras el tratamiento con capsaicina 1 μ M durante 20 min se produce un aumento de más del 50% en la relación R_{pH_2/pH_1} en células tratadas con solución hipertónica comparado con el 17% obtenido en condiciones isotónicas ($R_{pH_2/pH_1} = 0.17 \pm 0.01$; $R_{pH_2/pH_1} = 0.51 \pm 0.07$ normalizado frente vehículo $R_{pH_2/pH_1} = 1$).

Este aumento en el valor de R_{pH_2/pH_1} podría atribuirse a una mayor población del receptor en la membrana plasmática tras inhibir la endocitosis mediante el empleo de condiciones hipertónicas.

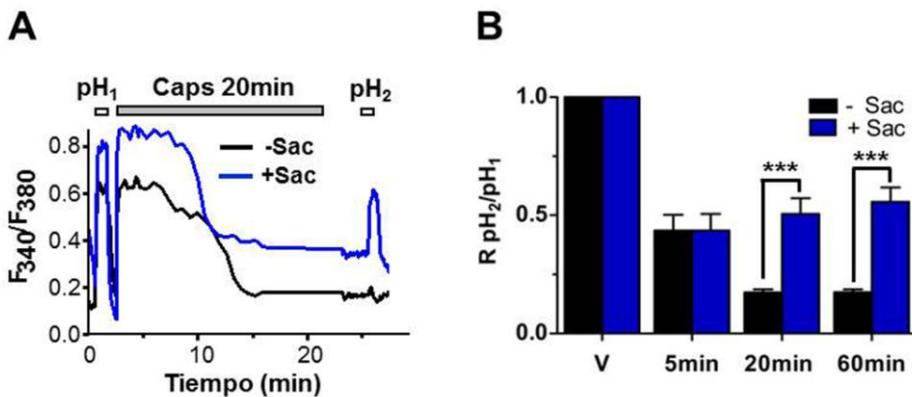


Figura 37.- Sacarosa hipertónica, bloquea inespecíficamente la endocitosis, reduciendo la desensibilización del receptor inducida por capsaicina. Medidas de Ca^{2+} intracelular en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT cargadas con FURA-2AM. (A) Registros representativos de las intensidades de excitación obtenidas a 340 nm y 380 nm, representadas con la relación F_{340}/F_{380} , para capsaicina 1 μ M 20 min (línea negra) y caps junto sacarosa 250 mM (línea azul). (B) Cuantificación de R_{pH_2/pH_1} , relación entre el segundo pulso de pH (pH_2) y el primer pulso de pH (pH_1). Curso temporal de la relación de respuestas al pH, empleando distintos tiempos de incubación con capsaicina 1 μ M: 5, 20 y 60 min. (Vehículo $R_{pH_2/pH_1} = 1$). *** $p < 0.001$ test Mann-Whitney).

RESULTADOS

Curiosamente, observamos que al tratar con capsaicina 1 μM a tiempo corto de 5 min (**figura 37 panel B**), el descenso de RpH_2/pH_1 en condiciones isotónicas no se produjo, comparándolo con el obtenido a tiempos más prolongados, además de no obtenerse diferencias significativas entre los valores de RpH_2/pH_1 para células no tratadas y pretratadas con solución hipertónica. A los 60 min de tratamiento se obtuvieron valores de RpH_2/pH_1 similares a los obtenidos a los 20 min.

Admitiendo que en solución hipertónica estamos inhibiendo la internalización del receptor, este resultado sugiere que el 50% de la disminución de la respuesta se debe a la desensibilización intrínseca del receptor TRPV1 y que ésta ocurre en los primeros 5 min de exposición al agonista y, además, que el 30-35% de desensibilización adicional, visualizada en condiciones isotónicas, resulta de la internalización del receptor.

Para demostrar que efectivamente la disolución hipertónica bloqueaba la internalización de TRPV1, los ensayos funcionales se complementaron con ensayos de biotilación de proteínas de membrana utilizando las mismas condiciones experimentales, células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT tratadas con sacarosa 250 mM 600 mOsm 1 h antes y durante el tratamiento con capsaicina 1 μM durante 20 min.

La **figura 38** muestra que en presencia de medio hipertónico se bloquea la internalización del receptor inducida por capsaicina, ya que mientras en condiciones isotónicas la expresión de TRPV1 en membrana era del $38 \pm 4\%$ en medio hipertónico era del $88 \pm 5\%$.

En resumen, el empleo de condiciones hipertónicas disminuyó significativamente la internalización inducida por capsaicina, correlacionado con una importante reducción de la desensibilización del receptor TRPV1.

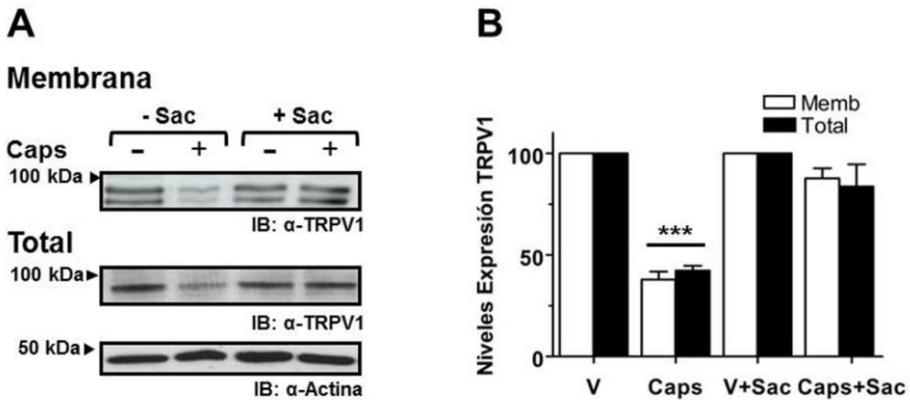


Figura 38.- Internalización de TRPV1 inducida por capsaicina se bloquea en condiciones hipertónicas. (A) Ensayos de biotilación en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT, incubadas con capsaicina, pretratadas con o sin 250 mM sacarosa (600 mOsm) 1 h. Se muestra *western blot* representativo de 3 experimentos independientes. (B) Los resultados de la cuantificación se expresan como media \pm S.E.M. (Diferencias son consideradas significativas cuando $***p < 0.001$ respecto al valor control (vehículo) mediante test Mann-Whitney).

5.2.- La endocitosis de TRPV1 inducida por capsaicina es independiente de la vía de las clatrin.

Dado que la solución hipertónica actúa como un bloqueador inespecífico de la endocitosis, a continuación estudiaremos el tipo de ruta endocítica involucrada en la internalización inducida por capsaicina de TRPV1, empleando diferentes inhibidores específicos de las diversas rutas de endocitosis en ensayos inmunocitoquímicos y medidas de Ca^{+2} intracelular.

Para determinar si la internalización implicaba la vía dependiente de clatrin, cotransfectamos las células HEK293 con TRPV1-WT y el marcador de cadenas ligeras de vesículas de clatrina mLCA-ds-Red (en inglés, *mouse clathrin light chain A*, fusionado al fluoróforo *dsRed*). Las células se pretrataron durante 1 h con solución hipertónica (sacarosa 250 mM 600 mOsm) o isotónica y posteriormente, se incubaron con capsaicina 1 μ M o vehículo durante 20 min en presencia de la solución hipertónica o isotónica respectivamente.

RESULTADOS

Como muestran las imágenes de microscopía confocal de la **figura 39 panel B**, los receptores TRPV1 internalizados (verde) tras la exposición a capsaicina 1 μ M 20 min en condiciones isotónicas no colocalizaron con el marcador de vesículas de clatrina, *mLCA-ds-Red* (rojo), sugiriendo que TRPV1 se internaliza siguiendo una vía independiente de clatrina. Al aplicar la solución hipertónica (Sac+Caps, **panel C**), el marcaje de TRPV1 se localizó predominantemente en la membrana plasmática, debido al bloqueo inespecífico de la endocitosis que produce.

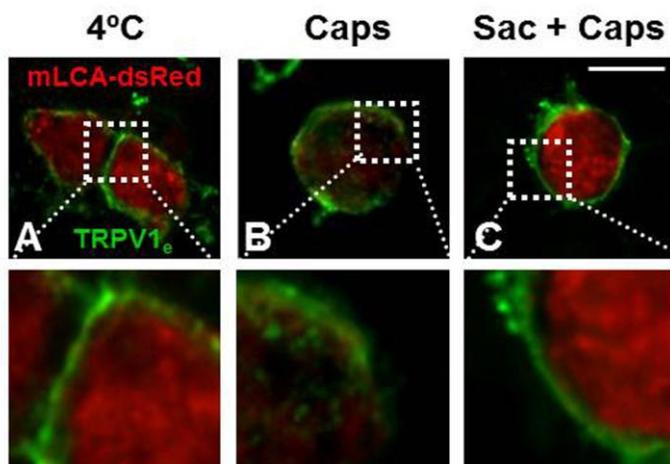


Figura 39.- Los receptores TRPV1 internalizados por capsaicina no colocalizan con el marcador de las cadenas ligeras de las vesículas de clatrina, *mLCA-ds-Red*. Marcaje con α -TRPV1e (verde) y *mLCA-ds-Red* (rojo). (A) Bloqueo de la endocitosis a 4°C. (B) Internalización inducida por capsaicina. (C) Sacarosa bloquea la internalización inducida por capsaicina. Barra de escala 20 μ m. Zoom 3X.

La independencia de la vía de las clatrininas se confirmó mediante preincubación de las células con clorpromacina (Clpz). Clpz es un reactivo capaz de inhibir el ensamblaje de las proteínas adaptadoras tipo 2 (AP-2) con las moléculas de clatrina que están recubriendo las vesículas CCP (en inglés, *clathrin-coated pits*), inhibiendo de esta manera específicamente la endocitosis mediada por clatrininas (Wang et al., 1993).

En los registros de Ca^{+2} intracelular de la **figura 40**, se puede observar como el pretratamiento con Clorpromacina (50 μM , durante 1 h antes y durante tratamiento con capsaicina 1 μM 20 min) (línea verde) no afectó al grado de desensibilización del receptor TRPV1. Específicamente, la relación RpH_2/pH_1 obtenida en presencia de Clpz fue similar a la obtenida en células no pretratadas con Clpz ($\text{RpH}_2/\text{pH}_{1\text{Caps}}=0.157 \pm 0.005$ en ausencia de Clpz vs $\text{RpH}_2/\text{pH}_{1\text{Caps+Clpz}}=0.164 \pm 0.005$ en presencia de Clpz).

Estos resultados sirvieron para corroborar que la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina sigue una ruta independiente de clatrininas.

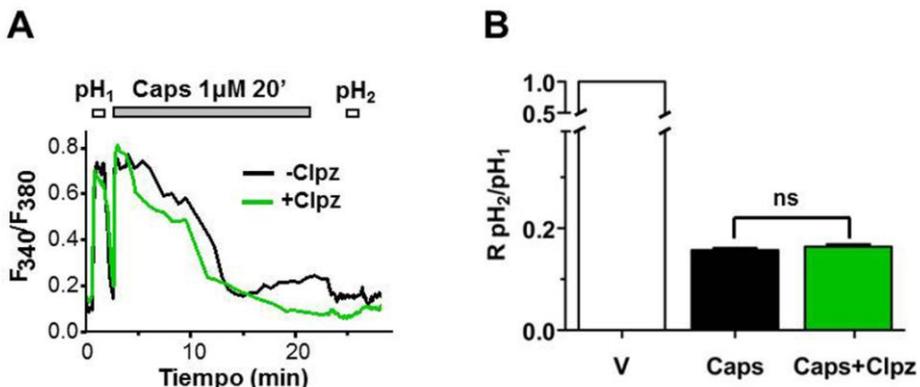


Figura 40.- Clorpromacina, inhibidor de endocitosis mediada por clatrininas, no afecta a la desensibilización de TRPV1 inducida por capsaicina. Medidas de Ca^{+2} intracelular en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT cargadas con FURA-2AM, pretratadas sin (línea negra) o con Clpz 50 μM 1 h (línea verde), posteriormente tratadas con capsaicina 1 μM 20 min. (A) Registros representativos de las intensidades de excitación obtenidas a 340 nm y 380 nm representadas como la relación F_{340}/F_{380} . (B) Cuantificación de RpH_2/pH_1 entre segundo pulso de pH (pH_2) y el primer pulso de pH (pH_1) para cada tratamiento. (Vehículo valor $\text{RpH}_2/\text{pH}_1=1$) (n=182 para vehículo, n=411 capsaicina y n=530 para Caps+Clpz, *** $p < 0.001$ test Mann-Whitney).

5.3.- La endocitosis de TRPV1 inducida por capsaicina es independiente de la vía de las dinaminas.

Las vías endocíticas que son independientes de clatrin pueden a su vez ser dependientes o no de la ruta de las dinaminas (Mayor and Pagano, 2007). Con objeto de evaluar la implicación de las dinaminas en la internalización de TRPV1 inducida por el agonista, cotransfectamos TRPV1 por separado con dos plásmidos fusionados a GFP que codifican la dinamina 1a silvestre (Din-WT) o el mutante K44A, dominante negativo que carece de actividad GTPasa (Din-K44A).

En primer lugar, se determinó el correcto funcionamiento de ambas dinaminas mediante ensayos inmunocitoquímicos estudiando la internalización de la transferrina (Tf), proteína en la que se ha demostrado ampliamente que sigue la ruta clásica de internalización mediada por clatrin y dinaminas (Tosoni et al., 2005). Concretamente, las células transfectadas con cada una de las construcciones fusionadas a GFP, Din-WT y Din-K44A, se incubaron con *Tf-Texas Red* (Tf fusionada a un fluoróforo rojo) en vehículo durante 20 min a 37°C. Como muestran las imágenes de la **figura 41**, se observó una importante colocalización de Tf (rojo) con Din-WT (verde), confirmando que su internalización es dependiente de dinaminas (**panel A**), mientras que las células que sobreexpresan el dominante negativo, Din-K44A, presentan una nula señal de transferrina internalizada (**panel B**).

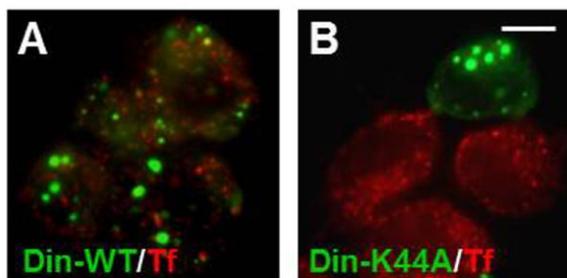


Figura 41.- Estudio de la internalización de transferrina empleando las construcciones dinaminas-GFP. Células HEK293 transfectadas con dinamina silvestre (Din-WT) o con dominante negativo K44A (Din-K44A), se marcaron con Transferrina-Texas Red. (A) Colocalización entre Tf y Din-WT. (B) Dominante negativo Din-K44A bloquea la endocitosis mediada por dinaminas. La señal de Tf desaparece debido al bloqueo de su endocitosis. Barra de escala 10 μ m.

Seguidamente, se ensayó la posible colocalización de los receptores TRPV1 internalizados con ambas construcciones de dinaminas-GFP. Las imágenes de la **figura 42 panel A y C** muestran que en condiciones control (4°C) el receptor TRPV1 (rojo) aparece en la membrana plasmática mientras que las dos dinaminas-GFP, Din-WT y Din-K44A, aparecen intracelularmente distribuidas siguiendo un patrón vesicular (verde). Sin embargo, la incubación con capsaicina (**panel B y D**) provocó la aparición de acúmulos intracelulares de TRPV1 (rojo) que no colocalizan con ninguna de las dos dinaminas-GFP.

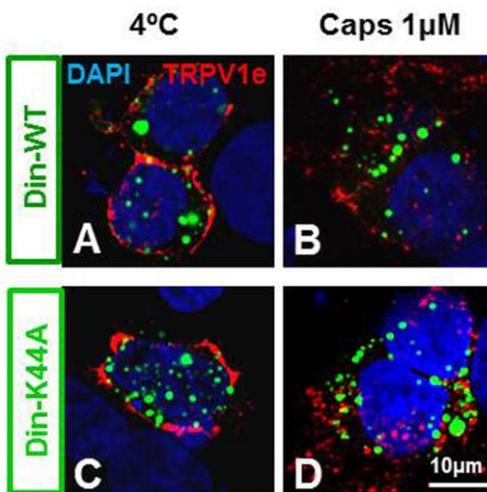


Figura 42.- Din-K44A, el dominante negativo de dinamina 1, no bloquea la internalización de TRPV1 inducida por agonista. Marcaje con α -TRPV1e (rojo) en células HEK293 co-transfectadas con TRPV1-WT y una de las dos dinaminas-GFP: Din-WT (control positivo) y Din-K44A. (A-C) Bloqueo de la endocitosis a 4°C. (B-D) Internalización inducida por capsaicina 1 μ M 20 min. La sobreexpresión del dominante negativo bloquea la endocitosis mediada por dinaminas, sin embargo siguen observándose receptores TRPV1 internalizados. Barra de escala 10 μ m.

RESULTADOS

Por último, el estudio de la independencia de la vía de las dinaminas se completó con registros de Ca^{+2} intracelular, aplicando el protocolo estandarizado de dos pulsos de pH 5.5 de 1 min intercalados por una incubación de 20 min con vehículo o capsaicina 1 μM .

Como ilustra la **figura 43 panel A**, los registros representativos de las medidas de Ca^{+2} intracelular son muy similares para ambas dinaminas-GFP. Al cuantificar los valores de la relación RpH_2/pH_1 no se detectaron cambios significativos en la desensibilización del receptor TRPV1 cuando se compararon los valores de RpH_2/pH_1 obtenidos en ambas construcciones de dinaminas-GFP ($\text{RpH}_2/\text{pH}_1_{\text{DIN-WT Caps}}=0.268\pm 0.009$ frente a $\text{RpH}_2/\text{pH}_1_{\text{DIN-K44A Caps}}=0.259\pm 0.007$) (**panel B**).

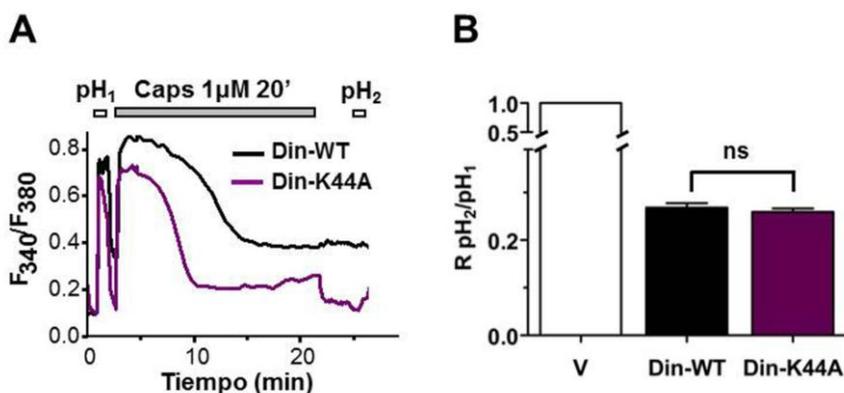


Figura 43.- Dominante negativo de dinamina, Din-K44A, no altera el grado de desensibilización inducido por capsaicina comparado con Din-WT control. Medidas de Ca^{+2} intracelular en células HEK293 cotransfectadas con TRPV1-WT y una de los dos dinaminas-GFP: Din-WT (línea negra) o dominante negativo Din-K44A (línea morada). (A) Registros representativos de F_{340}/F_{380} para ambas dinaminas tratadas con capsaicina 1 μM 20 min. (B) Cuantificación de la relación RpH_2/pH_1 entre el segundo pulso de pH (pH_2) y el primer pulso de pH (pH_1) (Asignado al vehículo valor $\text{RpH}_2/\text{pH}_1=1$, $n=120$ para Vehículo, $n=197$ Din-WT y $n=187$ Din-K44A, *** $p < 0.001$ test Mann-Whitney).

En conjunto, el bloqueo de la endocitosis mediada por dinaminas provocado por la sobreexpresión del dominante negativo Din-K44A nos permite concluir que TRPV1 se internaliza en presencia de capsaicina por un mecanismo de endocitosis independiente de dinaminas y de clatrin.

6.- La fosforilación de TRPV1 por PKA suprime la internalización inducida por capsaicina.

Se ha descrito que la fosforilación de TRPV1 por PKA disminuye la desensibilización dependiente de Ca^{+2} de las corrientes activadas por capsaicina (Mohapatra and Nau, 2005). Además, se sugirió que pudiera existir una correlación entre la expresión superficial de TRPV1 y el papel de PKA en la desensibilización (Bhave et al., 2002). Basándonos en estos estudios, analizamos si la fosforilación por PKA era capaz de modular el proceso de internalización de TRPV1 inducido por el agonista. Para ello, utilizamos activadores e inhibidores de PKA y examinamos la internalización del mutante TRPV1-S116D, que emula el estado fosforilado de TRPV1 por PKA.

6.1.- La fosforilación por PKA provoca una disminución de la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina.

El papel de la fosforilación por PKA como modulador de la internalización inducida por el agonista del receptor TRPV1 se abordó determinando la fracción del receptor superficial mediante ensayos de biotilación de proteínas de membrana, empleando tratamientos con forskolina (FSK), un activador indirecto de PKA, y con H-89, un potente inhibidor de PKA.

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas de DRGs de ratas adultas que se sometieron a un estímulo de 20 min con capsaicina 0.1 μM . En este caso, la concentración de capsaicina empleada fue un orden de magnitud menor que la empleada anteriormente en los cultivos de células HEK293, debido a que EC_{50} para capsaicina es mucho menor para los cultivos neuronales de DRGs (Oh et al., 1996).

RESULTADOS

En la **figura 44** se puede observar como el pretratamiento durante 15 min con FSK 20 μ M inhibe la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina. Específicamente, el tratamiento con capsaicina produjo unos niveles de expresión del receptor en membrana del $36 \pm 5\%$, mientras que el tratamiento combinado de capsaicina con FSK resultó en un $78 \pm 11\%$ respecto a 100% del vehículo. Esta inhibición de la internalización se revirtió cuando las células se incubaron con una mezcla del agonista junto con FSK (20 μ M 15 min) y H-89 (10 μ M 1h), obteniéndose en estas condiciones unos niveles de expresión en membrana de TRPV1 del $44 \pm 5\%$.

Por tanto, la activación de TRPV1 mediada por la fosforilación por PKA bloquea casi totalmente la internalización de TRPV1 inducida por capsaicina.

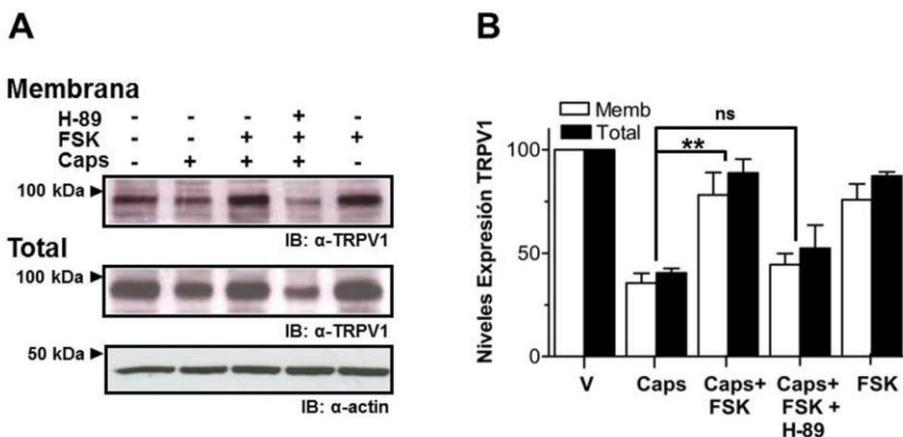


Figura 44.- Activación de la vía PKA disminuye la internalización de TRPV1 inducida por el agonista. (A) Ensayos de biotilación en cultivos primarios de neuronas de DRGs de rata adultas. Se aplicaron distintos tratamientos con: vehículo, capsaicina 0,1 μ M 20 min sola o combinada con FSK 20 μ M 15 min o con H-89 10 μ M 1 h. *Western blot* representativo de 3 experimentos independientes. (B) Resultados expresados como media \pm S.E.M. (Diferencias son consideradas significativas cuando $**p < 0.01$ respecto al valor control (vehículo) mediante test Mann-Whitney).

Esta observación se confirmó empleando un mutante de TRPV1 que sustituye la S116, diana de la acción de PKA sobre TRPV1, por un aminoácido cargado negativamente (D, ácido aspártico), TRPV1-S116D, simulando el estado de fosforilación del receptor. La población en membrana del receptor nativo y del mutante tras la aplicación de vehículo o capsaicina se determinó mediante ensayos de biotinylación de proteínas de membrana en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT o TRPV1-S116D.

Como muestra la **figura 45**, el mutante TRPV1-S116D resultó ser particularmente resistente a la internalización y degradación inducida por capsaicina. Concretamente, alrededor del $\approx 85\%$ de la proteína mutante permaneció en la membrana después de tratar con capsaicina, comparado con el $\approx 35\%$ que permanece en membrana de la proteína silvestre (TRPV1-WT_{MEMB}= 34.5 ± 2.6 vs TRPV1-S116D_{MEMB}= 84.4 ± 1.9).

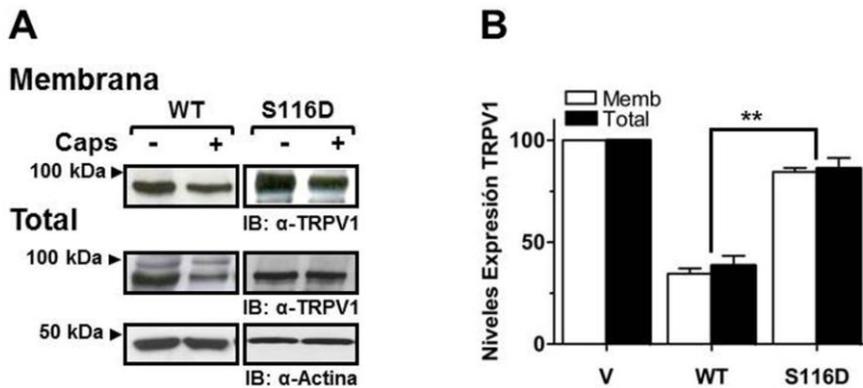


Figura 45.- El mutante TRPV1-S116D muestra un importante descenso en la internalización y posterior degradación inducidas por capsaicina comparado con TRPV1-WT. (A) Ensayos de biotinylación en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT o con TRPV1-S116D, incubadas con capsaicina 1 μ M 20 min. Se muestra un *western blot* representativo de 3 experimentos independientes. (B) Resultados expresados como media \pm S.E.M. (Diferencias son consideradas significativas cuando $**p < 0.01$ respecto al valor control (vehículo) mediante test Mann-Whitney).

RESULTADOS

Estos resultados obtenidos con el mutante TRPV1-S116D fueron paralelamente confirmados mediante ensayos de inmunofluorescencia en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT o TRPV1-S116D. Específicamente, se marcó la población en membrana con el anticuerpo extracelular anti-TRPV1e y se comparó la capacidad de internalización de ambas proteínas tras aplicar el tratamiento con capsaicina 1 μM 20 min. Las imágenes de microscopía confocal de la **figura 46** confirman el bloqueo de la internalización inducida por capsaicina de los receptores TRPV1-S116D, ya que se localizan principalmente en la membrana plasmática y apenas intracelularmente (**panel D**), comparado con los receptores TRPV1-WT que se encuentran mayoritariamente internalizados al aplicar tratamiento con capsaicina (**panel B**).

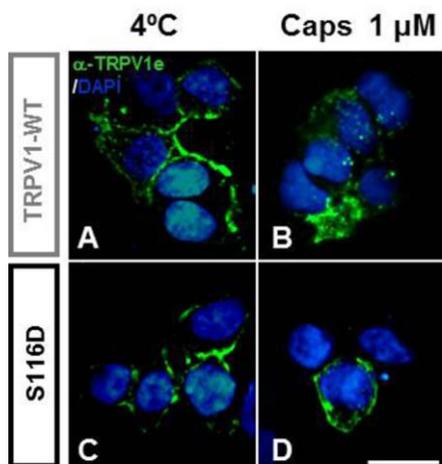


Figura 46.- Mutante TRPV1-S116D sufre una escasa internalización inducida por capsaicina. Marcaje con α -TRPV1e (verde) y núcleos con DAPI (azul) en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT o TRPV1-S116D. (A-C) Bloqueo de la endocitosis a 4°C. (B-D) La exposición a capsaicina 1 μM 20 min no produce la internalización de los receptores TRPV1-S116D. Barra de escala 20 μm .

6.2.- El mutante TRPV1-S116D presenta una significativa reducción de la desensibilización inducida por capsaicina.

Como se demostró anteriormente mediante las medidas de Ca^{+2} intracelular, la exposición prolongada al agonista producía la disminución de la respuesta del receptor al pH. Con el fin de correlacionar la menor internalización de los receptores TRPV1-S116D con una menor desensibilización del canal

mutante, se realizaron registros de Ca^{+2} intracelular en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT o con el mutante TRPV1-S116D que se trataron con capsaicina 1 μM durante 20 min intercalado entre dos pulsos de pH 5.5 de 1 min.

En los registros representativos de la **figura 47** se puede apreciar la significativa disminución de la desensibilización que sufren los receptores TRPV1-S116D, la relación RpH_2/pH_1 aumenta hasta el 37% si se compara con los receptores TRPV1-WT cuya RpH_2/pH_1 es igual a 10% (RpH_2/pH_1 TRPV1-WT Caps=0.105±0.004 vs RpH_2/pH_1 TRPV1-S116D Caps =0.374±0.010 normalizado frente vehículo $\text{RpH}_2/\text{pH}_1=1$).

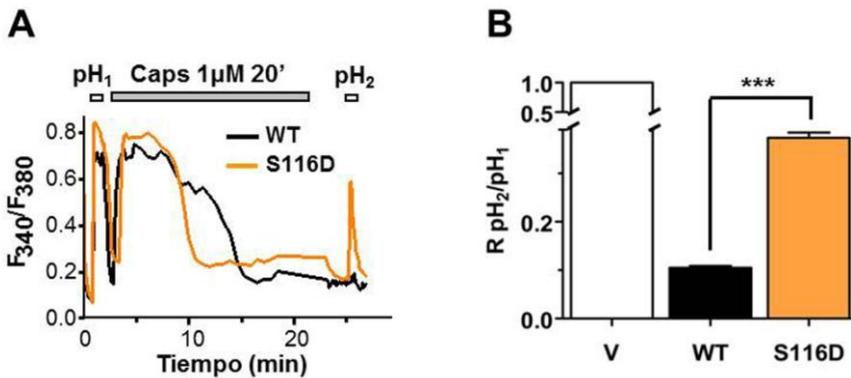


Figura 47.- El mutante TRPV1-S116D presenta una reducida desensibilización inducida por capsaicina. (A) Medidas de Ca^{+2} intracelular en células HEK293 transfectadas con TRPV1-WT (línea negra) o con TRPV1-S116D (línea naranja) aplicando tratamiento con capsaicina 1 μM entre dos pulsos de pH 5.5 de 1 min. (B) Cuantificación de la relación RpH_2/pH_1 entre el segundo pulso de pH (pH₂) y el primer pulso de pH (pH₁) (Vehículo $\text{RpH}_2/\text{pH}_1=1$; n=317 para Vehículo, n=409 TRPV1-WT y n=506 para TRPV1-S116D, *** p< 0.001 test Mann-Whitney).

En resumen, la significativa disminución en la internalización del mutante TRPV1-S116D bajo exposición prolongada a capsaicina contribuye a la mínima desensibilización que sufre, sugiriendo que la internalización inducida podría ser un mecanismo regulatorio de la actividad del receptor TRPV1.

7.- Estudio de la supervivencia celular tras exposición prolongada a capsaicina.

Diversos autores han mostrado que el tratamiento con RTX, potente agonista de TRPV1, produce una notable citotoxicidad generada por la liberación de Ca^{+2} en las neuronas que expresan TRPV1 (TRPV1⁺) (Olah et al., 2001; Karai et al., 2004).

Con objeto de analizar si la internalización de TRPV1 inducida por agonista es un mecanismo asociado a la citotoxicidad celular, realizamos diversos ensayos para determinar la supervivencia de los cultivos celulares en las condiciones experimentales empleadas.

7.1.- Efecto de la capsaicina en la viabilidad de cultivos neuronales de DRGs de ratas neonatales.

En primer lugar, se evaluó el efecto citotóxico de la capsaicina sobre los cultivos primarios de DRGs de ratas neonatales, mediante la técnica *In Cell Analyzer*[®], un método que combina la microscopía de fluorescencia con la citometría de flujo. Así, dada la heterogeneidad de los cultivos primarios de DRGs, pudimos seleccionar primero las neuronas TRPV1+ en la imagen de fluorescencia y posteriormente determinar por citometría de flujo la supervivencia celular 24 h después de aplicar el tratamiento con capsaicina.

En estos ensayos, los cultivos de DRGs fueron tratados con distintas concentraciones de capsaicina (10, 100 y 1000 nM) durante 20 min a 37°C, con vehículo (control) o con un control positivo de muerte celular (Etanol 20%) y tras 24 h se realizó un triple marcaje con: 1) anti-TRPV1-ATTO488, un α -TRPV1 extracelular marcado covalentemente con un fluorocromo verde, 2) Ioduro de Propidio, para distinguir las células muertas (rojo) y 3) Hoescht para detectar el número total de células (azul).

Las imágenes representativas de la **figura 48 panel A** muestran un leve marcaje para Ioduro de Propidio en los cultivos tratados con diferentes concentraciones de capsaicina con respecto al resto de marcajes, lo que sugiere una escasa muerte celular. Tras incubación con capsaicina 10 y 100 nM se obtuvo un alto porcentaje de supervivencia celular ($\approx 75\%$), valor que disminuyó ligeramente (65%) cuando se empleó 1000 nM capsaicina (**panel B**).

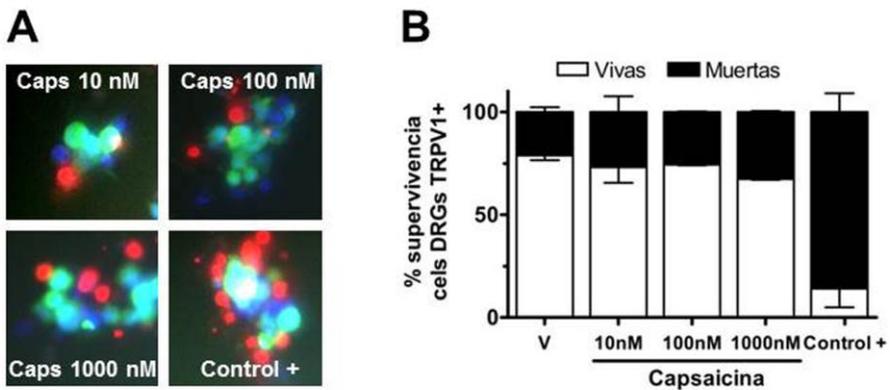


Figura 48.- Viabilidad celular de cultivos neuronales de DRGs de ratas neonatales tras 24 h de la aplicación del tratamiento con capsaicina. (A) Imágenes de fluorescencia obtenidas con *In cell Analyzer*[®] empleando anti-TRPV1-ATTO488 (verde), Ioduro de Propidio (rojo) y Hoechst (azul). (B) Porcentaje de supervivencia de neuronas DRGs TRPV1+. Tratamientos: Vehículo (V), distintas concentraciones de capsaicina 20 min 37°C y control positivo de muerte celular (Etanol 20%).

7.2.- Determinación de la viabilidad celular en sistemas de expresión heteróloga mediante ensayos MTT y citometría de flujo.

Para realizar este ensayo de supervivencia, las células HEK293 que expresan transitoriamente TRPV1-WT se trataron con capsaicina 1 μM o vehículo durante 20 min a 37°C, para posteriormente determinar su viabilidad celular a distintos tiempos post-exposición a capsaicina mediante el ensayo colorimétrico con MTT (Tiazolil azul formazán) (Bollimuntha et al., 2006).

RESULTADOS

La **figura 49 panel A**, muestra los porcentajes de supervivencia celular normalizados respecto a 100% frente a las células transfectadas no tratadas con agonista. Se observó que a todos los tiempos post-exposición a capsaicina ensayados la supervivencia fue siempre superior al 65%, destacando que a $t=0$, medida tomada inmediatamente después de tratar con capsaicina, la viabilidad del cultivo fue $\approx 67\%$.

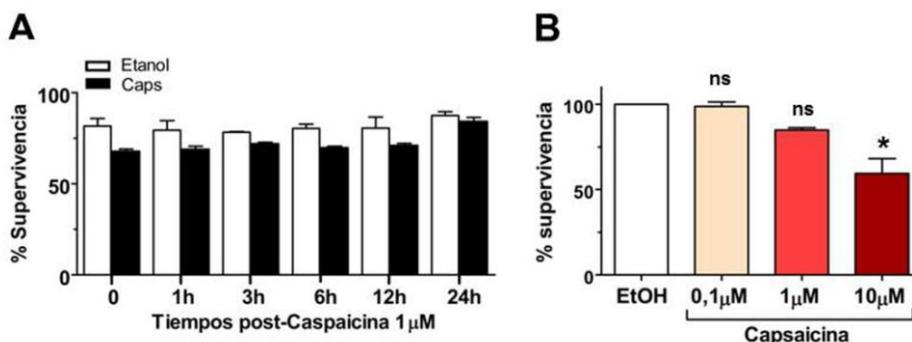


Figura 49.- Estudio de supervivencia de células HEK293 tras aplicación de capsaicina. (A) Ensayos de MTT para determinar % viabilidad total del cultivo a distintos tiempos tras exposición a capsaicina 1 μM 20 min o vehículo. Todos los valores son significativos $*p<0.05$ respecto al valor control (células transfectadas no tratadas=100%). (B) Citometría de flujo de células HEK293 transfectadas con YFP-TRPV1 tratadas 20 min con distintas concentraciones de capsaicina y analizadas 24 h post-tratamiento. Valores son significativos $*p<0.05$ respecto al valor control (Vehículo=100%). Media \pm S.E.M. de 4 experimentos independientes.

Cabe destacar que con este procedimiento no es posible diferenciar únicamente la viabilidad de células TRPV1+, es decir, nos proporciona datos de supervivencia total del cultivo frente al tratamiento con capsaicina o vehículo. Para poder solventar este inconveniente, determinamos la supervivencia celular mediante ensayos de citometría de flujo en células HEK293 transfectadas con YFP-TRPV1, con el objeto de analizar el efecto citotóxico del agonista únicamente en células TRPV1+. Los cultivos celulares se trataron con distintas concentraciones de capsaicina (0.1, 1 y 10 μM) durante 20 min a 37°C, posteriormente se retiró el tratamiento y se determinó la supervivencia celular 24 h después.

Como muestra la **figura 49 panel B**, el porcentaje de células TRPV1+ que sobrevivieron 24 h después de tratar con capsaicina 1 μM fue de $\approx 85\%$. Sin embargo, la exposición a capsaicina 10 μM redujo la supervivencia hasta el 60%.

En resumen, las condiciones experimentales empleadas de forma estandarizada para el estudio de la internalización inducida por agonista (capsaicina 1 μM 20 min 37°C) mantienen un elevado porcentaje de supervivencia celular (85%) pasadas 24 horas del tratamiento.

DISCUSIÓN

La administración de capsaicina, y otros agonistas vanilloides provocan irritación, ardor y dolor, sensación que va seguida de analgesia. De hecho, en la medicina tradicional los chilis picantes se han utilizado por diversas tribus en Asia, América y Oceanía para el tratamiento del dolor, en forma tópica o como infusión. Su acción farmacológica es el resultado de modular la excitabilidad de los nociceptores periféricos que expresan el receptor TRPV1, provocando inicialmente la activación y subsiguiente desensibilización.

De hecho, después de la clonación del receptor TRPV1 en 1997 (Caterina et al., 1997) comenzaron a desarrollarse antagonistas de TRPV1 potencialmente útiles en clínica, que presentaban altos niveles de eficacia y potencia (García-Martínez et al., 2002; Quintanar-Audelo et al., 2007). Sin embargo, muy pocos candidatos progresaron más allá de la fase II de ensayos clínicos debido a la aparición de efectos secundarios imprevistos, tales como la hipertermia (Gavva et al., 2008). Esta limitación inicial provocó que la industria farmacéutica trasladase su esfuerzo hacia el desarrollo de una nueva clase de antagonistas de TRPV1 dependientes de actividad (Vidal-Mosquera et al., 2011), así como a la búsqueda de agonistas de TRPV1 tomando ventaja del proceso de desensibilización que desencadenan en las neuronas nociceptivas (Wong and Gavva, 2009). Actualmente se están realizando ensayos clínicos para diferentes agonistas de TRPV1, como por ejemplo NGX 4010, parches de capsaicina para el tratamiento de la neuropatía asociada al VIH (Simpson et al., 2008).

La capsaicina presenta el inconveniente de ser muy irritante, sin embargo el ultrapotente agonista RTX supone una buena alternativa ya que provoca igualmente una desensibilización a largo plazo, sin producir esos efectos secundarios indeseados. El tratamiento con RTX se ha utilizado usualmente en veterinaria y en humanos se encuentra en fase I de ensayos clínicos. Debido a que su administración sistémica no es factible se ha usado administrada localmente por vías diversas para el tratamiento de múltiples tipos de dolor. Por ejemplo, se emplea administrada por vía intratecal para tratar el dolor en el cáncer avanzado, por vía intravesical para mejorar la función en pacientes con vejiga hiperactiva, o por vía tópica para neuralgias post-herpéticas, polineuropatías

asociadas al virus del VIH y a diabetes (Payne et al., 2005; Kissin and Szallasi, 2011; Iadarola and Mannes, 2011).

La selectividad de los vanilloides sobre TRPV1 ha sido cumplidamente demostrada y la magnitud (curso temporal) de la analgesia depende estrechamente de la dosis y potencia de los distintos agonistas. Así por ejemplo, mientras que la administración de una baja dosis de capsaicina provoca el silenciamiento de los nociceptores, una dosis elevada puede provocar la neurodegeneración de las fibras aferentes primarias (Jancso and Lawson, 1990). Curiosamente, este proceso neurodegenerativo ocurre por la entrada masiva de Ca^{+2} y afecta únicamente a neuronas TRPV1+ (Szallasi and Blumberg, 1989). La citotoxicidad es selectiva ya que las células de la glia o neuronas que no expresan TRPV1 no se ven afectadas. Dependiendo de la dosis y lugar de administración del vanilloide, la analgesia puede durar unas semanas, ser reversible, o convertirse en irreversible por citotoxicidad (Neubert et al., 2003). De hecho, se considera que la desensibilización de TRPV1 es un mecanismo necesario para evitar la sobrecarga de Ca^{+2} tras exposición prolongada o repetida al estímulo nocivo, y en consecuencia, sirve para proteger los nociceptores.

La desensibilización de los nociceptores también depende del tipo de vanilloide, así como de la dosis administrada. De este modo, Toth y colaboradores, aplicando tratamientos con diferentes agonistas del receptor, demostraron que mientras 20 min de exposición a capsaicina o anandamida provocaba una marcada desensibilización, el tratamiento con RTX apenas inducía este efecto (Toth et al., 2005). En este trabajo concluyeron que estructuralmente los distintos agonistas vanilloides eran capaces de inducir una gran diversidad de patrones de respuesta, lo que proporciona un amplio abanico de oportunidades farmacológicas.

Además de desensibilización, la aplicación del potente agonista RTX genera citotoxicidad (Olah et al., 2001; Karai et al., 2004). Por ello, nosotros hemos valorado si el tratamiento aplicado para inducir la internalización del receptor TRPV1 provocaba citotoxicidad celular y en qué magnitud. Para ello empleamos diferentes ensayos de viabilidad que nos permitieron concluir que en

nuestras condiciones experimentales no se producía un descenso significativo de la viabilidad, ni en cultivos celulares que expresaban transitoriamente TRPV1, ni en los cultivos primarios de DRGs.

La desensibilización aguda es aquella que ocurre en los primeros 20 segundos y tiene lugar en la primera exposición al agonista. Este tipo de desensibilización es responsable de la mayor pérdida de capacidad de respuesta de los nociceptores. Las vías de señalización implicadas en la desensibilización aguda del receptor TRPV1 han sido estudiadas extensamente hasta la fecha. Sobre todo destacan tres mecanismos que se cree podrían estar participando de forma simultánea en el proceso: i) la desfosforilación del canal por calcineurina (Docherty et al., 1996; Mandadi et al., 2004; Mohapatra and Nau, 2005), ii) la interacción con CaM (Numazaki et al., 2003; Rosenbaum et al., 2004; Lishko et al., 2007) y iii) la depleción de PIP2 en la membrana plasmática (Liu et al., 2005; Lukacs et al., 2007; Yao and Qin, 2009). Sin embargo, la contribución de la movilización de receptores TRPV1 desde la membrana plasmática a los reservorios intracelulares, es decir, la internalización del receptor como mecanismo para evitar la sobreactividad de los nociceptores no había sido explorada previamente. Curiosamente, en ensayos de unión de agonista, utilizando [³H]-RTX, se ha detectado una menor unión del agonista en el receptor desensibilizado (Jung et al., 2004).

Diversos estudios han demostrado que en condiciones inflamatorias la sensibilización del receptor TRPV1 se alcanza al menos en parte por la traslocación a la membrana plasmática de una población subcelular de vesículas de TRPV1 a través de un proceso de exocitosis regulada (Morenilla-Palao et al., 2004; Zhang et al., 2005; Van Buren et al., 2005; Stein et al., 2006; Camprubi-Robles et al., 2009). Nosotros nos preguntamos si la endocitosis del receptor TRPV1, inducida por la exposición a estímulos nocivos desde la membrana plasmática al interior celular, podría contribuir como mecanismo de control de la excitabilidad de los nociceptores, que se reflejaría funcionalmente como una desensibilización del receptor.

Existen pocos trabajos que hayan abordado la posible internalización de receptores TRP y la nocicepción. Akopian y colaboradores demostraron la internalización del receptor TRPA1 inducida por su agonista el aceite de mostaza, en neuronas sensoriales y sistemas heterólogos, y probaron que la coexpresión de TRPV1 era capaz de inhibir la internalización del receptor (Akopian et al., 2007).

Por otro lado, el tratamiento con RTX en cultivos primarios de DRGs y en células que expresan heterológamente TRPV1 se ha mostrado que promueve una reducción de la capacitancia de más del 70%, descenso asociado con una pérdida de membrana celular. Otros agonistas del receptor como capsaicina o la aplicación de calor también producen un descenso en la capacitancia pero bastante inferior al 10% y la pérdida de membrana no es tan acusada. Cabe destacar que con todos los agonistas ensayados la pérdida de membrana celular requería elevadas concentraciones de Ca^{+2} intracelular (Caudle et al., 2003).

La contribución más relevante y novedosa obtenida con el presente estudio consistió en determinar que la incubación prolongada con el agonista natural capsaicina produce una drástica reducción de la población de receptores TRPV1 tanto en neuronas de DRGs como en sistemas de expresión heteróloga. Con nuestros datos podemos afirmar que la regulación ejercida por el agonista afecta tanto a la población total de receptores TRPV1 como a la población residente en la membrana plasmática, sin descartar que los tratamientos aplicados puedan también influir en la síntesis *de novo* de receptores. Además, hemos determinado que una gran parte de los receptores TRPV1 internalizados terminan siendo degradados en los lisosomas.

Dado que las observaciones en cultivos primarios de DRGs de rata se replicaron en líneas celulares que expresaban TRPV1-WT transitoriamente, decidimos examinar los mecanismos implicados en estos procesos empleando esta última. Datos previos de nuestro grupo, utilizando el mismo sistema de expresión heteróloga, demostraron que TRPV1 se internalizaba menos del 5% tras 90 min de incubación a 37°C en ausencia del agonista (Lainez et al., 2010). En el presente estudio, además de corroborar estos datos, los hemos ampliado, determinando que la internalización del receptor es regulada por sus agonistas

vanilloides capsaicina y RTX, de forma dosis- y tiempo-dependiente y además requiere la activación del canal y la entrada de Ca^{+2} al interior celular. Conjuntamente, también hemos demostrado que la internalización inducida del receptor sigue una ruta independiente de clatrin y dinaminas y que una vez internalizados los receptores son transportados a los lisosomas para su degradación.

Los receptores de membrana pueden ser endocitados siguiendo rutas dependientes o independientes de clatrin (Doherty and McMahon, 2009). Curiosamente la vía de internalización del receptor EGF depende de la dosis de EGF a la que se expone: cuando se incubaba con concentraciones bajas de EGF se internaliza casi exclusivamente a través de una ruta dependiente de clatrin y no se ubiquitina, mientras que a altas concentraciones de EGF lo hace mayoritariamente a través de una ruta independiente de clatrin y es además ubiquitinado (Sigismund et al., 2005). Cabe destacar que TRPV1 puede interactuar con EGFR, facilitando su ubiquitinación y posterior degradación a través de la vía lisosomal (Bode et al., 2009).

Las rutas independientes de dinaminas han sido descritas en diferentes tipos celulares neuronales. En neuronas de DRGs se ha definido otro mecanismo de endocitosis independiente de dinaminas y de Ca^{+2} , que depende de la frecuencia de la actividad neuronal y que está regulado por PKA (Zhang et al., 2004). Dado que esta vía de internalización en DRGs se ha descrito independiente de Ca^{+2} , no podemos considerar que sea la seguida por el receptor TRPV1 tras exposición a vanilloides. Alternativamente, en cultivos de astrocitos se ha descrito una vía endocítica constitutiva independiente de clatrin y dinaminas (Jiang and Chen, 2009). Dicha vía está estrechamente regulada por la concentración de Ca^{+2} intracelular y por la proteína Rab5, una proteína relacionada con los endosomas tempranos. Además, se ha observado que las vesículas endocitadas son transportadas rápidamente desde los endosomas tempranos a los tardíos, para finalmente llegar a los lisosomas. Para determinar la vía concreta de endocitosis seguida por TRPV1 tras exponerse a su agonista, queda por esclarecer si

participan otras proteínas relacionadas con las vías endocíticas como son caveolas o incluso GTPasas como Rab5, RhoA, CDC-42 o Arf-6.

La señalización mediada por PKA juega un papel clave en la plasticidad sináptica en un gran número de receptores y canales iónicos, actuando no solo mediante fosforilación directa de los receptores sino también participando en la modulación del tráfico intracelular de éstos. Por ejemplo, la activación del canal Kv4.2 por PKA en neuronas del hipocampo induce la internalización del canal desde las espinas dendríticas (Hammond et al., 2008). Otro ejemplo es el de los receptores AMPA cuya activación por PKA regula el tráfico de la subunidad GluR1 hasta la membrana plasmática. De hecho, por un lado, la fosforilación de la subunidad GluR1 por PKA incrementa la inserción de receptores AMPA funcionales en la membrana plasmática y disminuye su endocitosis; por otro lado, la desfosforilación de la subunidad GluR1 provoca la internalización de los receptores AMPA inducida por NMDA. Estos autores demostraron los efectos directos de la fosforilación por PKA sobre la plasticidad sináptica en las sinapsis excitatorias a través de la modulación del tráfico de receptores AMPA (Man et al., 2007).

En el caso de los nociceptores periféricos, se sabe que PKA induce la sensibilización por fosforilación directa de TRPV1, y que la desfosforilación de los aminoácidos diana del receptor TRPV1 para PKA (S116 y S502) altera la taquifilaxia del canal (Bhave et al., 2002). Adicionalmente, se ha mostrado que la potenciación de TRPV1 en respuesta a PKA provoca la inserción en la membrana plasmática de multímeros funcionales de TRPV1 a partir de un reservorio intracelular de monómeros inactivos de TRPV1 (Vetter et al., 2006). En nuestro estudio hemos determinado que en cultivos neuronales de DRGs, la activación de PKA inhibe significativamente la internalización de receptores TRPV1 inducida por capsaicina. Para dilucidar si la menor internalización de receptores observada era resultado de un aumento en la velocidad de inserción en la membrana, determinamos el efecto aislado de FSK, sin presencia del agonista, y concluimos que la población de receptores TRPV1 en membrana no aumentaba significativamente al tratar solo con FSK. El hecho de que la internalización

inducida por el agonista se inhiba tras la activación de PKA, se confirmó con el mutante de TRPV1-S116D, que mimetiza el estado de fosforilado del receptor por PKA. La introducción de una carga negativa en la posición 116, además de desencadenar una significativa reducción de la desensibilización inducida por exposición prolongada a capsaicina, produjo una atenuada internalización y degradación comparada con el receptor TRPV1 silvestre. Por tanto, al igual que otros receptores ionotrópicos, parece probable que los procesos de fosforilación-desfosforilación de TRPV1 por la quinasa PKA participen de forma crucial en el tráfico desde o hacia la membrana plasmática, contribuyendo así a la sensibilización-desensibilización de los nociceptores.

En conclusión, con este trabajo hemos demostrado que la exposición prolongada al agonista de cultivos neuronales de DRGs y de células que expresan transitoriamente TRPV1 promueve la endocitosis del receptor y posterior degradación lisosomal. Este proceso requiere la entrada de Ca^{+2} y la activación del canal. Nuestros datos sugieren que sigue una ruta endocítica independiente de clatrin y dinaminas y que está modulado por la fosforilación dependiente de PKA en el aminoácido 116 (Sanz-Salvador et al., 2012). En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que la actividad analgésica de los agonistas capsaicina y RTX se debe, al menos en parte, a la reducción de la expresión de TRPV1 en los nociceptores y proponen la modulación de los niveles de receptores en la membrana plasmática como una estrategia terapéutica para el tratamiento del dolor.

CONCLUSIONES

- La población de membrana del receptor TRPV1 presenta una escasa y lenta internalización constitutiva.
- La incubación prolongada con los agonistas vanilloides produce una drástica reducción de la población de receptores TRPV1 en la membrana plasmática, así como de la fracción total, tanto en neuronas de DRGs como en líneas celulares que expresan transitoriamente el receptor.
- La internalización de TRPV1 inducida por la prolongada exposición al agonista es un proceso dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al vanilloide.
- El receptor TRPV1 se internaliza en presencia de agonista por un mecanismo de endocitosis independiente de clatrin y dinaminas.
- Los receptores TRPV1 internalizados por exposición al agonista son transportados a los lisosomas donde son rápidamente degradados.
- La unión del agonista al receptor TRPV1, la consiguiente activación del canal y entrada de Ca^{+2} a través del poro son imprescindibles para que se produzca la internalización del receptor inducida por agonista.
- La activación de TRPV1 mediada por la fosforilación por PKA bloquea casi totalmente la internalización del receptor inducida por agonista.
- La internalización del receptor no está relacionado con la citotoxicidad, puesto que en las condiciones ensayadas se mantiene un elevado porcentaje de supervivencia celular.

Agonist- and Ca²⁺-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation³

Received for publication, August 4, 2011, and in revised form, March 8, 2012. Published, JBC Papers in Press, April 6, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.289751

Lucía Sanz-Salvador¹, Amparo Andrés-Bordería², Antonio Ferrer-Montiel³, and Rosa Planells-Cases^{4,2}

From the ¹Centro de Investigación Príncipe Felipe, 46012 Valencia, Spain and the ²Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández de Elche, 03202 Elche, Spain

Background: The contribution of TRPV1 trafficking to vanilloid-induced desensitization and tachyphylaxis remains unexplored.

Results: Agonist exposure promotes TRPV1 internalization and degradation in nociceptors and HEK293 cells, in a time-, dose-, and Ca²⁺-dependent manner.

Conclusion: Agonist-induced TRPV1 internalization and degradation notably contribute to long-term nociceptor desensitization.

Significance: Modulation of surface TRPV1 levels could be a therapeutic approach for pain treatment.

TRPV1 receptor agonists such as the vanilloid capsaicin and the potent analog resiniferatoxin are well known potent analgesics. Depending on the vanilloid, dose, and administration site, nociceptor refractoriness may last from minutes up to months, suggesting the contribution of different cellular mechanisms ranging from channel receptor desensitization to Ca²⁺ cytotoxicity of TRPV1-expressing neurons. The molecular mechanisms underlying agonist-induced TRPV1 desensitization and/or tachyphylaxis are still incompletely understood. Here, we report that prolonged exposure of TRPV1 to agonists induces rapid receptor endocytosis and lysosomal degradation in both sensory neurons and recombinant systems. Agonist-induced receptor internalization followed a clathrin- and dynamin-independent endocytic route, triggered by TRPV1 channel activation and Ca²⁺ influx through the receptor. This process appears strongly modulated by PKA-dependent phosphorylation. Taken together, these findings indicate that TRPV1 agonists induce long-term receptor down-regulation by modulating the expression level of the channel through a mechanism that promotes receptor endocytosis and degradation and lend support to the notion that cAMP signaling sensitizes nociceptors through several mechanisms.

Persistent chemical or physical noxious stimulation attenuates nociceptive sensory neuron excitability, making nociceptors partially or totally refractory to subsequent stimuli. Depending on the refractory period, which can range from

minutes and hours up to days, this phenomenon is known as acute desensitization, down-regulation, or defunctionalization. Based on its ability to desensitize nociceptors, the irritant vanilloid capsaicin is therapeutically used in the treatment of postherpetic and trigeminal neuralgia, diabetic neuropathy, and osteoarthritic pain (1, 2). On the other hand, peripheral injury and inflammation can elicit an increase in peripheral nociceptor sensitivity or responsiveness, thereby leading to hyperalgesia and/or allodynia (3). The cellular and molecular mechanisms that elicit either type of adaptation, *i.e.* nociceptor sensitization and refractoriness, substantially overlap with those underlying neuronal plasticity in learning and memory (2, 3).

The transient receptor potential vanilloid TRPV1³ is a non-selective cation channel, highly permeable to Ca²⁺, that plays a key role in the generation and maintenance of nociceptor sensitization and desensitization (for review, see Refs. 4 and 5). TRPV1 integrates multiple and diverse noxious stimuli including physical ($T \geq 42^\circ\text{C}$ and voltage) and chemical (protons, vanilloid compounds, and toxins) stimuli. Although under normal conditions TRPV1 activity is low and individual activators gate the channel with low efficacy and potency, simultaneous release of several mediators during inflammation synergistically acts on TRPV1, leading to enhanced nociceptor excitability. Increased excitability can be achieved by several signaling pathways that may lead to: (i) phosphorylation of TRPV1 that reduces its activation threshold, (ii) recruitment of TRPV1 receptor to the plasma membrane, and (iii) long-term transcriptional/transductional modification (4).

TRPV1 activation by capsaicin is followed by nociceptor desensitization, a state characterized by the inability of the

* This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation Grants SAF2007-63193 and SAF2010-17045 (to R. P. C.), BFU2009-08346 and PROMETEO/2010/046 (to A. F. M.), and Consolider-Ingenio 2010 CSD2008-00005 (to R. P. C. and A. F. M.).

³ This article contains supplemental Fig. 1.

¹ Supported by an Formación del Profesorado Universitario (FPU) Fellowship (Spanish Education Ministry).

² To whom correspondence should be addressed: Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Av. De la Universidad s/n, 03202 Elche, Alicante, Spain. Tel: 34-965222586; Fax 34-966658758; E-mail: rosamplanells@gmail.com.

³ The abbreviations used are: TRPV1, transient receptor potential vanilloid; DRG, dorsal root ganglion; RTX, resiniferatoxin; Dyn, dynamin; BAPTA, 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; BAPTA-AM, 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester; LC3, light chain 3; Sucr, sucrose; Chpz, chlorpromazine; FSK, forskolin; EGFR, epidermal growth factor receptor; Caps, capsaicin; DMSO, dimethyl sulfoxide.

Agonist-induced TRPV1 Internalization and Degradation

receptor to respond to the vanilloid capsaicin or other noxious stimuli. TRPV1 desensitization is a process markedly depending on Ca^{2+} and involves various intracellular signaling pathways (6). Thus, dephosphorylation by the phosphatase calcineurin of TRPV1 previously phosphorylated by protein kinase A (PKA) or Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase II leads to TRPV1 desensitization (7–10). Several other mechanisms like binding of molecules such as calmodulin (11–13), ATP (13), or AKAP150 (14) or the depletion of phosphoinositol 4,5-diphosphate from the plasma membrane (15–18) also modulate receptor desensitization. A simplified hypothesis considers that Ca^{2+} -dependent binding of calmodulin to TRPV1 modulates the fast component of desensitization that relies on Ca^{2+} influx through the channel, whereas Ca^{2+} -dependent phosphorylation/dephosphorylation processes may mediate the slow component of TRPV1 desensitization or tachyphylaxis (7).

In contrast to acute TRPV1 desensitization, the mechanisms involved in capsaicin-induced long-term TRPV1 desensitization are poorly understood. Because proinflammatory sensitization of nociceptors results in TRPV1 recruitment to the plasma membrane, we hypothesized that capsaicin-induced neuronal desensitization may involve TRPV1 withdrawal from the cell surface. Similar to members of other receptor families (19, 20), an activity-dependent tight control of plasma membrane-resident receptors may involve TRPV1 endocytosis followed either by receptor recycling to the plasma membrane or by its degradation through the proteasomal or lysosomal pathway. This would lead to short- or long-term down-regulation, respectively. Here, we report that dose- and time-dependent capsaicin-induced endocytosis of TRPV1 is involved in its pharmacological desensitization. Vanilloid-evoked receptor internalization required TRPV1 channel activity and the influx of Ca^{2+} and was modulated by PKA phosphorylation. Analysis of the vanilloid-induced internalization mechanism showed that it occurs through a clathrin-independent pathway that targets the channel for lysosomal degradation in both DRG neurons and TRPV1-expressing HEK293 cells. Taken together, these results indicate that capsaicin-induced TRPV1 endocytosis and degradation in nociceptors notably contribute to the long-term neuronal tachyphylaxis induced by vanilloids.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and Antibodies—All drugs and antibodies were from Sigma unless otherwise stated. Anti-TRPV1 serum (21), anti-TRPV1 (extracellular) (α -TRPV1e) (Alomone), monoclonal Na^+ - K^+ ATPase (Abcam, Cambridge, UK), and polyclonal anti-calnexin (Chemicon, Billerica, MA) were used. Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Plasmids—Rat wild type TRPV1 (TRPV1-WT) and TRPV1_{PORELESS} mutant were as described in Ref. 22. The non-desensitizing mutant TRPV1-S116D was obtained by site-directed mutagenesis. GFP-tagged wild type and dominant-negative dynamin constructs (GFP-Dyn-WT and Dyn-K44A) were gifts from M. McNiven (Mayo Clinic), and clathrin light chain (mLCA-DsRed) was from I. Pérez-Otaño Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA).

Cell Culture—Primary cultures of neonatal DRG neurons were prepared as in Ref. 23. HEK293 cells were cultured as described (24) and used 48 h after transfection with TurboFect (Fermentas Life Sciences) following the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence-based Internalization Assays—Differential labeling of surface and internalized TRPV1 was obtained as in Ref. 25. Briefly, surface receptors of live cells in DRG primary cultures or transiently TRPV1-expressing (TRPV1⁺) HEK293 cells were labeled 1 h at 4 °C with α -TRPV1e, an antibody recognizing an extracellular epitope. Cells were then incubated 20 min at 37 °C with different capsaicin concentrations (10 nM to 1 μM) or vehicle (0.01% EtOH) to allow internalization. Control cultures were maintained at 4 °C, a condition non-permissive for internalization. Surface receptors were stained with an A488 secondary antibody for 1 h at 4 °C. After washing at 4 °C, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized, and internalized receptors were stained with an A568 secondary antibody, mounted, and analyzed by confocal microscopy (Leica TCS; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

For subcellular colocalization of internalized receptors, HEK293 cells were co-transfected with TRPV1-WT or TRPV1-S116D and DNA encoding organelle-specific fluorescent fusion proteins (mLCA-Red, GFP-Dyn-WT, or GFP-Dyn-K44A). Surface receptors, previously labeled at 4 °C with TRPV1e antibody, were incubated at 37 °C with different capsaicin concentrations or vehicle. Later, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized, and stained with a fluorescently labeled secondary antibody. Samples were analyzed by confocal microscopy.

Biotin Labeling of Surface Proteins—Adult rat DRG cultures or HEK293 cells transiently expressing TRPV1-WT or the mutants TRPV1_{PORELESS} (22) or TRPV1-S116D (7) were exposed to the agonist capsaicin (or resiniferatoxin (RTX)) for different time spans at 37 °C, in the presence or absence of different drugs. Control samples were incubated with vehicle in the same conditions. Surface proteins were biotinylated as in Ref. 24. The absence of contaminating intracellular proteins in membrane fractions was verified by testing the presence of actin. Immunoblots were digitized and quantified.

Ca^{2+} Imaging—TRPV1-WT- or TRPV1-S116D-transfected HEK293 cells were loaded for 1 h at 37 °C with 10 μM Fura-2/AM ester (Biotium, Hayward, CA) in Buffer Solution (in mM: 140 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 5 D-glucose, pH = 7.4, and osmolarity set at 320 mosm/kg with mannitol) as in Ref. 24. For acid solution, HEPES was replaced with MES, and pH was adjusted to 5.5. The applied protocol consisted of two 1-min pulses of acid solution interspersed by a 20-min incubation with either capsaicin or vehicle. For testing endocytosis, cells were pretreated for 30 min (and then maintained throughout the experiment) with 50 μM chlorpromazine or with a hyperosmotic solution (600 mosm/kg), created by supplementing 250 mM sucrose in the Buffer Solution. Fluorescence measurements were performed as in Ref. 24.

Electrophysiology—Currents were recorded at 22 °C in the perforated patch configuration using an EPC-10 amplifier (HEKA, Lambrecht, Germany). Continuous voltage linear

Agonist-induced TRPV1 Internalization and Degradation

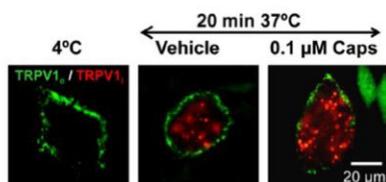
ramps from -60 to $+60$ mV applied every 3 s, from a holding potential of 0 mV, were recorded throughout the entire protocol (two 1-min pulses of pH = 6.0 interspersed by a 20-min treatment with capsaicin or vehicle). Buffer solution was used as control bath solution. For acid pH solution, $50 \mu\text{M}$ amiloride was included to block Acid-sensing ion channels. Pipette solution contained (in mM): 144 KCl; 2 MgCl₂; 10 HEPES; 5 EGTA, pH 7.2, with KOH; ~ 295 mosM/kg, supplemented with 240 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B. The desensitization rate was calculated from normalizing the current magnitude of the second acid application ($I_{\text{pH}2}$) obtained at $+60$ mV to the first ($I_{\text{pH}1}$), $I_{\text{pH}2}/I_{\text{pH}1}$. The Ca²⁺-free external solution (0Ca²⁺) contained no added Ca²⁺ and 1 mM EGTA to chelate ambient Ca²⁺. The role of intracellular Ca²⁺ was tested after a 1-h preincubation with 50 μM BAPTA-AM (Calbiochem) in serum-free medium at 37 °C before recording in 0Ca²⁺.

Statistics—Data are given as mean \pm S.E. with n = number of cells and N = number of experiments. For statistical analysis, the nonparametric Mann-Whitney test or Student's t test was applied. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

RESULTS

Capsaicin Induced TRPV1 Internalization in a Dose- and Time-dependent Manner—Exposure of nociceptors to capsaicin produces an initial excitation followed by a subsequently attenuated, or even abolished, response to additional noxious stimuli (1, 26). To evaluate the contribution of TRPV1 endocytosis to nociceptor desensitization, we initially used a differential immunocytochemical approach to discriminate surface-resident from internalized TRPV1 (25). Specifically, agonist-induced TRPV1 internalization in live DRG neurons was visualized by prelabeling surface receptors at 4 °C in nonpermeabilized cells with an antibody that recognizes an extracellular epitope and then incubating cells with vehicle (0.01% EtOH) or with 100 nM capsaicin for 20 min at 37 °C. Plasma membrane-resident and internalized receptors were differentially stained by first using an A488 secondary antibody in nonpermeabilized cells and, after fixation and permeabilization, labeling internalized receptors with an A568-labeled secondary antibody (25). Although at 4 °C labeled TRPV1 remained at the plasma membrane, incubation at 37 °C led to a partial internalization of receptors from the plasma membrane, as evident from a clear intracellular staining pattern (red) (Fig. 1A). Importantly, receptor endocytosis was significantly accelerated when neurons were exposed to 100 nM capsaicin. Note that although only small fluorescent clusters were observed close to the membrane under control conditions at 37 °C, exposure to capsaicin led to a drastic decrease of plasma membrane receptors (green), and large intracellular clusters containing TRPV1 emerged (red). Similar effects were observed in TRPV1-expressing HEK293 cells. Because different cell-specific factors/pathways might shift the EC₅₀ for capsaicin and hence heterologously expressed TRPV1 may not be as sensitive as the native receptor in neurons, TRPV1⁺ HEK293 cells were exposed to 1 μM capsaicin (Fig. 1B). Altogether, these results indicate that exposure to capsaicin induces a significant TRPV1 channel internalization in both native and recombinant systems.

A Primary DRG neurons



B Transfected HEK293

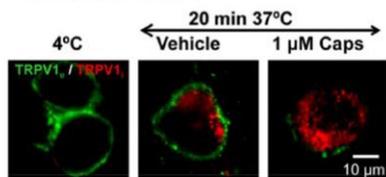


FIGURE 1. Prolonged exposure to capsaicin promotes cell surface TRPV1 internalization. A, representative images of neonatal rat DRG neurons show that incubation with 0.1 μM capsaicin for 20 min redistributes TRPV1 from the cell surface to an intracellular reservoir of large deep clusters as compared with vehicle (0.01% EtOH). A differential labeling method based on Ref. 25 was used. Nonpermeabilized live cell membranes were immunolabeled with anti-TRPV1e (23) and incubated for 20 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1 μM capsaicin, and surface receptors (green) were stained with an A488-labeled secondary antibody at 4 °C. Cells were then fixed, permeabilized, and internalized receptors stained in red. Bar, 20 μm . B, representative images in HEK293 cells transiently expressing the TRPV1 receptor and incubated in the absence or presence of 1 μM capsaicin for 20 min at 37 °C. The same labeling procedure was employed to differentially label internalized receptor from surface receptor. As control, cells were incubated at a temperature (4 °C) that blocks endocytosis. Bar, 10 μm .

We then evaluated the kinetics of TRPV1 internalization and its dependence on the agonist concentration in TRPV1⁺ HEK293 cells (24). These cells were exposed to increasing capsaicin concentrations ranging from 0.1 to 100 μM for 20 min at 37 °C, and surface proteins were then biotinylated with a cleavable biotin label and pulled down with streptavidin-agarose. As shown in Fig. 2A, the vanilloid produced a noticeable decrement of surface TRPV1 in a dose-dependent manner, with an apparent EC₅₀ of 0.5 μM and a maximum surface receptor loss of 90%. The internalization kinetics of plasma membrane TRPV1 at 1 μM capsaicin is shown in Fig. 2C. Receptor endocytosis displayed relatively slow kinetics with an apparent time constant of about 15 min and reached a plateau at roughly 30 min. Extended times did not provoke additional receptor endocytosis, suggesting a tight dependence on the capsaicin concentration.

The responsiveness of remaining receptors, which may have been partially desensitized by capsaicin application, was assessed by Ca²⁺ microfluorography using an experimental paradigm based on the combined application of a supramaximal capsaicin concentration (100 μM) plus acid pH (pH 5.5), pH+100Caps (18), after a 20-min incubation with different capsaicin concentrations. Fig. 2B (left) shows representative traces illustrating a dose-dependent reduction of the transient Ca²⁺ influx obtained upon pH+100Caps pulse that correlates with reduced membrane receptors.

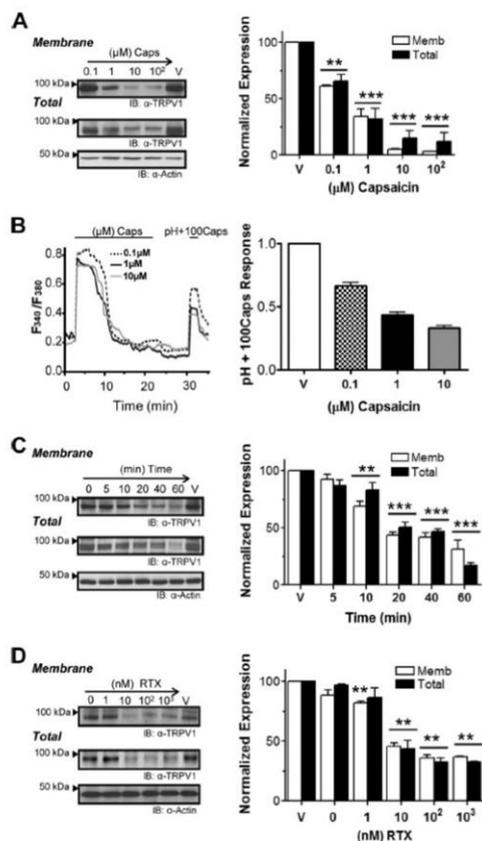


FIGURE 2. Extended incubation with vanilloids leads to TRPV1 down-regulation. *A*, dose-dependent effects of capsaicin on surface and total TRPV1 expression resolved by cell surface biotinylation assays. TRPV1⁺ HEK293 cells were incubated with capsaicin in 0.01% EtOH (ranging from 0.1 to 100 μM) or as control in vehicle (V) (0.01% EtOH) for 20 min at 37 °C. Representative blot (*B*) from four independent experiments shows TRPV1 plasma membrane and total expression (left) and band density quantification (right). **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. *B*, left, representative recordings from Ca²⁺ influx measurements in TRPV1⁺ cells illustrate the maximum responsiveness, obtained by short pulse of high capsaicin (100 μM) plus low pH (5.5) (pH+100Caps), after incubation for 20 min at various capsaicin concentrations. Right, correlation of the pH+100Caps responsiveness to increasing agonist concentrations ($n = 150$, $n = 3$). *C*, time course effect of 1 μM capsaicin incubation from 5 min up to 1 h. $n = 4$. **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$. *D*, dose-dependent effects of RTX on TRPV1 surface and total expression were assayed applying RTX concentrations from 1 nM to 100 nM ($n = 3$). Data represent the mean \pm S.E., and nonparametric Student's *t* test was applied. **, $p < 0.01$.

A similar internalization effect was observed when RTX was used (Fig. 2D). Because RTX is a higher affinity ligand, lower RTX concentrations induced TRPV1 internalization (apparent EC₅₀ of 5 nM). Also note that RTX induced the endocytosis of up to 60% of membrane-resident TRPV1, as compared with the 90% removal promoted by capsaicin. This difference may be attributed to the stronger desensitization promoted by RTX.

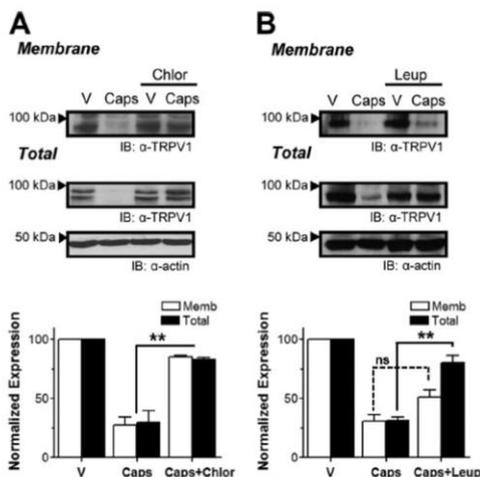


FIGURE 3. TRPV1 internalized in response to vanilloids is targeted to lysosomes. *A* and *B*, representative blot (IB) from cell surface biotinylation assays showing membrane (Memb) and total TRPV1 expression (upper panel) and total band density quantification (lower panel) of TRPV1⁺ cells exposed to vehicle (V) or 1 μM capsaicin in the absence or presence of 200 μg/ml chloroquine (Chlor) (*A*) or 75 μM leupeptin (Leup) (*B*) to inhibit lysosomal proteases. Data represent mean \pm S.E., $n = 3$. **, $p < 0.01$, ns, not significant.

Other TRPV1 agonists such as phorbol esters also evoked receptor endocytosis similar to vanilloids (not shown). Receptor endocytosis evoked by prolonged exposure to TRPV1 agonists was not due to unspecific membrane perturbations of these compounds as evidenced by their lack of effect on the endoplasmic reticulum membrane protein calnexin, a marker of endoplasmic reticulum integrity, or by the lacking effect on other plasma membrane proteins such as the Na⁺-K⁺-ATPase (supplemental Fig. 1). Taken together, these results indicate that agonist-evoked TRPV1 endocytosis is dose- and time-dependent.

Unexpectedly, prolonged exposure of TRPV1⁺ cells to either capsaicin or RTX drastically decreased the total amount of receptors in a dose- and time-dependent fashion, roughly correlating with the proportion removed from the membrane (Fig. 2, *A*, *C*, and *D*). This observation implies that recruited receptors are targeted for degradation through the proteasomal or lysosomal pathways.

Capsaicin-induced Lysosome-dependent Down-regulation of TRPV1 Receptor Expression—Potential pathways possibly involved in agonist-promoted degradation of TRPV1 protein were tested using specific inhibitors. Because the proteasome inhibitor MG132 did not inhibit TRPV1 degradation during capsaicin exposure (not shown), we investigated whether internalized receptors were targeted to lysosomes by preincubating TRPV1⁺ cells with chloroquine or NH₄Cl, which alkalinizes lysosomes and other acidic compartments, or with the protease inhibitor leupeptin. As shown in Fig. 3B, leupeptin largely (80%) stabilized total receptor protein. Interestingly, preincubation with chloroquine also inhibited TRPV1 internalization (Fig.

Agonist-induced TRPV1 Internalization and Degradation

3A). Because excitotoxic insults in some neuronal primary cultures lead to autophagy (27) and vanilloid exposure produced a marked decrease in the expressed TRPV1 protein, the potential role of an autophagic response in TRPV1⁺ cells challenged with capsaicin was examined by monitoring the ratio of Phosphatidylethanolamine-conjugated microtubule-associated protein light chain 3 (LC3-II) to endogenous LC3-I (28). Comparable LC3-II/LC3-I ratios were obtained in vehicle- and capsaicin-treated cells in three independent experiments, suggesting that autophagy was not involved in this process (not shown). Collectively, these results support the view that upon prolonged exposure to agonists, membrane TRPV1 receptors are endocytosed and targeted to lysosomes for degradation.

Agonist-evoked Membrane TRPV1 Internalization Follows a Clathrin- and Dynamin-independent Pathway—The contribution of TRPV1 internalization and kinetics was functionally evaluated by Ca²⁺ imaging using a hypertonic solution (+Sucr). Our experimental paradigm was based in the application of two short acid pH pulses that activate TRPV1, interspersed by exposure to 1 μ M capsaicin or vehicle for different time spans. The ratio of pH responses ($R_{pH2/pH1}$) was used as an indicator of the degree of desensitization. Fig. 4A illustrates representative traces obtained upon a 20-min capsaicin incubation in normosmotic and hyperosmotic conditions. Although control incubations caused only minimal desensitization (data not shown), 5 min of exposure to capsaicin reduced the relative pH response by 50% in both osmotic conditions (Fig. 4A, lower panel). Notably, incubations from 20 min onwards produced drastic differences in the $R_{pH2/pH1}$, virtually abolishing the second pH response ($R_{pH2/pH1} < 0.10$) under isotonic conditions (−Sucr), whereas $R_{pH2/pH1}$ persisted close to 50% when exposed to hyperosmotic medium (+Sucr).

Blockade of agonist-stimulated TRPV1 internalization under hypertonic conditions was further corroborated by both biotinylation and immunocytochemistry of surface receptors in live cells (Fig. 4, B and E). Note that hypertonic solution also reduced receptor degradation (Fig. 4B). Collectively, these results suggest that upon long exposure to capsaicin, at least ~30% of the current loss was because of receptor withdrawal from the plasma membrane.

Because hypertonic solution inhibits both clathrin-mediated and clathrin-independent endocytosis (29–31), we investigated next whether capsaicin-induced TRPV1 internalization occurs through a clathrin-dependent pathway. For this purpose, we first evaluated the effect of 50 μ M chlorpromazine (Chpz), a reagent that prevents clathrin-mediated endocytosis (32). As seen in Fig. 4C, Chpz did not affect the capsaicin-evoked desensitization ratio estimated from Ca²⁺ imaging measurements as compared with Chpz vehicle (0.1% DMSO). The implication of a clathrin-independent pathway was further substantiated by evaluating the effect of coexpressing TRPV1 with a GFP-tagged dominant-negative dynamin mutant (GFP-Dyn-K44A), which we compared with GFP-Dyn-WT as control (33). The correct functionality of both dynamin constructs was corroborated in our cell system by evaluating rhodamine-labeled transferrin endocytosis (not shown). As illustrated in Fig. 4D, neither dynamin construct significantly affected capsaicin-induced desensitization, as evident from the desensitization

ratio ($R_{pH2/pH1} = 0.16 \pm 0.01$ and 0.15 ± 0.01 in GFP-Dyn-K44A and GFP-Dyn-WT, $n = 180$, $n = 5$). Furthermore, colocalization image analysis of labeled internalized TRPV1 with both dynamin constructs displayed a clear distribution consistent with the independence of a clathrin-mediated pathway (Fig. 4F). Therefore, our results imply that agonist-induced TRPV1 membrane removal follows a clathrin-independent internalization mechanism.

Agonist-stimulated TRPV1 Down-regulation Requires Channel Activation and Ca²⁺ Influx—Given that agonist-induced TRPV1 internalization/degradation could be accomplished either by vanilloid binding itself or/and by TRPV1 channel activation and subsequent Ca²⁺ influx, we next explored whether ion flux through the TRPV1 pore was required in this process. First, capsazepine, a specific competitive antagonist with similar affinity as capsaicin (34), was used as a TRPV1 ligand that does not open its pore. As shown in Fig. 5A, incubation with capsazepine alone evoked neither TRPV1 internalization nor its degradation. However, when applied in combination with capsaicin, capsazepine was able to prevent the capsaicin-induced TRPV1 endocytosis. Together, these results indicate that activation of TRPV1 was required to drive its endocytosis and degradation. This notion was further supported by using a non-conducting TRPV1 mutant (TRPV1^{PORELESS}), previously shown to be assembly-competent and to be targeted to the plasma membrane (22). As expected, prolonged exposure of this mutant TRPV1 channel with either 1 μ M or 10 μ M capsaicin did not affect its surface and total expression (Fig. 5B).

Because TRPV1 channels are highly permeable to Ca²⁺ and the divalent cation plays a pivotal role in acute desensitization and tachyphylaxis, we addressed the role of receptor-mediated Ca²⁺ influx in TRPV1 down-regulation upon prolonged agonist exposure. As shown in Fig. 5C, capsaicin produced minor TRPV1 internalization (~15%) in the absence of extracellular Ca²⁺ (0Ca²⁺) as compared with >50% endocytosis in 2 mM Ca²⁺ (2Ca²⁺). We further evaluated a possible contribution of Ca²⁺ released from intracellular stores by preincubating cells with BAPTA-AM to chelate cytosolic Ca²⁺ (0Ca²⁺/BAPTA). This procedure reduced capsaicin-induced TRPV1 internalization to less than 10% of controls.

The contribution of endocytosis to overall receptor desensitization was also assessed using the perforated patch configuration to allow electrical access while maintaining the cellular trafficking machinery virtually undisturbed. As shown in Fig. 5D, we characterized TRPV1 current responses by applying the same protocol as employed for Ca²⁺ imaging recordings. As expected, although the desensitization rate with vehicle was ~20% (not shown), it decreased up to 90% after capsaicin incubation ($I_{pH2}/I_{pH1} = 0.80 \pm 0.08$, $n = 10$, versus 0.09 ± 0.02 , $n = 5$, respectively). Interestingly, when internalization was mostly inhibited (+BAPTA), prolonged application of capsaicin reduced the desensitization by up to 60% ($I_{pH2}/I_{pH1} = 0.36 \pm 0.05$, $n = 9$) (Fig. 5D). Collectively, these findings demonstrate that capsaicin-induced TRPV1 internalization requires receptor activation and Ca²⁺ influx, thus contributing to nociceptor desensitization.

Agonist-induced TRPV1 Internalization and Degradation

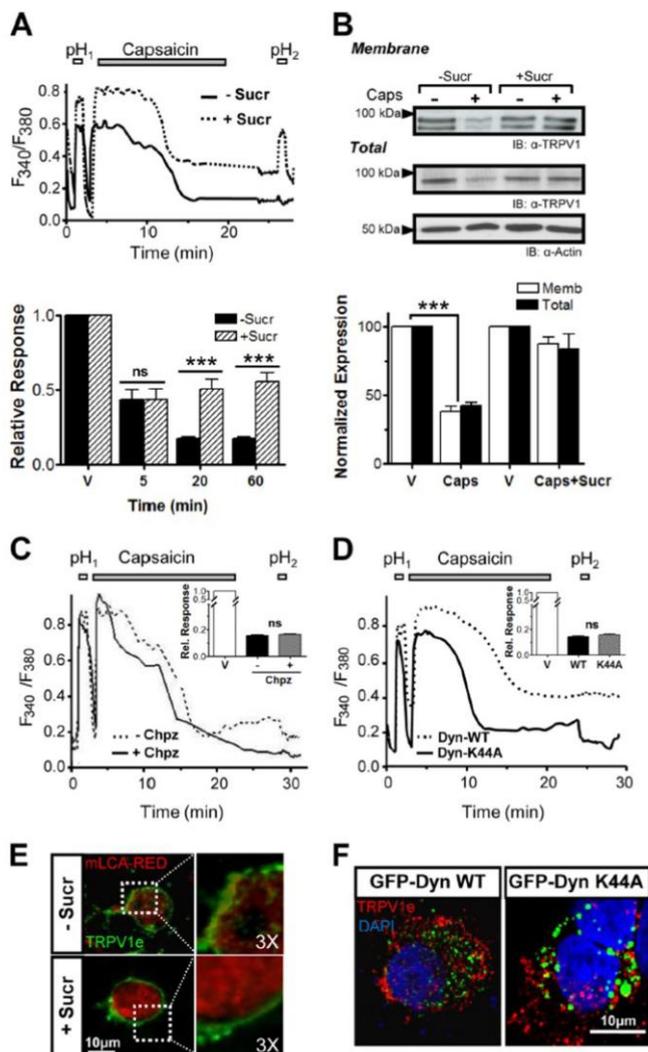


FIGURE 4. Agonist-induced TRPV1 is internalized through a clathrin- and dynamin-independent pathway. *A*, upper panel, representative Ca²⁺ imaging traces in TRPV1⁺ cells in the absence (black) or presence (dotted line) of a hyperosmotic sucrose solution. Two 1-min pH 5.5 pulses, pH₁ and pH₂, were applied interspersed by a 20-min incubation period in the absence (vehicle (V)) or presence of 1 μM capsaicin. Although a significant desensitization (expressed as $R_{pH2/pH1}$) was evident under normosmotic conditions (-Sucr), the constant presence of hyperosmotic solution (+Sucr) significantly reduced capsaicin-induced TRPV1 desensitization. Lower panel, the time course of desensitization, which reaches its maximum after 20 min. ***, $p < 0.001$. ns, not significant. *B*, biotinylation of cell surface proteins in the presence of hyperosmotic 250 mM sucrose solution (600 mosM) reveals a block of capsaicin-induced TRPV1 internalization. $n = 3$. ***, $p < 0.001$. *IB*, representative blot; Memb, membrane. *C*, measurement of Ca²⁺ influx in TRPV1-WT, using the same protocol as in *A*, in the presence of 50 μM Chpz (solid line) as compared with 0.1% DMSO used as Chpz vehicle (dotted line). *Rel. Response*, relative response. *D*, Ca²⁺ influx in TRPV1-WT, using the same protocol as in *A*, in cells co-transfected with GFP-fused WT dynamin (dotted trace) or the dominant-negative mutant GFP-Dyn-K44A (solid trace). Capsaicin-induced internalization occurs through a dynamin-independent process. *E*, representative images of TRPV1⁺ cells expressing red fluorescent fusion protein-mouse clathrin light A (mLCA-RED). TRPV1 was surface-labeled (green) and then allowed to internalize upon incubation with 1 μM capsaicin for 20 min in the presence of hyperosmotic solution (bottom) as compared with normosmotic conditions (top) and then fixed and visualized. Bar, 10 μm. *F*, immunocytochemistry of extracellularly labeled TRPV1 (red) internalized in the presence of 1 μM capsaicin for 20 min in the presence of GFP-fused WT dynamin (left) or the dominant-negative dynamin mutant GFP-Dyn-K44A (right) shows that capsaicin-induced TRPV1 internalization occurs through a dynamin-independent process.

Agonist-induced TRPV1 Internalization and Degradation

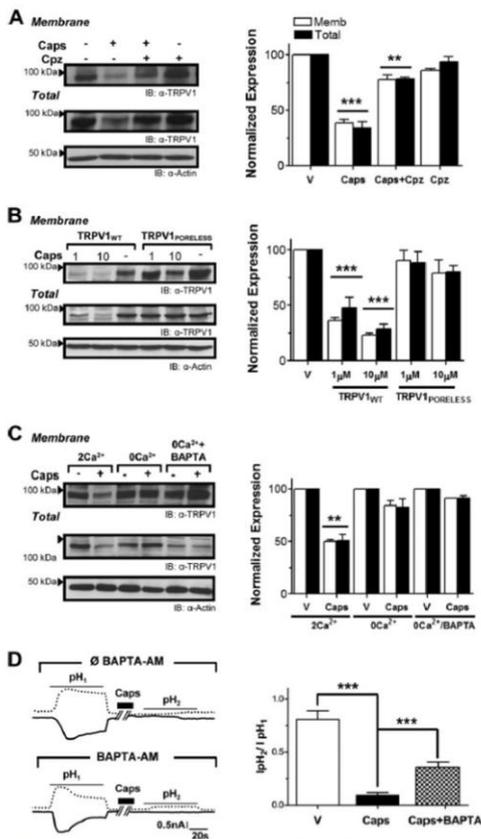


FIGURE 5. TRPV1 down-regulation requires channel activation and Ca^{2+} influx. *A*, the competitive antagonist capsazepine (Cpz; 10 μM) did not elicit TRPV1 endocytosis and competed with capsaicin to induce receptor withdrawal and degradation. Surface-expressed TRPV1 was examined in transfected HEK cells by biotinylation. $n = 4$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. *B*, representative blot; Memb, membrane; V, vehicle. *B*, dose-dependent effects of capsaicin on TRPV1^{PORELESS}, a nonfunctional mutant capable of reaching the cell surface, show the significant resistance to internalization and degradation, even at higher doses of capsaicin. $n = 4$, *** $p < 0.001$. *C*, to assess the involvement of both extracellular Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores, TRPV1-expressing cells were incubated with capsaicin without extracellular Ca^{2+} (0Ca^{2+}) and by chelating intracellular Ca^{2+} with BAPTA ($0\text{Ca}^{2+}/\text{BAPTA-AM}$). $n = 3$. Data are shown as mean \pm S.E. ** $p < 0.01$. *D*, left, representative recordings of TRPV1 expressed in HEK293 cells using perforated patch clamp configuration after prolonged vanilloid exposure. Two 1-min pulses to pH 6 (shown as pH₁ and pH₂) were applied interspersed by a 20-min incubation period with 1 μM capsaicin. To assess the involvement of both extracellular Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores, cells were preincubated with the high affinity Ca^{2+} chelator BAPTA-AM 50 μM for 1 h (Lower trace). Right, desensitization rate was calculated from dividing the second acid-evoked current density (I_{pH2}) by the first (I_{pH1}). $n = 5$ for BAPTA and $n = 9$ for +BAPTA. *** $p < 0.001$.

PKA Activity Modulates Agonist-induced TRPV1 Internalization—cAMP-dependent phosphorylation by PKA, as well as inhibition of the phosphatase calcineurin, potentiates

TRPV1 activity (8). PKA phosphorylation has been also shown to attenuate TRPV1 Ca^{2+} -dependent desensitization (7, 8, 13). More recently, PKA activation was reported to facilitate membrane insertion of functional TRPV1 multimers (35). We therefore investigated the role of PKA in modulating agonist-induced TRPV1 internalization in DRG neurons using surface biotinylation. A 15-min pretreatment with 20 μM forskolin (FSK) reduced agonist-induced TRPV1 internalization ~ 2 -fold (Fig. 6A). This effect was abolished by a 1-h preincubation with the PKA inhibitor H89 (10 μM). To determine whether PKA inhibits TRPV1 internalization by directly phosphorylating the receptor, we mutated its known major PKA phosphorylation site at Ser-116 located in its cytoplasmic N-terminal domain. Specifically, we studied TRPV1-S116D, a point mutation that emulates the PKA-phosphorylated receptor and that has been reported to reduce desensitization (7–9). As illustrated in Fig. 6C, when applying our prolonged agonist exposure protocol (1 μM capsaicin for 20 min), TRPV1-S116D-expressing cells displayed $\sim 60\%$ desensitization ($R_{\text{pH2/pH1}} = 0.37 \pm 0.01$, $n = 506$, $n = 5$) as compared with 90% observed with TRPV1-WT ($R_{\text{pH2/pH1}} = 0.10 \pm 0.01$, $n = 409$, $n = 8$). We then asked whether the observed decrease in desensitization, which agrees with results reported by others (8, 9), is because of decreased internalization of the S116D mutant. Using surface biotinylation/avidin pulldown assays, we found that in contrast to wild type channels, surface levels of TRPV1-S116D were not affected by capsaicin incubation, as revealed by the levels of the mutant protein, which remained similar to those of cells exposed to vehicle (Fig. 6B). This result was further substantiated by immunofluorescence labeling that illustrated that vanilloid had no effect on the internalization of surface-expressed TRPV1-S116D receptors (Fig. 6D). Taken together, these results suggest that capsaicin-induced endocytosis of TRPV1 channels is modulated by PKA phosphorylation of the cytosolic N terminus domain of the protein.

DISCUSSION

Signaling events involved in TRPV1 tachyphylaxis have been extensively investigated. However, the contribution of TRPV1 mobilization from the plasma membrane to intracellular reservoirs as a mechanism to attenuate nociceptor overactivity has not yet been evaluated in detail. We and others have shown that TRPV1 sensitization is achieved at least in part by rapid recruitment of a subcellular population of vesicular TRPV1 that becomes translocated to the plasma membrane by regulated exocytosis under inflammatory conditions (21, 23, 36). Therefore, the opposite mechanism, *i.e.* endocytic removal of TRPV1 from the plasma membrane, seems a plausible mechanism to control nociceptor excitability when exposed to noxious stimuli. Interestingly, TRPV1 internalization triggers mustard oil-induced TRPA1 receptor desensitization (37). Moreover, in RTX toxicity, large and sustained Ca^{2+} influx (38) was accompanied by a $\geq 70\%$ plasma membrane reduction and vesiculation, whereas capsaicin and heat produced less damaging effects and $< 10\%$ of membrane capacitance changes (39). The aim of the present study was to determine whether long agonist exposure regulates cell surface expression of TRPV1 and thereby underlies nociceptor desensitization.

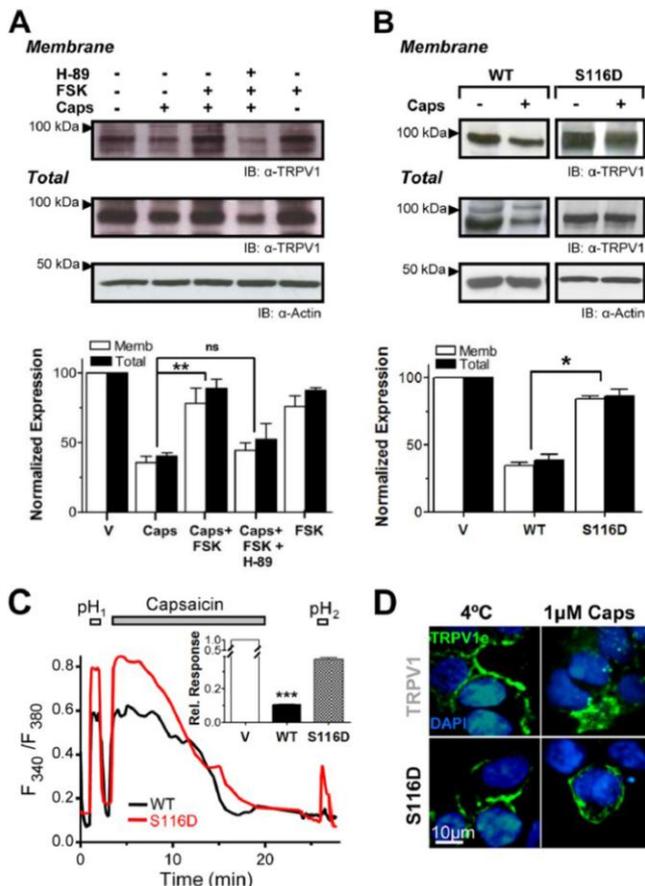


FIGURE 6. PKA activation reduces agonist-induced TRPV1 internalization. *A*, cell surface biotinylation in nociceptor neurons challenged with 0.1 μM capsaicin for 20 min reveals increases in total and plasma membrane (*Memb*) levels of TRPV1 when cells were pretreated with the cAMP-increasing agent FSK (20 μM) (lane 3) as compared with non-FSK (lane 2) or cells incubated with FSK plus the PKA inhibitor H89 (10 μM) (lane 4). *B*, representative blot. Lower, densitometric quantification of three Western blots. *V*, vehicle. *B*, surface biotinylation experiments in TRPV1-WT- or TRPV1-S116D-expressing HEK293 cells exposed to 1 μM capsaicin for 20 min. TRPV1 mutant displayed significant resistance to capsaicin-induced internalization and degradation as compared with WT channels. Data represent the mean \pm S.E. with $n = 3$. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. *ns*, not significant. *C*, measurement of Ca^{2+} influx by Fura-2 imaging in HEK293 cells expressing TRPV1-WT (black trace) or TRPV1-S116D (red trace) after the two 1-min acidic pH pulses interspersed by a 20-min incubation with 1 μM capsaicin. TRPV1-S116D exhibited significant less desensitization than WT channels. *Inset*, average desensitization of TRPV1-WT and TRPV1-S116D estimated from $R_{\text{pH}2/\text{pH}1}$ values ($R_{\text{pH}2/\text{pH}1} = 0.37 \pm 0.01$, $n = 506$ in S116D mutant versus $R_{\text{pH}2/\text{pH}1} = 0.10 \pm 0.01$, $n = 409$ in WT, ***, p value < 0.001). *D*, representative images of surface-expressed TRPV1-WT or TRPV1-S116D exposed for 20 min to capsaicin were labeled with TRPV1e antibody at 4 $^{\circ}\text{C}$, fixed, and permeabilized. Nuclei were stained with DAPI (blue). *Bar* = 10 μm .

The most salient contribution of this study is the demonstration that prolonged incubation with capsaicin produces a drastic reduction of TRPV1 receptors. Although we cannot exclude that these treatments may additionally affect newly synthesized receptors, we found that the down-regulation of TRPV1 affected both its total cellular pool, as well as the plasma membrane population, *i.e.* the receptors that are directly relevant for signaling. Indeed, a large proportion of internalized TRPV1 was degraded. These effects were observed in both primary DRG

neurons and recombinant systems. To gain insights into the mechanisms involved, we used cells transiently expressing TRPV1. They reproduced the robust TRPV1 nociceptor internalization and down-regulation upon long exposure to the agonist. Interestingly, we previously demonstrated in our cell system that in the absence of agonist, less than 5% of plasma membrane TRPV1 was internalized even after 90 min (24). We now found that TRPV1 internalization and down-regulation were mediated not only by natural vanilloids such as capsaicin

Agonist-induced TRPV1 Internalization and Degradation

and RTX, but also by both PKC-stimulating and nonstimulating forms of phorbol 12-myristate 13-acetate (not shown). In the presence of agonist, TRPV1 down-regulation was dose- and time-dependent and required channel activation and Ca^{2+} entry to the cell. Once internalized, TRPV1 is targeted for lysosomal degradation because treatment with different lysosomal inhibitors inhibits TRPV1 degradation.

We found here that upon prolonged agonist exposure, TRPV1 internalization is mediated by a clathrin-independent pathway. This was indicated by agonist-induced receptor endocytosis in cells expressing the dominant-negative dynamin K44A mutant, which blocks pinching of clathrin-coated pits. This conclusion was further bolstered by other experiments using chlorpromazine, a compound that inhibits the formation of clathrin-coated invaginations. Interestingly, TRPV1 has been shown to interact with the tyrosine kinase epidermal growth factor (EGF) receptor (EGFR), facilitating EGFR ubiquitylation (40), which seems to sequester EGFR in clathrin-independent routes (41). Whether prolonged agonist exposure mediates TRPV1 internalization by clathrin-independent endocytosis pathways like caveolae or involves small GTPases (RhoA, CDC-42, or ARF-6) remains to be clarified. Importantly, dynamin-independent endocytotic routes have been described in different cell types, e.g. in astrocytes, as the major pathway that is tightly regulated by cytosolic Ca^{2+} concentration and rab5 (42). Moreover, a dynamin- but Ca^{2+} -independent endocytic mechanism was described in DRG neurons. It was promoted by high frequency or extreme physiological stimulation (42).

PKA signaling seems to play a key role in synaptic plasticity for a number of receptors and ion channels and acts not only by direct receptor or channel phosphorylation, but also by modulating channel trafficking through other means (34, 43, 44). TRPV1 is directly sensitized by cAMP-dependent PKA activation. Thus, PKA phosphorylation of amino acid Ser-116 in TRPV1 attenuates desensitization (tachyphylaxis) (7), and TRPV1 is dephosphorylated upon capsaicin activation. Furthermore, PKA facilitates the insertion of functional TRPV1 multimers into the plasma membrane (35). We now found in native nociceptor cultures that PKA activation significantly inhibited the capsaicin-induced reduction of membrane-resident TRPV1. Although this effect might also be accounted for by an increased membrane insertion rate, we found that plasma membrane levels of TRPV1 were not increased in nociceptors incubated only with FSK, suggesting that indeed agonist-induced internalization is inhibited. Our use of the TRPV1-S116D mutant revealed a direct role of receptor phosphorylation and pinpointed the targeted amino acid. Hence, similar to other ionotropic receptors, it seems likely that PKA phosphorylation/dephosphorylation of TRPV1 plays a key role in specifying trafficking to or from the plasma membrane, thus contributing to sensitization/desensitization of nociceptors.

In conclusion, here we have reported that agonist exposure of DRG neurons and TRPV1-expressing cells promotes receptor endocytosis and down-regulation through lysosomal degradation. This process requires Ca^{2+} entry and appears mediated by an endocytotic mechanism that is independent of clathrin and can be modulated by a PKA-dependent phosphorylation of

serine 116. Our findings lend strong support to the notion that the analgesic activity of capsaicin and RTX is at least in part due to reduction of TRPV1 expression in nociceptors and substantiate that modulation of receptor levels at the plasma membrane as a valid therapeutic strategy for pain treatment.

Acknowledgments—We thank M. McNiven from Mayo Clinic, Rochester, MN for providing GFP-tagged WT dynamin and mutant K44A constructs and mLCA-RED, and we thank I. Pérez-Otaño from Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Navarra, Spain.

REFERENCES

1. Cortright, D. N., and Szallasi, A. (2009) TRP channels and pain. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1736–1749
2. Ji, R. R., and Woolf, C. J. (2001) Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol. Dis.* 8, 1–10
3. Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., and Woolf, C. J. (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 26, 696–705
4. Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Morenilla-Palao, C., and Ferrer-Montiel, A. (2005) Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Dflugers Arch.* 451, 151–159
5. Planells-Cases, R., Valente, P., Ferrer-Montiel, A., Qin, F., and Szallasi, A. (2011) Complex regulation of TRPV1 and related thermo-TRPs: implications for therapeutic intervention. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, 491–515
6. Koplas, P. A., Rosenberg, R. L., and Oxford, G. S. (1997) The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 17, 3525–3537
7. Bhawe, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., Oxford, G. S., and Gereau, R. W. (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35, 721–731
8. Mohapatra, D. P., and Nau, C. (2005) Regulation of Ca^{2+} -dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 13424–13432
9. Mohapatra, D. P., and Nau, C. (2003) Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 50080–50090
10. Jung, J., Shin, J. S., Lee, S. Y., Hwang, S. W., Koo, J., Cho, H., and Oh, U. (2004) Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol. Chem.* 279, 7048–7054
11. Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., and Tominaga, M. (2003) Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8002–8006
12. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., and Gordon, S. E. (2004) Ca^{2+} /calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J. Gen. Physiol.* 123, 53–62
13. Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., and Gaudet, R. (2007) The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54, 905–918
14. Chaudhury, S., Bal, M., Belugin, S., Shapiro, M. S., Jeske, N. A. (2011) AKAP150-mediated TRPV1 sensitization is disrupted by calcium/calmodulin. *Mol. Pain* 7, 34
15. Liu, B., Zhang, C., and Qin, F. (2005) Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurosci.* 25, 4835–4843
16. Lukacs, V., Thyagarajan, B., Varnai, P., Balla, A., Balla, T., and Rohacs, T. (2007) Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J. Neurosci.* 27, 7070–7080
17. Stein, A. T., Ufret-Vincenty, C. A., Hua, L., Santana, L. F., and Gordon, S. E.

Agonist-induced TRPV1 Internalization and Degradation

- (2006) Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* **128**, 509–522
18. Yao, J., and Qin, F. (2009) Interaction with phosphoinositides confers adaptation onto the TRPV1 pain receptor. *PLoS Biol.* **7**, e46
 19. Moser, E., Kargl, J., Whistler, J. L., Waldhoer, M., and Tschische, P. (2010) G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors. *Pharmacology* **86**, 22–29
 20. Murphy, J. E., Padilla, B. E., Hasdemir, B., Cottrell, G. S., and Bunnett, N. W. (2009) Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17615–17622
 21. Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., García-Sanz, N., and Ferrer-Montiel, A. (2004) Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 25665–25672
 22. García-Sanz, N., Fernández-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sánchez, E., Fernández-Ballester, G., and Ferrer-Montiel, A. (2004) Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J. Neurosci.* **24**, 5307–5314
 23. Camprubi-Robles, M., Planells-Cases, R., and Ferrer-Montiel, A. (2009) Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB J.* **23**, 3722–3733
 24. Lainez, S., Valente, P., Ontoria-Oviedo, I., Estévez-Herrera, J., Camprubi-Robles, M., Ferrer-Montiel, A., and Planells-Cases, R. (2010) GABA_A receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *FASEB J.* **24**, 1958–1970
 25. Grampp, T., Sauter, K., Markovic, B., and Benke, D. (2007) γ -Aminobutyric acid type B receptors are constitutively internalized via the clathrin-dependent pathway and targeted to lysosomes for degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 24157–24165
 26. Cortright, D. N., and Szallasi, A. (2004) Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1814–1819
 27. Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Tfofi, E. K., Saiki, S., Siddiqi, F. H., Jahress, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., O'Kane, C. J., Floto, R. A., and Rubinsztein, D. C. (2008) Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 295–305
 28. Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545
 29. Roseberry, A. G., and Hosey, M. M. (2001) Internalization of the M₂ muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J. Cell Sci.* **114**, 739–746
 30. Cinar, H., and Barnes, E. M., Jr. (2001) Clathrin-independent endocytosis of GABA_A receptors in HEK 293 cells. *Biochemistry* **40**, 14030–14036
 31. Fourgeaud, L., Bessis, A. S., Rossignol, F., Pin, J. P., Olivo-Marin, J. C., and Hémar, A. (2003) The metabotropic glutamate receptor mGluR5 is endocytosed by a clathrin-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 12222–12230
 32. Wang, L. H., Rothberg, K. G., and Anderson, R. G. (1993) Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* **123**, 1107–1117
 33. Ricks, T. K., and Trejo, J. (2009) Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization. *J. Biol. Chem.* **284**, 34444–34457
 34. Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, C. S., and Yeats, J. C. (1992) Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neuron excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 544–552
 35. Vetter, I., Wyse, B. D., Monteith, G. R., Roberts-Thomson, S. J., and Cabot, P. J. (2006) The μ opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Mol. Pain* **2**, 22
 36. Zhang, X., Huang, J., and McNaughton, P. A. (2005) NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* **24**, 4211–4223
 37. Akopian, A. N., Ruparel, N. B., Jeske, N. A., and Hargreaves, K. M. (2007) Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist-dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J. Physiol.* **583**, 175–193
 38. Tóth, A., Wang, Y., Kedei, N., Tran, R., Pearce, L. V., Kang, S. U., Jin, M. K., Choi, H. K., Lee, J., and Blumberg, P. M. (2005) Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life Sci.* **76**, 2921–2932
 39. Caudle, R. M., Karai, L., Mena, N., Cooper, B. Y., Mannes, A. J., Perez, F. M., Iadarola, M. J., and Olah, Z. (2003) Resiniferatoxin-induced loss of plasma membrane in vanilloid receptor expressing cells. *Neurotoxicology* **24**, 895–908
 40. Bode, A. M., Cho, Y. Y., Zheng, D., Zhu, F., Ericson, M. E., Ma, W. Y., Yao, K., and Dong, Z. (2009) Transient receptor potential type vanilloid 1 suppresses skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **69**, 905–913
 41. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 2760–2765
 42. Jiang, M., and Chen, G. (2009) Ca²⁺ regulation of dynamin-independent endocytosis in cortical astrocytes. *J. Neurosci.* **29**, 8063–8074
 43. Hammond, R. S., Lin, L., Sidorov, M. S., Wikenheiser, A. M., and Hoffman, D. A. (2008) Protein kinase A mediates activity-dependent Kv4.2 channel trafficking. *J. Neurosci.* **28**, 7513–7519
 44. Man, H. Y., Sekine-Aizawa, Y., and Haganir, R. L. (2007) Regulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 3579–3584

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J., (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 349-360.
- Agnew, D.C, Merskey, H., (1976). Words of chronic pain. *Pain* 2, 73-81.
- Ahern, G.P., Brooks, I.M., Miyares, R.L., and Wang, X.B., (2005). Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J. Neurosci.* 25, 5109-5116.
- Akiba, Y., Furukawa, O., Guth, P.H., Engel, E., Nastaskin, I., and Kaunitz, J.D., (2001). Sensory pathways and cyclooxygenase regulate mucus gel thickness in rat duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G470-4.
- Akopian, A.N., Ruparel, N.B., Jeske, N.A., and Hargreaves, K.M., (2007). Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J. Physiol.* 583, 175-193.
- Aliaga, L., Baños, J., and Barutell, C., (1995). *Tratamiento del dolor: teoría y práctica.* Permanyer Ed. Barcelona.
- Anderson, H.A., Chen, Y., and Norkin, L.C., (1996). Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* 7, 1825-1834.
- Apostolidis, A., Brady, C.M., Yiangou, Y., Davis, J., Fowler, C.J., and Anand, P., (2005). Capsaicin receptor TRPV1 in urothelium of neurogenic human bladders and effect of intravesical resiniferatoxin. *Urology* 65, 400-405.
- Audesirk, T., Audesirk, G., (1996). *Biología. La vida en la tierra.* Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana S.A, México. 4 Edición.
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I.F., Rang, H.P., Shah, K., Walpole, C.S., and Yeats, J.C., (1992). Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107, 544-52.
- Bezzerrides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A., and Clapham, D.E., (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat. Cell Biol.* 6, 709-720.

- Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S., and Gereau, R.W.t., (2002). cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35, 721-31.
- Birder, L.A., Kanai, A.J., de Groat, W.C., Kiss, S., Nealen, M.L., Burke, N.E., Dineley, K.E., Watkins, S., Reynolds, I.J., and Caterina, M.J., (2001). Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13396-13401.
- Birder, L.A., Nakamura, Y., Kiss, S., Nealen, M.L., Barrick, S., Kanai, A.J., Wang, E., Ruiz, G., De Groat, W.C., Apodaca, G., Watkins, S., and Caterina, M.J., (2002). Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat. Neurosci.* 5, 856-860.
- Biro, T., Maurer, M., Modarres, S., Lewin, N.E., Brodie, C., Acs, G., Acs, P., Paus, R., and Blumberg, P.M., (1998). Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood* 91, 1332-1340.
- Bode, A.M., Cho, Y.Y., Zheng, D., Zhu, F., Ericson, M.E., Ma, W.Y., Yao, K., and Dong, Z., (2009). Transient receptor potential type vanilloid 1 suppresses skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 69, 905-913.
- Bollimuntha, S., Ebadi, M., and Singh, B.B. (2006). TRPC1 protects human SH-SY5Y cells against salsolinol-induced cytotoxicity by inhibiting apoptosis. *Brain Res.* 1099, 141-149.
- Bonazzi, M., Spano, S., Turacchio, G., Cericola, C., Valente, C., Colanzi, A., Kweon, H.S., Hsu, V.W., Polishchuck, E.V., Polishchuck, R.S., Sallese, M., Pulvirenti, T., Corda, D., and Luini, A. (2005). CtBP3/BARS drives membrane fission in dynamin-independent transport pathways. *Nat. Cell Biol.* 7, 570-580.
- Buckley, K.M., Melikian, H.E., Provoda, C.J., and Waring, M.T., (2000). Regulation of neuronal function by protein trafficking: a role for the endosomal pathway. *J. Physiol.* 525 Pt 1, 11-19.
- Camprubi-Robles, M., Planells-Cases, R., and Ferrer-Montiel, A., (2009). Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB J* 23, 3722-33.

- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., and Julius, D., (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504, 113-118.
- Carr, M.J., Hunter, D.D., Jacoby, D.B., and Udem, B.J., (2002). Expression of tachykinins in nonnociceptive vagal afferent neurons during respiratory viral infection in guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1071-1075.
- Carroll, R.C., Beattie, E.C., Xia, H., Luscher, C., Altschuler, Y., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., and von Zastrow, M., (1999). Dynamamin-dependent endocytosis of ionotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14112-7.
- Caterina, M.J., Julius, D., (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 487-517.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D., (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D., (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.
- Caudle, R.M., Karai, L., Mena, N., Cooper, B.Y., Mannes, A.J., Perez, F.M., Iadarola, M.J., and Olah, Z., (2003). Resiniferatoxin-induced loss of plasma membrane in vanilloid receptor expressing cells. *Neurotoxicology* 24, 895-908.
- Cerny, A.C., Huber, A., (2011). Regulation of TRP signalling by ion channel translocation between cell compartments. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704, 545-572.
- Cesare, P., McNaughton, P., (1996). A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15435-15439.

- Cesare, P., Dekker, L.V., Sardini, A., Parker, P.J., and McNaughton, P.A., (1999). Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 23, 617-624.
- Chaudhury, S., Bal, M., Belugin, S., Shapiro, M.S., and Jeske, N.A., (2011). AKAP150-mediated TRPV1 sensitization is disrupted by calcium/calmodulin. *Mol. Pain* 7, 34-8069-7-34.
- Cholewinski, A., Burgess, G.M., and Bevan, S., (1993). The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 55, 1015-1023.
- Choudhury, A., Sharma, D.K., Marks, D.L., and Pagano, R.E., (2004). Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. *Mol. Biol. Cell* 15, 4500-4511.
- Ciechanover, A., (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 , 79-87.
- Ciechanover, A., (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17 , 7151-7160.
- Clapham, D.E., (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426 , 517-524.
- Clapham, D.E., Runnels, L.W., and Strubing, C., (2001). The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 2 , 387-396.
- Cortright, D.N., Krause, J.E., and Broom, D.C., (2007). TRP channels and pain. *Biochim. Biophys. Acta* 1772 , 978-988.
- Cosens, D.J., Manning, A., (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224 , 285-287.
- Cui, M., Khanijou, S., Rubino, J., and Aoki, K.R., (2004). Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 107 , 125-133.
- Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S.A., Rance, K., Grau, E., Harper, A.J., Pugh, P.L., Rogers, D.C., Bingham, S., Randall, A., and Sheardown, S.A., (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405 , 183-187.

- de Duve, C., (1963). The lysosome. *Sci. Am.* 208 , 64-72.
- Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A., (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29 , 135-161.
- Docherty, R.J., Yeats, J.C., Bevan, S., and Boddeke, H.W., (1996). Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch.* 431 , 828-837.
- Doherty, G.J., McMahon, H.T., (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78 , 857-902.
- Doly, S., Fischer, J., Salio, C., and Conrath, M., (2004). The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. *Neurosci. Lett.* 357 , 123-126.
- Donaldson, J.G., (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 278 , 41573-41576.
- Esteban, J.A., Shi, S.H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., and Malinow, R., (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat. Neurosci.* 6 , 136-143.
- Fourgeaud, L., Bessis, A.S., Rossignol, F., Pin, J.P., Olivo-Marin, J.C., and Hemar, A., (2003). The metabotropic glutamate receptor mGluR5 is endocytosed by a clathrin-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 278 , 12222-12230.
- Garcia-Martinez, C., Humet, M., Planells-Cases, R., Gomis, A., Caprini, M., Viana, F., De La Pena, E., Sanchez-Baeza, F., Carbonell, T., De Felipe, C., Perez-Paya, E., Belmonte, C., Messeguer, A., and Ferrer-Montiel, A., (2002). Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 , 2374-2379.
- Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G., and Ferrer-Montiel, A., (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 24 , 5307-14.

- Garuti, R., Jones, C., Li, W.P., Michaely, P., Herz, J., Gerard, R.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H., (2005). The modular adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) promotes low density lipoprotein receptor clustering into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* *280* , 40996-41004.
- Gavva, N.R., Treanor, J.J., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bak, A., Darling, M., Gore, A., Jang, G.R., Kessler, J.P., Ni, L., Norman, M.H., Palluconi, G., Rose, M.J., Salfi, M., Tan, E., Romanovsky, A.A., Banfield, C., and Davar, G., (2008). Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* *136* , 202-210.
- Geppetti, P., Trevisani, M., (2004). Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br. J. Pharmacol.* *141* , 1313-1320.
- Ghilardi, J.R., Rohrich, H., Lindsay, T.H., Sevcik, M.A., Schwei, M.J., Kubota, K., Halvorson, K.G., Poblete, J., Chaplan, S.R., Dubin, A.E., Carruthers, N.I., Swanson, D., Kuskowski, M., Flores, C.M., Julius, D., and Mantyh, P.W., (2005). Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *J. Neurosci.* *25* , 3126-3131.
- Goel, M., Zuo, C.D., and Schilling, W.P., (2010). Role of cAMP/PKA signaling cascade in vasopressin-induced trafficking of TRPC3 channels in principal cells of the collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *298* , F988-96.
- Goswami, C., Dreger, M., Jahnel, R., Bogen, O., Gillen, C., and Hucho, F., (2004). Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *J. Neurochem.* *91* , 1092-1103.
- Grampp, T., Sauter, K., Markovic, B., and Benke, D., (2007). Gamma-aminobutyric acid type B receptors are constitutively internalized via the clathrin-dependent pathway and targeted to lysosomes for degradation. *J Biol Chem* *282* , 24157-65.

- Grampp, T., Notz, V., Broll, I., Fischer, N., and Benke, D., (2008). Constitutive, agonist-accelerated, recycling and lysosomal degradation of GABA(B) receptors in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* 39 , 628-37.
- Grant, B.D., Donaldson, J.G., (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 , 597-608.
- Greger, I.H., Esteban, J.A., (2007). AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17 , 289-297.
- Hammond, R.S., Lin, L., Sidorov, M.S., Wikenheiser, A.M., and Hoffman, D.A., (2008). Protein kinase a mediates activity-dependent Kv4.2 channel trafficking. *J. Neurosci.* 28 , 7513-7519.
- Hansen, S.H., Sandvig, K., and van Deurs, B., (1993). Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* 121 , 61-72.
- Harada, N., Okajima, K., Uchiba, M., and Katsuragi, T., (2003). Contribution of capsaicin-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285 , G1214-24.
- Hattula, K., Furuhejm, J., Tikkanen, J., Tanhuanpaa, K., Laakkonen, P., and Peranen, J., (2006). Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *J. Cell. Sci.* 119 , 4866-4877.
- Haugsten, E.M., Zakrzewska, M., Brech, A., Pust, S., Olsnes, S., Sandvig, K., and Wesche, J., (2011). Clathrin- and dynamin-independent endocytosis of FGFR3--implications for signalling. *PLoS One* 6 , e21708.
- Heppelmann, B., Messlinger, K., Schaible, H.G., and Schmidt, R.F., (1991). Nociception and pain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1 , 192-197.
- Herd, C.M., Gozzard, N., and Page, C.P., (1995). Capsaicin pre-treatment prevents the development of antigen-induced airway hyperresponsiveness in neonatally immunised rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 282 , 111-119.
- Hill, R.G., (2001). Molecular basis for the perception of pain. *Neuroscientist* 7 , 282-292.

BIBLIOGRAFÍA

- Holzer, P., (2008). The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nociceptor. *Br. J. Pharmacol.* *155* , 1145-1162.
- Holzer, P., (2004). TRPV1 and the gut: from a tasty receptor for a painful vanilloid to a key player in hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.* *500* , 231-241.
- Holzer, P., Holzer-Petsche, U., (1997). Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol. Ther.* *73* , 219-263.
- Holzer, P., Guth, P.H., (1991). Neuropeptide control of rat gastric mucosal blood flow. Increase by calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide, but not substance P and neurokinin A. *Circ. Res.* *68* , 100-105.
- Horgan, C.P., Oleksy, A., Zhdanov, A.V., Lall, P.Y., White, I.J., Khan, A.R., Futter, C.E., McCaffrey, J.G., and McCaffrey, M.W., (2007). Rab11-FIP3 is critical for the structural integrity of the endosomal recycling compartment. *Traffic* *8* , 414-430.
- Howes, M.T., Mayor, S., and Parton, R.G., (2010). Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22* , 519-527.
- Huang, W., Rubinstein, J., Prieto, A.R., Thang, L.V., and Wang, D.H., (2009). Transient receptor potential vanilloid gene deletion exacerbates inflammation and atypical cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* *53* , 243-250.
- Hunter, D.D., Myers, A.C., and Udem, B.J., (2000). Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *161* , 1985-1990.
- Iadarola, M.J., Mannes, A.J., (2011). The vanilloid agonist resiniferatoxin for interventional-based pain control. *Curr. Top. Med. Chem.* *11* , 2171-2179.
- IASP Pain terms., (1986). A current list with definitions and notes on usage.

- Iida, T., Shimizu, I., Nealen, M.L., Campbell, A., and Caterina, M., (2005). Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. *Neurosci. Lett.* *378* , 28-33.
- Inoue, A., Okabe, S., (2003). The dynamic organization of postsynaptic proteins: translocating molecules regulate synaptic function. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13* , 332-340.
- Inoue, K., Koizumi, S., Fuziwara, S., Denda, S., Inoue, K., and Denda, M., (2002). Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *291* , 124-129.
- Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T.C., (2003). Membrane fusion. *Cell* *112* , 519-533.
- Jancso, G., Lawson, S.N., (1990). Transganglionic degeneration of capsaicin-sensitive C-fiber primary afferent terminals. *Neuroscience* *39* , 501-511.
- Jeske, N.A., Patwardhan, A.M., Henry, M.A., and Milam, S.B., (2009). Fibronectin stimulates TRPV1 translocation in primary sensory neurons. *J. Neurochem.* *108* , 591-600.
- Ji, R.R., Woolf, C.J., (2001). Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol. Dis.* *8* , 1-10.
- Ji, R.R., Kohno, T., Moore, K.A., and Woolf, C.J., (2003). Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* *26* , 696-705.
- Jiang, M., Chen, G., (2009). Ca²⁺ regulation of dynamin-independent endocytosis in cortical astrocytes. *J. Neurosci.* *29* , 8063-8074.
- Jordt, S.E., McKemy, D.D., and Julius, D., (2003). Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13* , 487-492.
- Julius, D., Basbaum, A.I., (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* *413* , 203-210.

- Jung, J., Shin, J.S., Lee, S.Y., Hwang, S.W., Koo, J., Cho, H., and Oh, U., (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J. Biol. Chem.* 279 , 7048-7054.
- Kandel, ER, Schwartz, JH, Jessell, TM. (2001). *Principios de Neurociencia*. Ed.McGraw-Hill. Interamericana. Madrid. 4ª edición.
- Kanzaki, M., Zhang, Y.Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., and Kojima, I., (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat. Cell Biol.* 1 , 165-170.
- Karai, L., Brown, D.C., Mannes, A.J., Connelly, S.T., Brown, J., Gandai, M., Wellisch, O.M., Neubert, J.K., Olah, Z., and Iadarola, M.J., (2004). Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J. Clin. Invest.* 113 , 1344-1352.
- Karlsson, J.A., (1993). A role for capsaicin sensitive, tachykinin containing nerves in chronic coughing and sneezing but not in asthma: a hypothesis. *Thorax* 48 , 396-400.
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22 , 407-417.
- Kehlet, H., Dahl, J.B., (1993). The value of "multimodal" or "balanced analgesia" in postoperative pain treatment. *Anesth. Analg.* 77 , 1048-1056.
- Kim, A.Y., Tang, Z., Liu, Q., Patel, K.N., Maag, D., Geng, Y., and Dong, X., (2008). Pirt, a phosphoinositide-binding protein, functions as a regulatory subunit of TRPV1. *Cell* 133 , 475-485.
- Kim, S.R., Lee, D.Y., Chung, E.S., Oh, U.T., Kim, S.U., and Jin, B.K., (2005). Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 25 , 662-671.
- Kissin, I., Szallasi, A., (2011). Therapeutic targeting of TRPV1 by resiniferatoxin, from preclinical studies to clinical trials. *Curr. Top. Med. Chem.* 11 , 2159-2170.
- Klein, R.M., Ufret-Vincenty, C.A., Hua, L., and Gordon, S.E., (2008). Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation.

- Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PI(4,5)P₂) is the endogenous lipid regulating TRPV1. *J. Biol. Chem.* **283**, 26208-26216.
- Koplas, P.A., Rosenberg, R.L., and Oxford, G.S., (1997). The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* **17**, 3525-3537.
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., and Echard, A., (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr. Biol.* **16**, 1719-1725.
- Kumari, S., Mg, S., and Mayor, S., (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* **20**, 256-275.
- Lainez, S., Valente, P., Ontoria-Oviedo, I., Estevez-Herrera, J., Camprubi-Robles, M., Ferrer-Montiel, A., and Planells-Cases, R., (2010). GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *FASEB J.* **24**, 1958-1970.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A., (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* **7**, 661-671.
- León Olea, M., (2002). Evolución filogenética del dolor. *Ciencia y cultura* **46**:19-24.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y., (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* **504**, 107-112.
- Lilja, J., Laulund, F., and Forsby, A., (2007). Insulin and insulin-like growth factor type-I up-regulate the vanilloid receptor-1 (TRPV1) in stably TRPV1-expressing SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* **85**, 1413-9.
- Lishko, P.V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C.B., and Gaudet, R., (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**, 905-918.
- Liu, B., Zhang, C., and Qin, F., (2005). Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. *J. Neurosci.* **25**, 4835-4843.

- Liu, L., Simon, S.A., (1996). Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca²⁺ dependence in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neurophysiol.* *75*, 1503-1514.
- Loeser, J.D., Melzack, R., (1999). Pain: an overview. *Lancet* *353*, 1607-1609.
- Lopshire, J.C., Nicol, G.D., (1998). The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E₂ enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J. Neurosci.* *18*, 6081-6092.
- Lukacs, V., Thyagarajan, B., Varnai, P., Balla, A., Balla, T., and Rohacs, T., (2007). Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J. Neurosci.* *27*, 7070-7080.
- Lundberg, J.M., Saria, A., (1987). Polypeptide-containing neurons in airway smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* *49*, 557-572.
- Lundmark, R., Doherty, G.J., Howes, M.T., Cortese, K., Vallis, Y., Parton, R.G., and McMahon, H.T., (2008). The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr. Biol.* *18*, 1802-1808.
- Luzio, J.P., Parkinson, M.D., Gray, S.R., and Bright, N.A., (2009). The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 1019-1021.
- Macpherson, L.J., Geierstanger, B.H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S.R., Hwang, S., and Patapoutian, A., (2005). The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr. Biol.* *15*, 929-934.
- Man, H.Y., Sekine-Aizawa, Y., and Huganir, R.L., (2007). Regulation of {alpha}-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3579-3584.
- Man, H.Y., Ju, W., Ahmadian, G., and Wang, Y.T., (2000). Intracellular trafficking of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Mol. Life Sci.* *57*, 1526-1534.
- Mandadi, S., Numazaki, M., Tominaga, M., Bhat, M.B., Armati, P.J., and Roufogalis, B.D., (2004). Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* *35*, 471-478.

- Mandadi, S., Tominaga, T., Numazaki, M., Murayama, N., Saito, N., Armati, P.J., Roufogalis, B.D., and Tominaga, M., (2006). Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 123 , 106-116.
- Mason, L., Moore, R.A., Derry, S., Edwards, J.E., and McQuay, H.J., (2004). Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *BMJ* 328 , 991.
- Maxfield, F.R., McGraw, T.E., (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 , 121-132.
- Mayor, S., Pagano, R.E., (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 , 603-612.
- McGarvey, L.P., Butler, C.A., Stokesberry, S., Polley, L., McQuaid, S., Abdullah, H., Ashraf, S., McGahon, M.K., Curtis, T.M., Arron, J., Choy, D., Warke, T.J., Bradding, P., Ennis, M., Zholos, A., Costello, R.W., and Heaney, L.G., (2013). Increased expression of bronchial epithelial transient receptor potential vanilloid 1 channels in patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* .
- McMahon, H.T., Boucrot, E., (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 , 517-533.
- Merskey, H., (2007). The taxonomy of pain. *Med. Clin. North Am.* 91 , 13-20, vii.
- Merskey, H., (2002). Clarifying definition of neuropathic pain. *Pain* 96 , 408-409.
- Mohapatra, D.P., Nau, C., (2005). Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280 , 13424-32.
- Mohapatra, D.P., Nau, C., (2003). Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 278 , 50080-50090.
- Montell, C., (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* 2005 , re3.

- Montell, C., (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE 2001* , re1.
- Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Ferrer-Montiel, A. (2001). A member of the HIT family interacts with TRPV1. *Soc Neurosci Abs 27*, P 56.2.
- Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., and Ferrer-Montiel, A., (2004). Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* 279 , 25665-25672.
- Mousavi, S.A., Malerod, L., Berg, T., and Kjekken, R., (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* 377 , 1-16.
- Nagae, M., Hiraga, T., and Yoneda, T., (2007). Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization. *J. Bone Miner. Metab.* 25 , 99-104.
- Nagy, I., Santha, P., Jancso, G., and Urban, L., (2004). The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur. J. Pharmacol.* 500 , 351-369.
- Neubert, J.K., Karai, L., Jun, J.H., Kim, H.S., Olah, Z., and Iadarola, M.J., (2003). Peripherally induced resiniferatoxin analgesia. *Pain* 104 , 219-228.
- Nicholson, B., (2006). Differential diagnosis: nociceptive and neuropathic pain. *Am. J. Manag. Care* 12 , S256-62.
- Niiyama, Y., Kawamata, T., Yamamoto, J., Omote, K., and Namiki, A., (2007). Bone cancer increases transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 148 , 560-572.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J.A., (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.* 87 , 165-217.
- Novakova-Tousova, K., Vyklicky, L., Susankova, K., Benedikt, J., Samad, A., Teisinger, J., and Vlachova, V., (2007). Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience* 149 , 144-154.

- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., and Tominaga, M., (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J. Biol. Chem.* 277 , 13375-13378.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., and Tominaga, M., (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 , 8002-8006.
- Oh, U., Hwang, S.W., and Kim, D., (1996). Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 16 , 1659-67.
- Ohkuma, S., Poole, B., (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 , 3327-3331.
- Ohkuma, S., Moriyama, Y., and Takano, T., (1982). Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 , 2758-2762.
- Olah, Z., Szabo, T., Karai, L., Hough, C., Fields, R.D., Caudle, R.M., Blumberg, P.M., and Iadarola, M.J., (2001). Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J. Biol. Chem.* 276 , 11021-11030.
- Pare, M., Elde, R., Mazurkiewicz, J.E., Smith, A.M., and Rice, F.L., (2001). The Meissner corpuscle revised: a multiafferented mechanoreceptor with nociceptor immunochemical properties. *J. Neurosci.* 21 , 7236-7246.
- Park, E.S., Kim, S.R., and Jin, B.K., (2012). Transient receptor potential vanilloid subtype 1 contributes to mesencephalic dopaminergic neuronal survival by inhibiting microglia-originated oxidative stress. *Brain Res. Bull.* 89 , 92-96.
- Parton, R.G., Simons, K., (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 , 185-194.
- Patapoutian, A., Tate, S., and Woolf, C.J., (2009). Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 , 55-68.

- Paus, R., Schmelz, M., Biro, T., and Steinhoff, M., (2006). Frontiers in pruritus research: scratching the brain for more effective itch therapy. *J. Clin. Invest.* *116* , 1174-1186.
- Payne, C.K., Mosbaugh, P.G., Forrest, J.B., Evans, R.J., Whitmore, K.E., Antoci, J.P., Perez-Marrero, R., Jacoby, K., Diokno, A.C., O'Reilly, K.J., Griebling, T.L., Vasavada, S.P., Yu, A.S., Frumkin, L.R., and ICOS RTX Study Group (Resiniferatoxin Treatment for Interstitial Cystitis), (2005). Intravesical resiniferatoxin for the treatment of interstitial cystitis: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *J. Urol.* *173* , 1590-1594.
- Pedersen, S.F., Owsianik, G., and Nilius, B., (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* *38* , 233-252.
- Pickart, C.M., (2001). Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* *8* , 499-504.
- Planells-Cases, R., Ferrer-Montiel, A. (2007). TRP Channel Trafficking. In: TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades, W.B. Liedtke, S. Heller ,eds. (Boca Raton (FL): Taylor & Francis Group, LLC) .
- Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Morenilla-Palao, C., and Ferrer-Montiel, A., (2005). Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch.* *451* , 151-159.
- Planells-Cases, R., Valente, P., Ferrer-Montiel, A., Qin, F., and Szallasi, A., (2011). Complex regulation of TRPV1 and related thermo-TRPs: implications for therapeutic intervention. *Adv. Exp. Med. Biol.* *704* , 491-515.
- Premkumar, L.S., Ahern, G.P., (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* *408* , 985-990.
- Prescott, E.D., Julius, D., (2003). A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* *300* , 1284-1288.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., and Williams S. M., (2004). *Neuroscience. Third Edition.* .

- Qin, F., (2007). Regulation of TRP ion channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Handb. Exp. Pharmacol.* (179) , 509-525.
- Qualmann, B., Mellor, H., (2003). Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem. J.* 371 , 233-241.
- Quintanar-Audelo, M., Fernandez-Carvajal, A., Van Den Nest, W., Carreno, C., Ferrer-Montiel, A., and Albericio, F., (2007). Design and synthesis of indole-based peptoids as potent noncompetitive antagonists of transient receptor potential vanilloid 1. *J. Med. Chem.* 50 , 6133-6143.
- Ricks, T.K., Trejo, J., (2009). Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization. *J. Biol. Chem.* 284 , 34444-34457.
- Roe, M.W., Lemasters, J.J., and Herman, B., (1990). Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* 11 , 63-73.
- Romer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegel, B., Tenza, D., Aly, M.R., Fraasier, V., Florent, J.C., Perrais, D., Lamaze, C., Raposo, G., Steinem, C., Sens, P., Bassereau, P., and Johannes, L., (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450 , 670-675.
- Roseberry, A.G., Hosey, M.M., (2001). Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J. Cell. Sci.* 114 , 739-746.
- Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., and Gordon, S.E., (2004). Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J. Gen. Physiol.* 123 , 53-62.
- Royle, S.J., Murrell-Lagnado, R.D., (2003). Constitutive cycling: a general mechanism to regulate cell surface proteins. *Bioessays* 25 , 39-46.
- Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A., and Malinow, R., (2005). Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science* 308 , 83-88.

- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G., and Mayor, S., (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev. Cell.* 2, 411-423.
- Saftig, P., Klumperman, J., (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 623-635.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N., (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 19, 183-232.
- Sanz-Salvador, L., Andres-Borderia, A., Ferrer-Montiel, A., and Planells-Cases, R., (2012). Agonist- and Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation. *J. Biol. Chem.* 287, 19462-19471.
- Sasamura, T., Sasaki, M., Tohda, C., and Kuraishi, Y., (1998). Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* 9, 2045-2048.
- Schmidt, M., Dubin, A.E., Petrus, M.J., Earley, T.J., and Patapoutian, A., (2009). Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron* 64, 498-509.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A., (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283-296.
- Shenoy, S.K., Xiao, K., Venkataramanan, V., Snyder, P.M., Freedman, N.J., and Weissman, A.M., (2008). Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 283, 22166-76.
- Siemens, J., Zhou, S., Piskrowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E.A., Basbaum, A.I., King, D., and Julius, D., (2006). Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444, 208-212.

- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P., and Polo, S., (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 , 2760-2765.
- Simpson, D.M., Brown, S., Tobias, J., and NGX-4010 C107 Study Group, (2008). Controlled trial of high-concentration capsaicin patch for treatment of painful HIV neuropathy. *Neurology* 70 , 2305-2313.
- Sorkin, A., Von Zastrow, M., (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 , 600-614.
- Southall, M.D., Li, T., Gharibova, L.S., Pei, Y., Nicol, G.D., and Travers, J.B., (2003). Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304 , 217-222.
- Stander, S., Moormann, C., Schumacher, M., Buddenkotte, J., Artuc, M., Shpacovitch, V., Brzoska, T., Lippert, U., Henz, B.M., Luger, T.A., Metze, D., and Steinhoff, M., (2004). Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp. Dermatol.* 13 , 129-139.
- Stein, A.T., Ufret-Vincenty, C.A., Hua, L., Santana, L.F., and Gordon, S.E., (2006). Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* 128 , 509-522.
- Strecker, T., Dieterle, A., Reeh, P.W., Weyand, M., and Messlinger, K., (2006). Stimulated release of calcitonin gene-related peptide from the human right atrium in patients with and without diabetes mellitus. *Peptides* 27 , 3255-3260.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51 , 159-212.
- Szallasi, A., Blumberg, P.M., (1989). Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30 , 515-20.

- Thebault, S., Alexander, R.T., Tiel Groenesteghe, W.M., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J., (2009). EGF increases TRPM6 activity and surface expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20* , 78-85.
- Tominaga, M., Tominaga, T., (2005). Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch.* *451* , 143-150.
- Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., and Julius, D., (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* *21* , 531-543.
- Torgersen, M.L., Skretting, G., van Deurs, B., and Sandvig, K., (2001). Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J. Cell. Sci.* *114* , 3737-3747.
- Tosoni, D., Puri, C., Confalonieri, S., Salcini, A.E., De Camilli, P., Tacchetti, C., and Di Fiore, P.P., (2005). TTP specifically regulates the internalization of the transferrin receptor. *Cell* *123* , 875-888.
- Toth, A., Wang, Y., Kedei, N., Tran, R., Pearce, L.V., Kang, S.U., Jin, M.K., Choi, H.K., Lee, J., and Blumberg, P.M., (2005). Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life Sci.* *76* , 2921-2932.
- Valente, P., Garcia-Sanz, N., Gomis, A., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Viana, F., Belmonte, C., and Ferrer-Montiel, A., (2008). Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I. *FASEB J.* *22* , 3298-3309.
- Van Buren, J.J., Bhat, S., Rotello, R., Pauza, M.E., and Premkumar, L.S., (2005). Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol. Pain* *1* , 17.
- van de Graaf, S.F., Rescher, U., Hoenderop, J.G., Verkaart, S., Bindels, R.J., and Gerke, V., (2008). TRPV5 is internalized via clathrin-dependent endocytosis to enter a Ca²⁺-controlled recycling pathway. *J. Biol. Chem.* *283* , 4077-4086.

- Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., and McNaughton, P.A., (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* *534*, 813-825.
- Venkatachalam, K., Montell, C., (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 387-417.
- Vetter, I., Wyse, B.D., Monteith, G.R., Roberts-Thomson, S.J., and Cabot, P.J., (2006). The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Mol. Pain* *2*, 22.
- Vetter, I., Cheng, W., Peiris, M., Wyse, B.D., Roberts-Thomson, S.J., Zheng, J., Monteith, G.R., and Cabot, P.J., (2008). Rapid, opioid-sensitive mechanisms involved in transient receptor potential vanilloid 1 sensitization. *J. Biol. Chem.* *283*, 19540-19550.
- Vidal-Mosquera, M., Fernandez-Carvajal, A., Moure, A., Valente, P., Planells-Cases, R., Gonzalez-Ros, J.M., Bujons, J., Ferrer-Montiel, A., and Messeguer, A., (2011). Triazine-based vanilloid 1 receptor open channel blockers: design, synthesis, evaluation, and SAR analysis. *J. Med. Chem.* *54*, 7441-7452.
- Vieira, A.V., Lamaze, C., and Schmid, S.L., (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* *274*, 2086-2089.
- Vyklicky, L., Novakova-Tousova, K., Benedikt, J., Samad, A., Touska, F., and Vlachova, V., (2008). Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol. Res.* *57 Suppl 3*, S59-68.
- Waldo, M.C., (1999). Co-distribution of sensory gating and impaired niacin flush response in the parents of schizophrenics. *Schizophr. Res.* *40*, 49-53.
- Wang, L.H., Rothberg, K.G., and Anderson, R.G., (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* *123*, 1107-1117.

BIBLIOGRAFÍA

- Weigert, R., Yeung, A.C., Li, J., and Donaldson, J.G., (2004). Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol. Biol. Cell* 15 , 3758-3770.
- Welch, J.M., Simon, S.A., and Reinhart, P.H., (2000). The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 , 13889-13894.
- Wieffer, M., Maritzen, T., and Haucke, V., (2009). SnapShot: endocytic trafficking. *Cell* 137 , 382.e1-382.e3.
- Williams, M., Kowaluk, E.A., and Arneric, S.P., (1999). Emerging molecular approaches to pain therapy. *J. Med. Chem.* 42 , 1481-1500.
- Wong, G.Y., Gavva, N.R., (2009). Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res. Rev.* 60 , 267-277.
- Xu, H., Blair, N.T., and Clapham, D.E., (2005). Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J. Neurosci.* 25 , 8924-8937.
- Yang, X.R., Lin, M.J., McIntosh, L.S., and Sham, J.S., (2006). Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290 , L1267-76.
- Yang, Y., Yang, H., Wang, Z., Mergler, S., Wolosin, J.M., and Reinach, P.S., (2013). Functional TRPV1 expression in human corneal fibroblasts. *Exp. Eye Res.* 107 , 121-129.
- Yao, J., Qin, F., (2009). Interaction with phosphoinositides confers adaptation onto the TRPV1 pain receptor. *PLoS Biol.* 7 , e46.
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., and Mori, Y., (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat. Chem. Biol.* 2 , 596-607.

- Yudowski, G.A., Puthenveedu, M.A., Henry, A.G., and von Zastrow, M., (2009). Cargo-mediated regulation of a rapid Rab4-dependent recycling pathway. *Mol. Biol. Cell* 20 , 2774-2784.
- Zhang, C., Xiong, W., Zheng, H., Wang, L., Lu, B., and Zhou, Z., (2004). Calcium- and dynamin-independent endocytosis in dorsal root ganglion neurons. *Neuron* 42 , 225-236.
- Zhang, X., Huang, J., and McNaughton, P.A., (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* 24 , 4211-4223.
- Zvara, A., Bencsik, P., Fodor, G., Csont, T., Hackler, L., Jr, Dux, M., Furst, S., Jancso, G., Puskas, L.G., and Ferdinandy, P., (2006). Capsaicin-sensitive sensory neurons regulate myocardial function and gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FASEB J.* 20 , 160-162.

