

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO

FACULTAD DE CIENCIAS

“El ácido zoledrónico es un potente inhibidor de los canales TRPV1”

César Abdiel Amaya Rodríguez

Trabajo de graduación para optar por el
título de Magíster en Ciencias
Biológicas Mención Neurociencia.

Tutora:

Karen Castillo, PhD

Cotutor:

Ramón Latorre, PhD

Valparaíso, República de Chile

2024

Dedicatoria

A mi amado padre Julio César Amaya Rodríguez y mi amada madre Ana María Rodríguez Mendoza. Quienes con lo justo y poco nos brindaron a mis hermanos y a mí una linda infancia y nos dieron lo más importante que podemos tener, el acceso a una educación. Abracé el conocimiento como las lianas se apoyan de los árboles.

Agradecimientos

Aún recuerdo cuando fantaseaba con mis amigos en la Biblioteca Simón Bolívar, Universidad de Panamá, con irme al extranjero para comprender y aprender sobre electrofisiología, canales de iones y de la técnica de *patch-clamp*. Años después, me encuentro fascinado por el mundo de los canales de iones y convirtiéndome en el primer neurocientífico de mi querida Provincia de Colón, Panamá.

A mi tutora Karen Castillo, PhD, quien amablemente respondió mi correo sobre mi interés en la línea de investigación que desarrolla y la posibilidad de trabajar con ella. Le agradezco la oportunidad dada, su dedicación, apoyo y paciencia para formarme como electrofisiólogo. De sus consejos y críticas que me han permitido mejorar poco a poco en mi formación científica. Por inculcarme ciencia de calidad y ser íntegro con nuestras investigaciones. Así, como darme la libertad dentro del laboratorio para proponer ideas y ser independiente durante el desarrollo de mi investigación. Aún recuerdo que me recomendó traer ropa para el frío, sin embargo, omite su recomendación y sufrí de frío en mi llegada a Chile.

A mi cotutor Ramón Latorre, PhD. Me encuentro agradecido por formarme dentro de su laboratorio. Un ejemplo para seguir como científico y como persona, y orgullo para la ciencia Latinoamericana por su loable labor y contribución en el campo de los canales de iones. Agradezco mucho sus buenos consejos y enseñarme que la única ciencia es la buena ciencia.

A Luisa Soto, Lab Manager. Luisa, sin ti, esto no hubiera sido posible. Te agradezco por enseñarme todo sobre biología molecular y por tus buenos consejos.

A mis compañeros de laboratorio: Karina Carvajal, Rosangelina Alvarado, Felipe Echeverría e Ignacio Segura. Quienes me dieron su apoyo y ayuda durante todo este camino.

A Juan Pablo Castillo (JP), PhD. Por su ayuda y enseñanza para comprender la parte electrónica del *patch-clamp* y su retroalimentación en el desarrollo de mi tesis.

A José Young, PhD. Por sus buenos consejos en mis momentos difíciles y quién me enseñó desde el pregrado que hay que ser competente antes que todo.

A Gloria de Trujillo, MSc. Por sus buenos consejos, ayuda y disposición siempre en el momento que lo necesitaba.

A mis hermanos Julio César Amaya Rodríguez y Kevin Martin Amaya Rodríguez como a mis amigos Samuel Escudero, Walter Diplakiz, Mihail Pérez y Juan Zeballos, por su apoyo incondicional durante estos dos años.

A mi lugar de trabajo, la Universidad de Panamá, por su confianza en ingresarme como académico mediante el programa Relevo Generacional y apostar en la formación de jóvenes profesionales.

Agradecer a las becas recibidas por parte de la Organización de los Estados Americanos (OEA) y el Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos (IFARHU), sin su apoyo esto nunca hubiera sucedido.

Por último, quiero agradecer al pueblo panameño, ya que, soy producto de una educación pública y gratuita. Además de formarme como profesional, me inculcó ser un ciudadano crítico de la nación y de sus problemáticas.

Índice

Contenido	Página
Resumen	1
1. Antecedentes	2
1.1 Superfamilia TRP	2
1.2 El canal receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1)	3
1.3 Estructura del canal TRPV1	5
1.4 El TRPV1 y el Ácido Zoledrónico	7
2. Hipótesis	13
3. Objetivos	13
3.1 Objetivo General	13
3.2 Objetivo específicos	13
4. Metodología	14
4.1 Obtención y cuidado de los animales	14
4.2 Preparación de los ovocitos	14
4.3 Transcripción del RNA del canal TRPV1 para ser expresado en ovocitos <i>X. laevis</i>	14
4.4 Microinyección del RNA del canal TRPV1 en ovocitos de <i>X. laevis</i>	16
4.5 Fabricación de pipetas <i>patch-clamp</i> y equipo electrónico	16
4.6 Caracterizar el canal TRPV1 WT y con diferentes mutaciones puntuales en el sitio de unión del PI(4,5)P ₂ y sitio de unión CAP en presencia del ácido zoledrónico mediante la técnica de <i>patch-clamp</i> .	17
4.7 Análisis de datos	18
5. Resultados	18
5.1 ZOL inhibe los canales TRPV1 WT expresados de forma heteróloga	18
5.2 Explorando el sitio de unión al PI(4,5)P ₂ del canal TRPV1 en la unión del ZOL	22
5.3. Implicaciones del sitio de unión de CAP en la regulación del canal TRPV1 por ZOL	28
5.4. Efecto del ZOL en el lado extracelular del canal TRPV1 WT	31

6. Discusión	33
7. Conclusión	36
8. Referencias	37
9. Anexos	42

Índice de Figuras

Figuras	Página
Figura 1. Transducción de la termosensación y termorregulación.	4
Figura 2. Descripción general diagramática de la disposición topológica del canal TRPV1 y la ubicación de los sitios de unión clave.	6
Figura 3. Estructuras de los bifosfonatos	8
Figura 4. El ácido zoledrónico puede unirse al bolsillo de unión del PI(4,5)P ₂ o al sitio de unión CAP en el canal TRPV1.	9
Figura 5. Efecto de ZOL sobre las corrientes iónicas de TRPV1 expresado en ovocitos de <i>X. laevis</i> .	11
Figura 6. Registros representativos del efecto del ZOL en la actividad de un solo canal de TRPV1 utilizando un potencial de mantención de 60 mV en presencia de 100 μM ZOL.	12
Figura 7. El ZOL actúa en los canales TRPV1.	19
Figura 8. El ZOL colapsa la conductancia unitaria del canal TRPV1	20
Figura 9. Registro representativo de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantención de -100 mV con una perfusión de 500 nM ZOL.	21
Figura 10. Registro representativo de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantención de -100 mV con una perfusión de 1 μM ZOL.	22
Figura 11. Explorando la neutralización del R575 del sitio de unión PI(4,5)P ₂ en presencia de 100 μM ZOL	23
Figura 12. Registro representativo de corrientes unitarias inducidas por el mutante R757A utilizando un potencial de mantención de -20 mV con una perfusión de 100 μM ZOL	24
Figura 13. Explorando la neutralización del R575 del sitio de unión PI(4,5)P ₂ en presencia de 1 μM ZOL	25
Figura 14. Corrientes unitarias del mutante Q561A del sitio de unión PI(4,5)P ₂ en presencia de 1 nM ZOL	26
Figura 15. Explorando el efecto de ZOL sobre la triple mutante R575-R579-K688 del sitio de unión PI(4,5)P ₂	27
Figura 16. Registro representativo de canal único de TRPV1 con la neutralización del R575-R579-K688 con un pulso constante de -40 mV expuesto a 1 nM ZOL	28

Figura 17. Explorando el efecto del ZOL sobre la triple mutante T550A-Y511A-E570A del sitio de unión de la CAP	29
Figura 18. Explorando el efecto del ZOL sobre la triple mutante T550A-Y511A-E570A del sitio de unión de la CAP	30
Figura 19. Explorando la neutralización de la triple mutante T550-Y511-E570 del sitio de unión CAP en presencia de 500 nM ZOL	31
Figura 20. Efecto del ZOL en lado extracelular del canal TRPV1 WT	32

Resumen

El canal receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1) es un miembro de la superfamilia de canales de iones del receptor de potencial transitorio (TRP) y es uno de los sustratos moleculares que inician las respuestas relacionadas con el dolor. El ácido zoledrónico (ZOL), es un bifosfonato utilizado en el tratamiento de enfermedades óseas como la osteoporosis, metástasis ósea, entre otras.

A pesar de que el ZOL no se encuentra clasificado como un compuesto analgésico, un efecto colateral de su uso es que produce alivio del dolor. Nuestros antecedentes preliminares realizados mediante electrofisiología, modelado molecular y análisis de *docking* sugieren que el ZOL podría unirse al sitio de unión del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato PI(4,5)P₂ y al sitio de unión capsaicina (CAP) del canal TRPV1. En esta tesis se investigó la relevancia del sitio de unión PI(4,5)P₂ y el sitio de unión CAP en la regulación del canal TRPV1 por ZOL. Para ello, se utilizó diferentes aproximaciones experimentales incluyendo biología molecular, mutagénesis sitio-dirigida, expresión heteróloga de TRPV1 en ovocitos de *Xenopus laevis*, y electrofisiología mediante la técnica de *patch-clamp*.

Los registros de corrientes macroscópicas muestran que el ZOL produce una disminución de la corriente del canal TRPV1 WT en un rango de concentraciones entre 1 nM hasta 100 μM. El tratamiento con ZOL produce una disminución significativa de la corriente. Este efecto, también se recapitula en registros de canal único donde se observa una notoria disminución de la conductancia unitaria a todas las concentraciones evaluadas. Estas observaciones sugieren fuertemente que el ZOL puede estar actuando como un inhibidor del canal TRPV1. En esta tesis se realizaron mutaciones sitio dirigidas de los residuos Q561, R575 y la triple mutante R575-R579-K688 del sitio de unión PI(4,5)P₂, y en los residuos T550, Y511 y E570 del sitio de unión CAP, se registraron mediante *patch-clamp* en presencia de ZOL. En términos generales se observa que el sitio de unión PI(4,5)P₂ tiene un efecto similar al observado sobre el canal silvestre, lo que sugiere que este sitio no participa en la inhibición del canal TRPV1 por el ZOL. Los registros preliminares obtenidos usando la triple mutante T550-Y511-E570 del sitio de unión CAP, indican que posiblemente se encuentra involucrado en la regulación del canal TRPV1 por ZOL. Dando pista para dilucidar la unión del ZOL al canal TRPV1. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos mutagénicos en el sitio de unión a CAP para obtener una muestra representativa. Los experimentos de canal único del lado extracelular del canal TRPV1 WT muestran que en presencia de ZOL se produce un colapso de la conductancia de manera inmediata. Lo que sugiere que el ZOL puede unirse al canal TRPV1 en más de un sitio de unión.

Aquí, hemos descrito al ZOL como un nuevo inhibidor del canal TRPV1. Nuestros hallazgos sugieren que los residuos T550, Y511, E570 del sitio de unión CAP se encuentran interactuando con el ZOL. Además, es necesario realizar la caracterización electrofisiológica del lado extracelular del canal TRPV1 en presencia del ZOL.

1. Antecedentes

1.1. Superfamilia TRP

La superfamilia de los canales de iones del Receptor de Potencial Transitorio (TRP) por sus siglas en inglés (Transient Receptor Potential), son receptores que están presentes en una gran diversidad de células y tejidos. Esta superfamilia de canales iónicos tiene diferentes características como: ser canales catiónicos, tener distintos modos de activación y una diversidad en sus funciones fisiológicas como por ejemplo la detección de temperatura y dolor (Montell, 2005). Al subconjunto de receptores que sensan la temperatura se les conoce como canales “termoTRP”, y pueden detectar desde el frío nocivo al calor nocivo. Actualmente, los canales TRP están clasificados en ocho subfamilias: TRPC (“canónico”), TRPA (“anquirina”), TRPV (“vaniloide”), TRPM (“melastatina”), TRPS (“soromelastatina”), TRPML (“mucolipina”), TRPP (“policistina”) y TRPN (“No-mecanopotencial o NOMP-C”) (Himmel, Gray and Cox, 2021).

La mayoría de los canales TRP son canales catiónicos no selectivos, y debido a su capacidad de sensar diferentes estímulos tanto físicos como químicos, actúan como receptores polimodales. Entre los estímulos físicos y químicos que pueden sensar se encuentran el voltaje, la presión, lípidos, osmolaridad, toxinas, ligandos químicos, cambios de temperatura y otros estímulos (Gees et al., 2012; Castillo *et al.*, 2018; Amaya-Rodriguez *et al.*, 2023). Los canales “termoTRP” son aquellos cuya característica principal es que pueden ser activados por temperatura, desde el frío nocivo (<15 °C) hasta el calor perjudicial (>42 °C). La dependencia de temperatura de una proteína se mide a través de un factor adimensional (Q_{10}) que establece el cambio en la velocidad de una reacción cuando la temperatura cambia 10 grados. La gran mayoría de los canales iónicos poseen un rango de Q_{10} de 2-3; mientras que los canales sensibles a temperatura como los termoTRP alcanzan valores de $Q_{10} \geq 6$ (Feng, 2014). En la familia TRP se han detectado los siguientes receptores de temperatura: TRPC5, TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8, TRPM3, TRPM4, TRPM2 (Feng, 2014; Ferrandiz-Huertas *et al.*, 2014; Ito, Ikemoto and Yoshioka, 2015; Song *et al.*, 2016).

1.2 El canal receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1)

El canal receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1) inicialmente conocido como el receptor de capsaicina (CAP), se identificó en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y del ganglio trigémino (TG) de ratón. Su caracterización reveló que es activado por CAP (la molécula que otorga la sensación picante de los ajíes), protones, y temperatura >42 °C (Caterina *et al.*, 1997). Estos hallazgos, además, revelaron el rol de los canales TRPV1 en la vía del dolor (**Figura 1**), y fue el primer canal termoTRP en ser descrito (Caterina *et al.*, 1997). El canal TRPV1 es un canal catiónico no selectivo con una mayor preferencia al flujo de iones de Ca^{2+} . Puede ser modulado por una gran diversidad de estímulos físicos y químicos como el voltaje, cambios de pH, temperatura (>42 °C), lípidos, vaniloides, fito y endocannabinoides, $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$, hormonas entre otros (Szallasi *et al.*, 2007; Poblete *et al.*, 2015; Ramírez-Barrantes *et al.*, 2020; Rosenbaum and Islas, 2023).

Inicialmente se creía que los canales TRPV1 se expresaban únicamente el sistema nervioso periférico (SNP), sin embargo, hoy se conoce que se expresan tanto en células excitables como no excitables. En el SNP se expresan en fibras A δ y C de los ganglios sensoriales DRG en la médula espinal y los ganglios del nervio trigémino, participando en la nocicepción y el dolor (Caterina *et al.*, 1997; Hwang and Valtschanoff, 2003). En el SNC el canal TRPV1 se encuentra distribuido en todas las áreas corticales, el hipocampo, diferentes núcleos y otras zonas neuronales, teniendo roles en la modulación de liberación de neurotransmisores, plasticidad neuronal y un posible papel en la memoria y aprendizaje, entre otros (Mezey *et al.*, 2000; A. Matta and P. Ahern, 2010; Chávez, Chiu and Castillo, 2010; Morales-Lázaro and Rosenbaum, 2015; Meza *et al.*, 2022). Además, el canal se ha identificado en células musculares lisas (Kark *et al.*, 2008), células endoteliales (Golech *et al.*, 2004), páncreas (Akiba *et al.*, 2004), pulmón (Johansen, et al., 2006), colon (Matsumoto *et al.*, 2009), vejiga y tracto genital masculino (Stein *et al.*, 2004), útero (Contassot *et al.*, 2004), riñón (Cortright *et al.*, 2001), bazo (Bertin *et al.*, 2014), hígado (Li *et al.*, 2012) y estómago (Fausson-Pellegrini *et al.*, 2005).

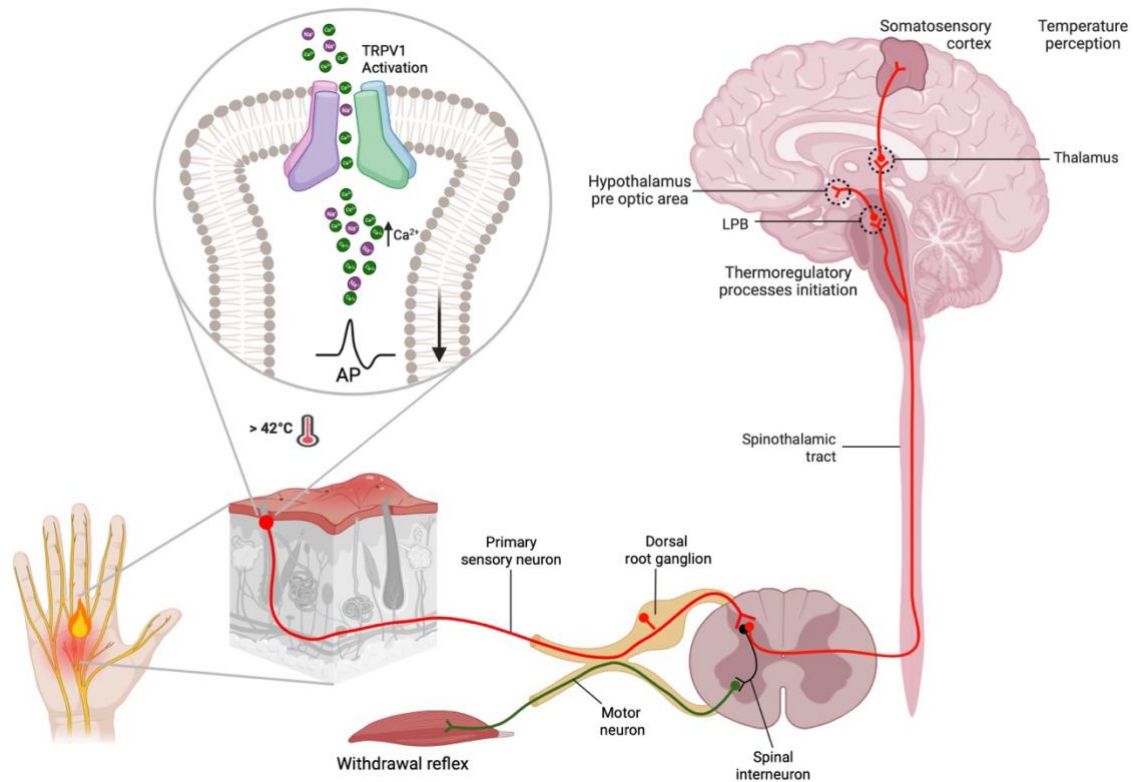


Figura 1. Transducción de la termosensación y termorregulación. El canal TRPV1 es el sustrato molecular de estímulos nocivos lo que conlleva a la integración de la termosensación y percepción del dolor. Después de un estímulo nocivo, como una temperatura superior a 42° C, el canal TRPV1 se abre permitiendo el flujo de Ca^{2+} lo que conduce a la despolarización de la membrana tras la activación de los canales de sodio dependientes del voltaje, generando la propagación de potencial de acción en las neuronas aferentes. El potencial de acción generado viaja a la médula espinal donde la neurona primaria sensorial hace sinapsis con una interneurona. Desde ahí hay dos posibles caminos: i) conectar con motoneuronas para dar lugar el reflejo de retirada; ó ii) con neuronas sensoriales del tracto espinotalámico hasta llegar a los centros integradores superiores pasando por el tálamo. La percepción de temperatura ocurre en la corteza somatosensorial primaria, y los procesos termorreguladores en el hipotálamo, específicamente en el área preóptica a través de las neuronas del núcleo parabraquial lateral (LPB). Figura tomada de (Amaya-Rodriguez *et al.*, 2023).

A pesar de que la interacción del canal TRPV1 con agonistas como la CAP produce sensación de dolor quemante y liberación de mediadores inflamatorios, la exposición prolongada del canal a la CAP causa su desensibilización deteniendo su función y produciendo un efecto analgésico. Se sugiere que los mecanismos de desensibilización del TRPV1 puede ocurrir por un cierre de poro evitando la permeación de iones o por taquifilaxia donde el canal se

internaliza con el reciclaje a la membrana plasmática mediada por una vía independiente de la clatrina (Touska *et al.*, 2011; Sanz-Salvador *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2019). A pesar del desarrollo del parche transdérmico de CAP (8%) para contrarrestar el dolor musculoesquelético moderado y neuropático periférico, el uso de agonistas del canal TRPV1 puede presentar limitaciones debido a sus efectos secundarios causado por la activación del canal como el aumento de la pungencia, efectos neurotóxicos y aumento de la temperatura corporal (Anand and Bley, 2011; Julius, 2013). A su vez, la administración oral de CAP también presenta efectos secundarios como el dolor gástrico (Hayman and Kam, 2008). Esto ha llevado a la búsqueda e identificación de moléculas antagonistas del canal, ya que podrían poseer mayores ventajas terapéuticas que los agonistas para el desarrollo de medicamentos para el dolor (Caterina, 2008; Anand and Bley, 2011). El descubrimiento de los canales TRPV1, TRPM8 y PIEZO como sensores moleculares de temperatura y táctiles llevó a David Julius y Ardem Patapoutian a ser galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2021 (Latorre and Díaz-Franulic, 2022).

1.3 Estructura del canal TRPV1

La primera estructura obtenida con la técnica de cryo-EM fue la estructura del canal TRPV1 de rata (Liao *et al.*, 2013), confirmando la topología homotetramérica del canal, donde cada subunidad está constituida por 6 segmentos de transmembrana (S1-S6). El dominio formado por los segmentos S1-S4 conocido como dominio de unión al ligando, debido al gran número de ligandos que se unen a esta zona que conlleva a la modulación del canal. La vía de permeación iónica se encuentra localizada entre los segmentos transmembrana 5 y 6 (S5 y S6) formando el poro del canal; mientras que sus extremos N-terminal y C-terminal se encuentra hacia el lado citoplasmático de la membrana. El C-terminal contiene el dominio de la caja TRP una zona muy conservada en la superfamilia TRP (TRPV, TRPM, TRPM) implicada en funciones de activación y regulación del canal y el N-terminal tiene una serie de repeticiones de anquirina (Latorre *et al.*, 2007; Gees *et al.*, 2012; Cao, Liao, *et al.*, 2013).

Si observamos la topología del canal TRPV1 (**Figura 2**), los datos actuales han identificado diferentes sitios de unión para la diversidad de moléculas que interactúan con canal. Podemos

mencionar que del lado intracelular del canal se encuentra el sitio de unión vaniloide o bolsillo vaniloide. Los distintos ligandos que se unen a esta zona interactúan con al menos uno de los siguientes residuos de aminoácidos: Y512, S513, E571, T550, T551 y R557 (Cao *et al.*, 2013). Para el sitio de unión del PI(4,5)P₂ se ha reportado la interacción con los residuos R557, E570, R575, R579, K694 (Poblete *et al.*, 2015). En el lado extracelular, está el sitio de unión de la toxina de doble nudo (DkTx) que interactúa con los residuos I599, F649, 1657 y F659. Adicionalmente, por el lado extracelular se encuentra el sitio de unión de protones, los que interactúan con los residuos E600 y E646 (Bevan *et al.*, 1992; Cao, Cordero-Morales, *et al.*, 2013; Cao, Liao, *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2013; F. Yang *et al.*, 2015; Poblete *et al.*, 2015; S. Yang *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016; Morales-Lázaro, 2016; Zhang, Julius and Cheng, 2021).

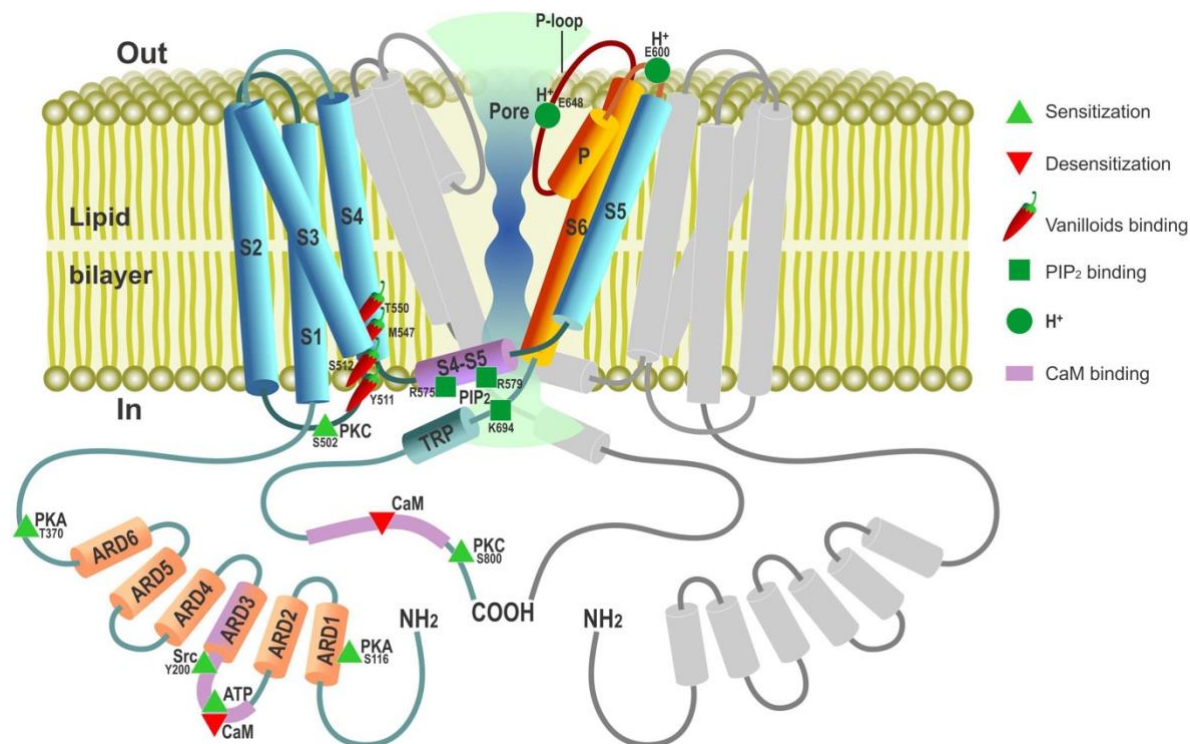


Figura 2. Descripción general diagramática de la disposición topológica del canal TRPV1 y la ubicación de los sitios de unión clave. El bolsillo vaniloide representado con el ají se encuentra entre los segmentos S3 y S4 donde se ha identificado diferentes ligandos tanto agonistas como antagonistas, entre los cuales se encuentran CAP, resiniferatoxina (RTX), capsazepina (CZP), fosfatidilinositol (PI), ácido oleico (AO), SB-366791. El ATP, representado con los triángulos verdes, interactúa con tres zonas: Anquirina 1, 2 y el C-

terminal. El sitio de unión del $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ se encuentra entre el S3 y el enlazador S4-S5 por encima de la caja TRP. Los protones representados con círculo verde, se une al lado extracelular en el enlazador S5-S6. Figura tomada de (Shuba, 2021).

1.4 El TRPV1 y el Ácido Zoledrónico

El Ácido Zoledrónico (ZOL) pertenece a un conjunto de moléculas conocidas como bifosfonatos (BPs). Estas derivan del pirofosfato y se han utilizado por varias décadas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el desequilibrio entre la formación de hueso mediada por los osteoblastos y la resorción del hueso mediada por los osteoclastos (Cheer and Noble, 2001). Los BPs son agentes antirresortivos específicos del hueso por lo que su acción reduce la pérdida de masa ósea. Los BPs son potentes inhibidores de la farnesil pirofosfato sintasa. La inhibición de esta enzima elimina modificaciones post-traduccionales en proteínas necesarias para la actividad de los osteoclastos y su sobrevivencia celular, lo que reduce su proliferación. A pesar de que los BPs no se encuentran clasificados como analgésicos, se ha encontrado evidencia empírica que, como efecto colateral al tratamiento de enfermedades óseas que incluyen el dolor como síntoma, se produce alivio del dolor (Tzschentke, 2021). En el 2005 se realizó un ensayo clínico en mujeres japonesas con metástasis óseas por cáncer de mama y en tratamiento con ZOL, a quienes se les solicitó participar en un cuestionario del Inventario Breve del Dolor (BPI, siglas en inglés). Comparado con el grupo placebo se encontró una disminución significativa en la percepción del dolor en las pacientes tratadas con el ZOL (Kohno *et al.*, 2005). De esa misma manera, se ha documentado en otros ensayos clínicos que al tratar a los pacientes con ZOL reduce el dolor (Ripamonti *et al.*, 2007; Laslett *et al.*, 2012; Agarwala, Sharoff and Jagani, 2020). Además, se ha reportado de manera experimental en modelos de dolor una disminución de la hiperalgesia al administrar ZOL (Nagae *et al.*, 2006; Nagae, Hiraga and Yoneda, 2007; Wang *et al.*, 2018).

Nitrogen-containing bisphosphonates

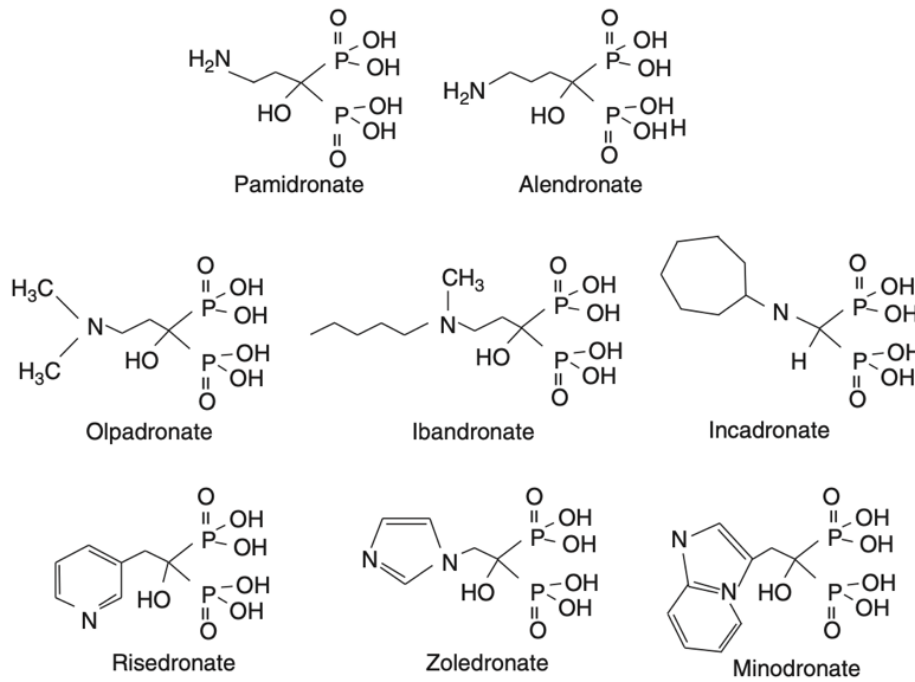


Figura 3. Estructuras de los bifosfonatos. La mayoría de los BPs de uso clínico actual cuentan con un hidroxilo o un nitrógeno siendo de segunda y tercera generación. Los BPs que tienen incorporado nitrógeno como el ZOL les otorga una mayor actividad antirresortivos. Figura tomada de (Drake *et al.*, 2008).

El sistema esquelético se encuentra inervado por fibras sensoriales que se originan en el DRG y que expresan TRPV1, las cuales inervan el hueso mineralizado, el periostio y la médula ósea (Morgan *et al.*, 2019), por lo cual tienen la capacidad de detectar estímulos nociceptivos, térmicos y mecánicos. Los osteoclastos liberan protones para llevar a cabo la resorción ósea y en condiciones patológicas se crea un microambiente ácido debido al aumento en su actividad. Considerando que los canales TRPV1 son activados por pH ácidos (<6), estos podrían tener un papel en la regulación en la transmisión del dolor y la inflamación en el tejido óseo (Bjurholm *et al.*, 1988; Caterina and Julius, 2000; Abed *et al.*, 2009; Kanaya *et al.*, 2016; Brazill *et al.*, 2019; Steverink *et al.*, 2021).

Antecedentes preliminares del laboratorio obtenidos mediante modelado molecular y análisis de acoplamiento sugieren que el ZOL tiene el potencial de unirse al canal TRPV1. Para estos análisis, se utilizó la estructura APO del canal (PDB: 3J5P) y la estructura unida a CAP (PDB:

3J5R) (Cao et al., 2013). La estructura del ZOL se descargó de Pubchem (ID 68740) y se obtuvieron seis conformeros del ZOL a través de LigPrep. El análisis indica que el ZOL podría interactuar con los residuos R579, R575, K688, D576 y Q561 del sitio de unión de PI(4,5)P₂ (**Figura 4A**) y con los residuos T550, Y511 y E570 del sitio de unión CAP (**Figura 4B**). Las energías de unión indican que existe una mayor afinidad por el sitio de unión de PI(4,5)P₂, obtenida del conformero 2 con -6.2 kcal/mol cuando se comparó con la energía de unión del sitio de unión CAP obtenida con el conformero 3 con -4.6 kcal/mol.

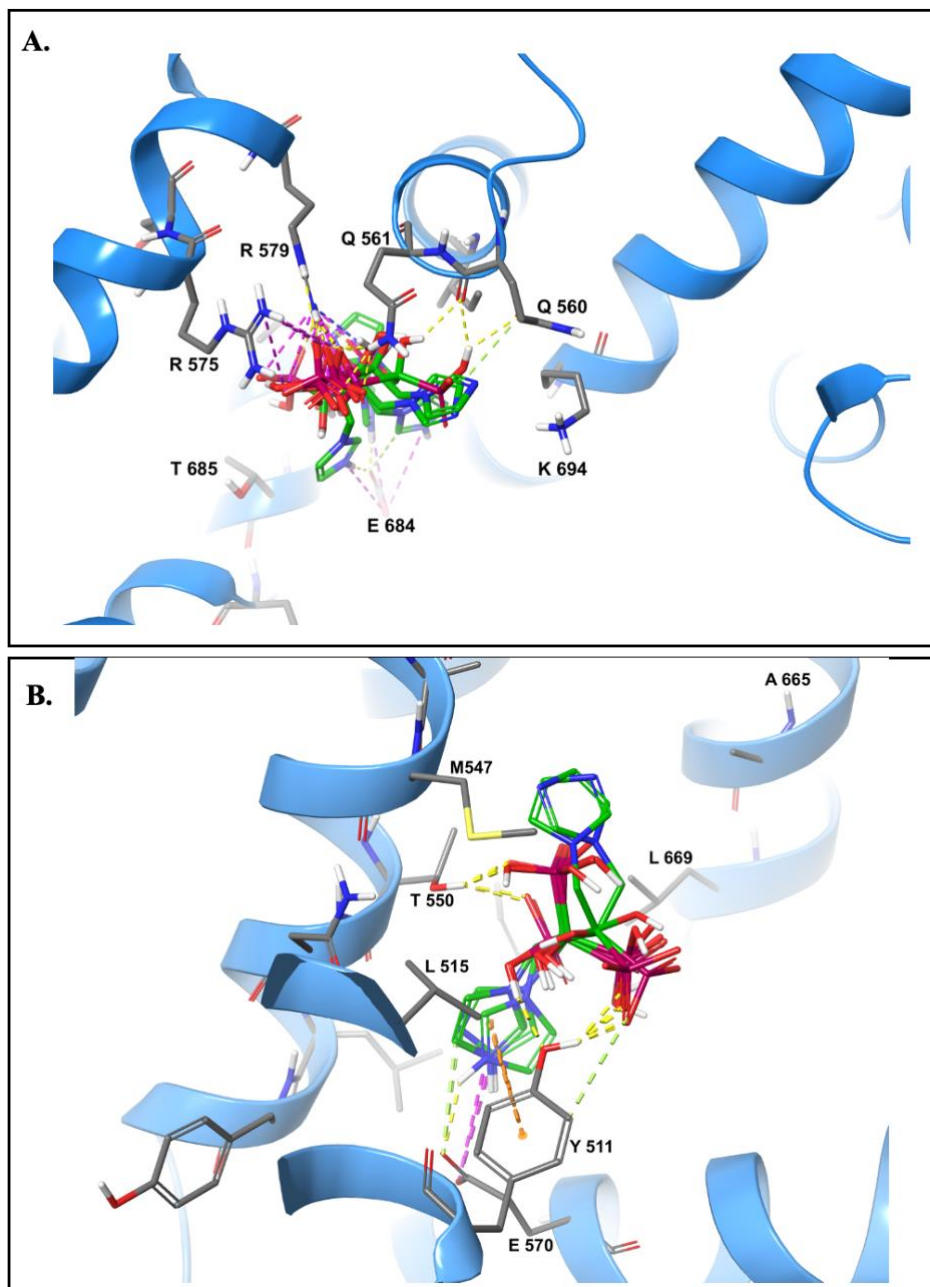


Figura 4. El ácido zoledrónico puede unirse al bolsillo de unión del PI(4,5)P₂ o al sitio de unión CAP en el canal TRPV1. El modelo molecular del canal TRPV1 obtenido por **docking molecular** muestra que las interacciones predominantes entre ZOL y TRPV1 son: enlace de hidrógeno (amarillo); apilamiento π - π (naranja); puente salino (fucsia); enlace π , -hidrógeno). **A.** Interacciones del conformero 2 ZOL y los residuos R579, R575, K688, D576 y Q561. Los residuos R579 y R575 obtenidos del *docking* molecular son los residuos donde interactúa el PI(4,5)P₂ con el canal TRPV1, ubicado en el segmento S4-S5 (Poblete *et al.*, 2015). **B.** Interacciones del conformero 3 ZOL y los residuos T550, Y511 E570. Datos obtenidos previamente en el laboratorio.

Tabla 1. Energías de unión de los sitios de unión PI(4,5)P₂ y CAP del canal TRPV1 entre tres conformeros de ZOL, obtenidas mediante los *docking* molecular.

Sitio unión PI(4,5)P ₂	Sitio de unión de CAP
3J5P-APO	3J5R- TRPV1-CAP
PI(4,5)P ₂ : -6.0 kcal/mol	Capsaicina: -7.0 kcal/mol
Conformero 2: -6.2 kcal/mol	Conformero 3: -4.6 kcal/mol
Conformero 1: -5.8 kcal/mol	Conformero 4: -4.3 kcal/mol
Conformero 3: -5.6 kcal/mol	Conformero 5: -3.5 kcal/mol

En el laboratorio hemos llevado a cabo registros electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp* en configuración *inside-out* de corrientes macroscópicas y de canal único en ovocitos de *Xenopus laevis* expresando canales TRPV1. En los registros obtenidos de corrientes macroscópicas evocados por un pulso cuadrado de voltaje entre -60 y 250 mV y regresando a -60 mV (**Figura 5A**) se observa una disminución progresiva en el tiempo de la amplitud de la corriente del canal TRPV1 al exponer la parte interna del parche a 30 μ M ZOL. De igual forma, podemos observar una disminución de la amplitud de la corriente tras perfundir a 1 μ M ZOL (**Figura 5B**) en registros de corrientes macroscópicas evocados por una serie pulsos cuadrados de voltaje que va desde -60 hasta 250 mV en escalones de 20 mV y regresando a -60 mV. Hemos observado que posterior a la estimulación con ZOL no se recupera la actividad del canal tras agregar 10 μ M CAP (**Figura 5B**), lo que sugiere un posible efecto inhibitorio irreversible del ZOL. En caso de los registros de canal único obtenidos en presencia de 100 μ M ZOL a diferentes tiempos hemos observado (**Figura 6A**) que al cabo de varios minutos después de agregar el ZOL se produce un colapso de la

conductancia del canal y solo se vuelve a recuperar utilizando concentraciones altas de 10 μM CAP

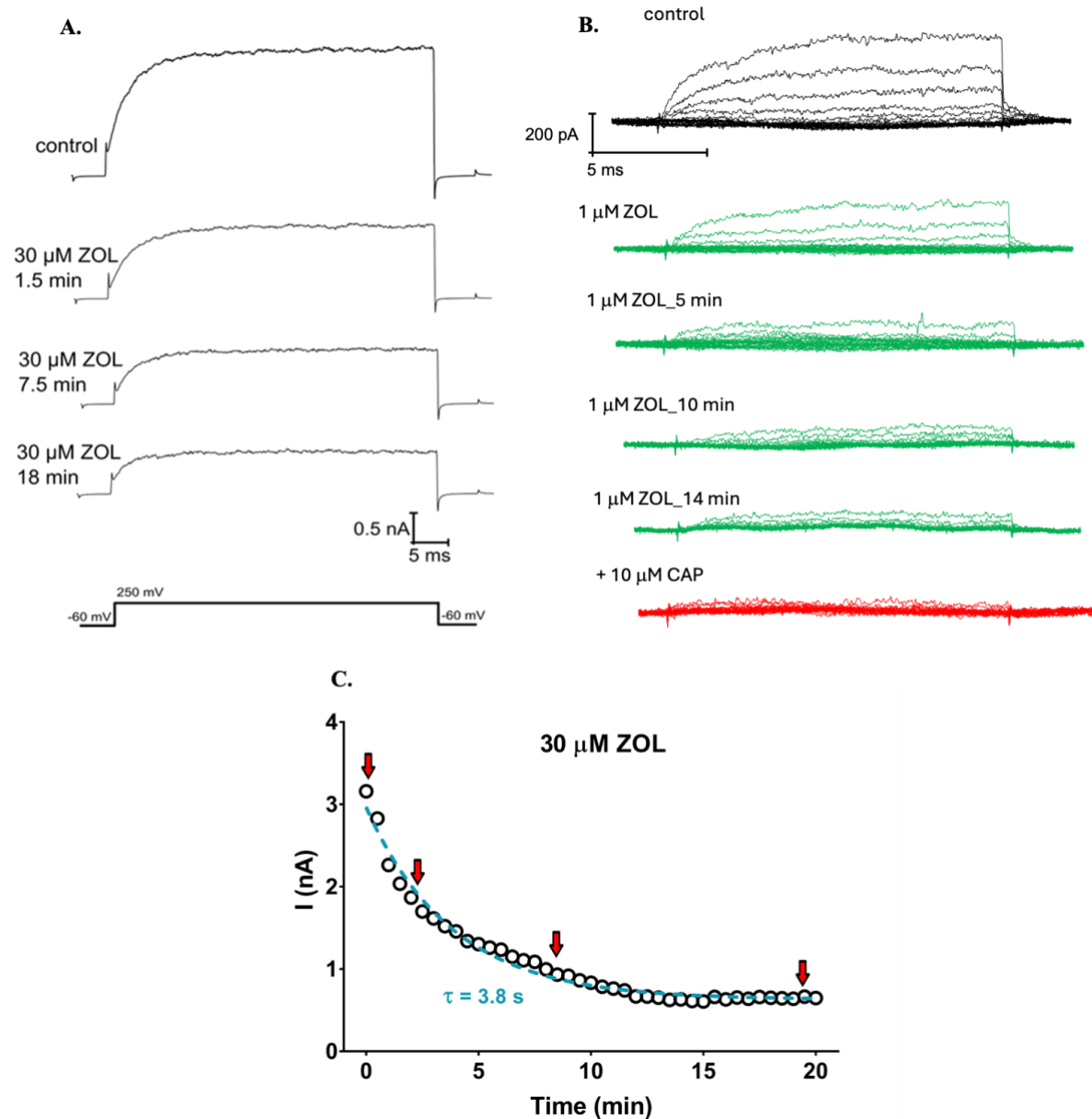


Figura 5. Efecto de ZOL sobre las corrientes iónicas de TRPV1 expresado en ovocitos de *X. laevis*. A-B. Efecto de ZOL sobre las corrientes macroscópicas del canal TRPV1 obtenidas en la configuración *inside-out* del parche de membrana, evocados por una serie de pulsos cuadrados de voltaje que van desde -60 hasta 250 mV en escalones de 20 mV y regresando a -60 mV. Se observa de manera clara la disminución de la corriente macroscópica desde el inicio de la aplicación hasta su drástica disminución con el tiempo de exposición a ZOL. Además, este efecto es más rápido a concentraciones más altas de ZOL (no mostrado). En **B**, es posible observar que el efecto es irreversible ya que, al agregar una alta concentración de CAP (10 μM), no se recupera la

actividad del canal. En **C**, se muestra una gráfica de corriente vs tiempo del registro representativo (A) que muestra el cambio de amplitud con función al tiempo, los distintos tiempos se indica con las flechas rojas. El ajuste de los datos a una función exponencial produjo una constante de tiempo de: $\tau = 3.8$ s.

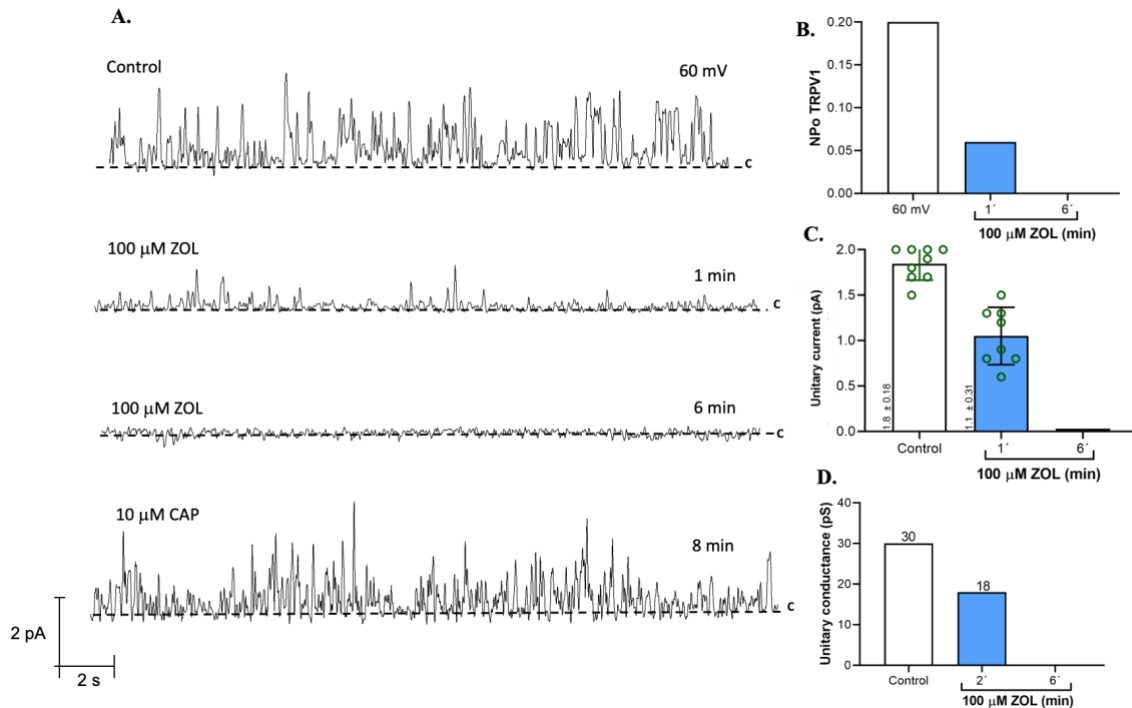


Figura 6. Registros representativos del efecto del ZOL en la actividad de un solo canal de TRPV1, el estado cerrado del canal se marca con las líneas puntadas (----- c). Los minutos representan el tiempo total que duró el parche tras las perfusiones, los minutos indican el tiempo de exposición del ZOL en la cámara de registro. **A.** Registros de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantención de 60 mV. Perfundiendo con 100 μ M ZOL provoca inicialmente una disminución hasta colapsar la conductancia del canal TRPV1. **B.** Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a 60 mV y en presencia de ZOL 100 μ M. **C.** Corriente unitaria del canal TRPV1. **D.** Conductancia unitaria en picoSiemens (pS). Los datos se muestran con el promedio \pm SEM.

Con base en los antecedentes descritos es posible proponer que el ZOL interactúa con canal TRPV1 conllevando a la inhibición de la corriente. Creemos que la unión de ZOL puede ser a través del sitio de unión del PI(4,5)P₂ o del sitio de unión CAP lo que conllevaría a la inhibición, siendo la unión posiblemente de carácter irreversible. De este modo, es posible que se dé una cooperatividad negativa entre los residuos ubicados en el S3 y el enlazador S4-S5 que forman parte del sitio de unión PI(4,5)P₂ o los residuos ubicados en el S3 y S4 del sitio de unión CAP, que en el tiempo determinado experimentalmente evoca el fenómeno de

inhibición irreversible de la corriente TRPV1. En esta tesis de magister se propuso determinar la relevancia de los sitios de unión PI(4,5)P₂ y sitio de unión CAP del canal TRPV1 en la inhibición de la actividad del canal por ZOL. Para poder validar esta hipótesis se llevó a cabo diferentes aproximaciones experimentales incluyendo biología molecular, expresión en sistema heterólogo y electrofisiología. Se realizó mutaciones sitio dirigidas (**Tabla 2 y Tabla 3**) que permitan aislar el sitio de unión, y este luego se caracterizara mediante *patch-clamp*.

2. Hipótesis

El ácido zoledrónico (ZOL) es un inhibidor alostérico del canal receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

- Determinar la relevancia del sitio de unión PI(4,5)P₂ y sitio de unión CAP en la inhibición de la actividad del canal TRPV1 por ZOL.

3.2 Objetivo Específicos

- Demostrar que el ZOL se une al sitio de unión del PI(4,5)P₂ en el canal TRPV1 realizando mutaciones sitio dirigidas y caracterizándola electrofisiológicamente mediante registros de canal único.
- Demostrar que el ZOL se une al sitio de unión del CAP en el canal TRPV1 realizando mutaciones sitio dirigidas y caracterizándola electrofisiológicamente mediante registros de canal único.

4. Metodología

4.1. Obtención y cuidado de los animales

Se utilizó la rana *X. laevis* silvestre, capturadas en colonias locales en la República de Chile, Región central. Las ranas son mantenidas en estanque de plástico opacas y cubierto de 40 L de agua (pH: 7.5), aproximadamente se distribuye de 2 a 4 animales por estanque. Se mantiene en una habitación a una temperatura de 18° C, con ciclo de luz/oscuridad 12/12 horas. Son alimentadas dos veces a la semana con comida para ranas (cat# SA05960 (LM) M, Nasco) (Alvarez *et al.*, 2019). Este protocolo fue evaluado por el Comité de Bioética Animal (CBC 88-2023) de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso (**Anexo 3**).

4.2. Preparación de los ovocitos

Las ranas de *X. laevis* fueron anestesiadas con 500 mL tricaina 0.1%, después de 30 minutos o una vez que no respondieran al reflejo de flexión de las patas traseras, se procedió a la cirugía. Con un bisturí se realizó a una pequeña incisión abdominal (1 cm) y con pinzas finas se extrajeron los lóbulos que contienen los ovocitos. Los lóbulos se colocaron en un tubo cónico de 50 mL con buffer OR-2. Posterior, se retiró la membrana externa para agrupar en secciones de 8-12 ovocitos utilizando pinzas de puntas finas. Una vez seccionado los ovocitos por grupo se lavaron 5 veces con el buffer OR-2, se agregó 40 mg de colagenasa en los 5 mL del tubo cónico de 50 mL donde están los ovocitos. Se agitó los ovocitos a 75 rpm durante 30 minutos en un miniagitador y posterior se limpió los ovocitos con el buffer ND96 1X. Se transfirió los ovocitos en una placa de Petri de vidrio de 100 mm con ND96 1X y se seleccionó los ovocitos para la microinyección del RNA del canal TRPV1 (Alvarez *et al.*, 2019).

4.3. Transcripción del RNA del canal TRPV1 para ser expresado en ovocitos *X. laevis*

Para expresar el TRPV1 en ovocitos de *X. laevis* se usó el plásmido PcDNA3 que es un constructo optimizado para este fin. La amplificación del plásmido PcDNA3-rTRPV1 se realizó mediante células competentes XL1-Blue (*Escherichia coli*) (Stratagene, La Joya, CA, USA) mediante choque térmico, siguiendo el siguiente protocolo (www.chem-agilent.com/pdf/strata/200229.pdf). La extracción y purificación del ADN de las células

transformadas se realizó con el siguiente protocolo del Kit QIApre (www.qiagen.com/handbooks). Para comprobar la linealización del ADN se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % (**Anexo 2**). Luego, se realizó una limpieza del ADN linealizado para mejorar la eficacia de la transcripción, utilizando el protocolo del kit de extracción en gel QIAquick (www.qiagen.com/handbooks). Se utilizó 1 µg del ADN linealizado limpio para la transcripción in vitro del ARNc TRPV1 de rata (GenBankTM no. NM031982) utilizando el kit mMMESSAGE mMACHINE Ambion (Waltham, MA, USA) (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1340>). Se obtiene entre 5 y 15 µg/µL de transcritos de ARN. Los transcritos de ARN del TRPV1, se diluyó en 3 µg/µL. Una vez, obtenido nuestro RNA del canal TRPV1 WT y TRPV1 mutantes se utilizó alícuotas de 2 µL en diluciones 1:10, 1:100, 1:500 y 1:100 para inyectar en ovocitos de *X. laevis* (Alvarez *et al.*, 2019).

La mutagénesis sitio dirigida se llevó a cabo a partir del diseño partidores utilizando el software SnapGeneTM. Todas las mutantes fueron generadas por el kit de mutación sitio dirigida Quickchange (Stratagene, La Jolla, CA). Todas las mutaciones fueron confirmadas por secuenciación de ADN en servicios de secuencia de ADN (Macrogene).

Tabla 2. Mutantes puntuales que se harán en el canal TRPV1 para caracterizar la unión de ZOL al sitio de unión del PI(4,5)P₂.

Sitio de unión PI(4,5)P ₂
R579A
D576A
R575A
K688A
Q561A
R575A-R579A-K688A

Tabla 3. Triple mutante del canal TRPV1 para caracterizar la unión de ZOL al sitio de unión del CAP.

Sitio de unión CAP
T550A-Y511A-E570A

4.4. Microinyección del ARN del canal TRPV1 en ovocitos de *X. laevis*

Se utilizó el microinyector de nanolitros (NANOLITER 2010, World Precision Instruments, MA, USA) y se inyectó 50 nL de **ARN** por ovocito, utilizando la dilución deseada. La microinyección se realizó con pipetas de vidrio (cat# 4878, World Precision Instruments, FL, EE.UU) extraídas mediante un extractador de micropipetas P-97 (Sutter Instruments, CA, EE.UU). Las pipetas deben tener una forma largas y finas con un diámetro de 15-30 μm en la punta. Se rellenan con aceite mineral libre de **ARN**asa y luego se rellenó con la alícuota de 2 μL del RNA del canal TRPV1. Posterior, se procedió a la microinyección en los ovocitos de *X. laevis* y se esperó de 2-4 días para ser utilizados en la obtención de registros electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp* (Alvarez *et al.*, 2019).

4.5. Fabricación de pipetas *patch-clamp* y equipo electrónico

Las pipetas de registro se obtuvieron a partir de pipetas de vidrio de borosilicato (1B150F-4, World Precision Instrument) estiradas en un *puller* de micropipeta horizontal (P-97, Sutter Instruments) y luego se pulieron en una microforja (Narishige) bajo un microscopio. Las pipetas se pulieron a fuego hasta obtener la forma y el diámetro deseado. Los registros de corrientes macroscópicas se realizaron con pipeta cuya resistencia fue de 1-1.2 M Ω y para registro de corrientes de canal única 3.5-5.5 M Ω .

Las corrientes se registraron con un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments) y se digitalizaron en una computadora utilizando una interfaz análoga/digital Digidata (Axon Instruments). Los registros obtenidos se filtraron y ajustaron a la línea de base. Las corrientes de canal único se filtraron a 20-40 kHz y se muestrearon a 200 kHz utilizando el complemento Clampfit del software pClamp. Se estableció manualmente en los niveles de corriente de un solo canal

4.6. Caracterizar el canal TRPV1 WT y con diferentes mutaciones puntuales en el sitio de unión del PI(4,5)P₂ y sitio de unión CAP en presencia del ácido zoledrónico mediante la técnica de *patch-clamp*.

La estrategia experimental (**Anexo 4**) que se llevó a cabo para identificar el sitio de unión consiste en primera instancia en la caracterización de las corrientes macroscópicas y de canal único del canal rTRPV1 WT utilizando distintas concentraciones de ZOL. Para determinar la relevancia del sitio de unión del PI(4,5)P₂ y sitio de unión CAP en la unión de ZOL al canal rTRPV1, se generaron las mutantes simple y triples. Todas las mutaciones se encuentran descritas en la sección 4.3.

Para ello, una vez realizado la microinyección en ovocitos de *X. laevis* con rTRPV1 WT y mutantes. Se llevó los ovocitos a la cámara de registro del *patch-clamp*, las pipetas fueron rellenadas con solución de registro en mM: 150 NaCl, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7.4. Se utilizó la misma solución en el baño.

Todos los registros electrofisiológicos se obtuvieron en configuración *inside-out* a temperatura (18°C ± 1°C). El protocolo de registro de corrientes macroscópicas consistió en un pulso de voltaje cuadrado que va desde los -100 mV hasta los 280 mV, volviendo a un pulso de -180 mV en escalones de 20 mV, cada pulso con una duración de 40 ms. Los registros de canal único se realizaron mediante un pulso de voltaje continuo durante 2 minutos.

4.7. Análisis de datos

El análisis de corrientes macroscópicas se realizó utilizando el software pClamp 10.7 (Molecular Devices) y Origin (Origin Lab). En experimentos de canal único se evaluó la conductancia unitaria (g) a partir de la corriente unitaria (i) utilizando la ley de Ohm ($i = gV$, donde V es el voltaje) y la probabilidad de apertura del canal. Los datos de un solo canal se obtendrán mediante el uso del criterio de amplitud del 50% (Colquhoun, 1995). La probabilidad de encontrar el canal abierto (P_o) se calculó a partir de la suma de los tiempos de apertura para cada registro de corriente del canal único dividido por la duración total del registro utilizando el software pClamp.

5. Resultados

5.1 ZOL inhibe los canales TRPV1 WT expresados de forma heteróloga

En ovocitos de *X. laevis* con una microinyección de ARN del canal TRPV1 de rata (rTRPV1), se encontró que tras la aplicación del ZOL a distintas concentraciones, la actividad del canal TRPV1 disminuye, como se observa por una disminución de la magnitud de la corriente evocada por un protocolo de pulsos como se muestra en el pie de la **Figura 7** (pulsos cuadrados que va desde -100 mV hasta 280 mV regresando a 180 mV en escalones de 20 mV). Concentraciones de ZOL: 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM (**Figura 7A-D**), 30 μ M, 100 μ M (datos no mostrados). Esta disminución de la corriente es irreversible, ya que la aplicación de CAP 1 y 10 μ M, no permite recuperar la actividad del canal. Es necesario mencionar, que los registros de las corrientes macroscópicas fueron obtenidos previamente en el laboratorio.

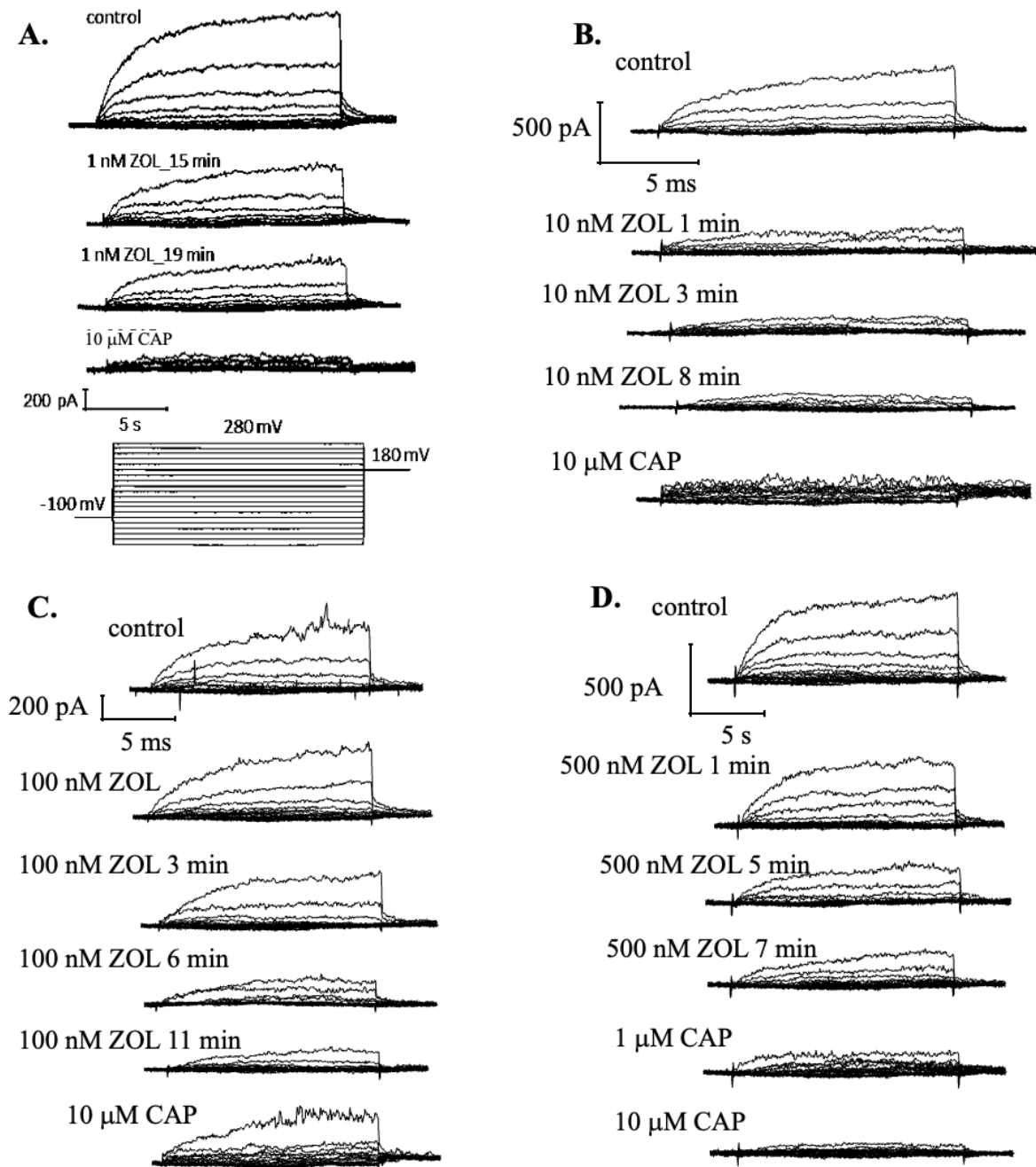


Figura 7. El ZOL actúa en los canales TRPV1. A-B. Los parches expuestos a 1 nM ZOL ($n=2$) y 10 nM ZOL ($n=2$) indican una inhibición drástica de las corrientes desde el inicio de su aplicación. C-D. Las corrientes evocadas por voltaje fueron inhibidas tras la aplicación de 50 nM ZOL (datos no mostrados, $n=2$), 100 nM ZOL ($n=1$), 500 nM ZOL ($n=3$), y no se vuelve a recuperar la actividad tras la aplicación del agonista CAP a concentraciones de 1 μ M y 10 μ M. Datos obtenidos previamente en el laboratorio.

A continuación, abordamos la interacción del ZOL en el canal TRPV1 mediante registro de canal único en configuración *inside-out* aplicando pulsos de -100 mV, 40 mV (dato no mostrado) durante 2 minutos. En estos experimentos, se obtuvieron la probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto (NPo) y la conductancia unitaria del canal. A un pulso mantenido de -100 mV durante 2 minutos podemos observar (**Figura 8A**) la activación de la corriente del canal TRPV1 y tras la perfusión de 10 nM ZOL podemos observar claramente el colapso de la conductancia del canal y al cabo de los 22 minutos el canal se encontraba totalmente cerrado. Estas observaciones son consistentes en rangos de concentraciones de 500 nM (**Figura 9A**) y 1 μ M ZOL (**Figura 10A**), y solo a concentraciones elevadas de CAP (0,5 y 10 μ M), en algunos casos, se logra recuperar la actividad. Estos resultados se correlacionan con los registros obtenidos con corrientes macroscópicas donde se refleja una inhibición del del canal TRPV1 en presencia del ZOL.

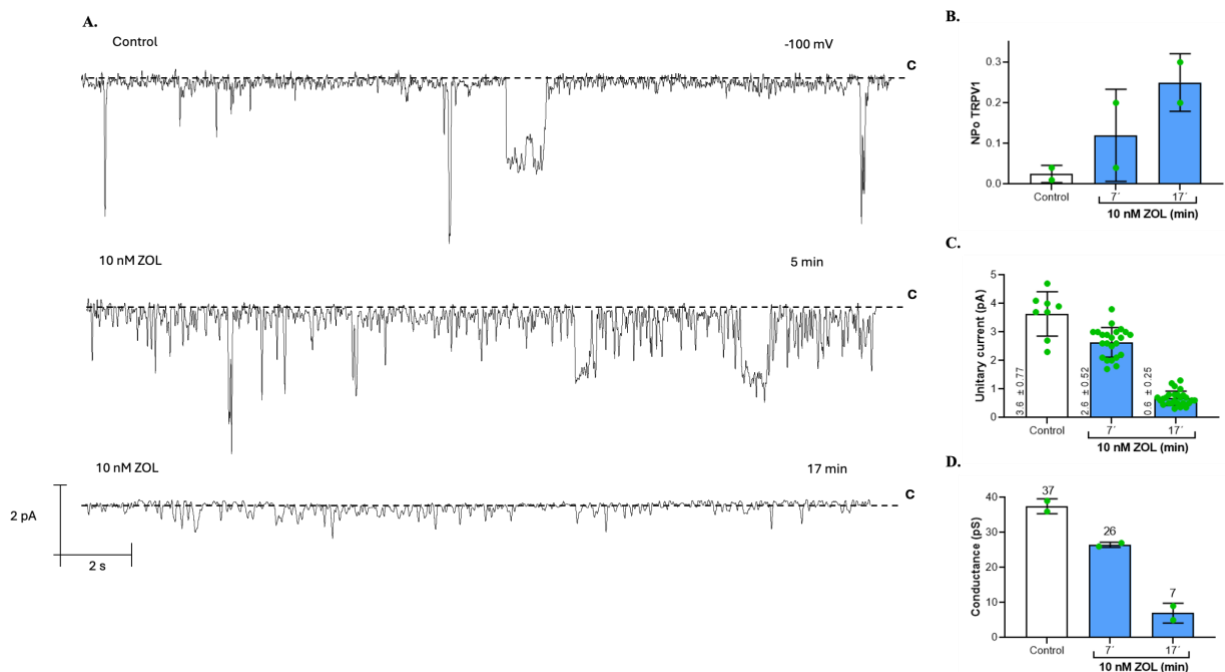


Figura 8. El ZOL colapsa la conductancia unitaria del canal TRPV1. A Registros representativo de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantención de -100 mV con una perfusión de 10 nM ZOL. B. Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a -100 mV y en presencia de ZOL 10 nM. C. Corriente unitaria del canal TRPV1. D. Conductancia unitaria en picoSiemens (pS). Los datos se muestran con el promedio \pm SEM (N=2).

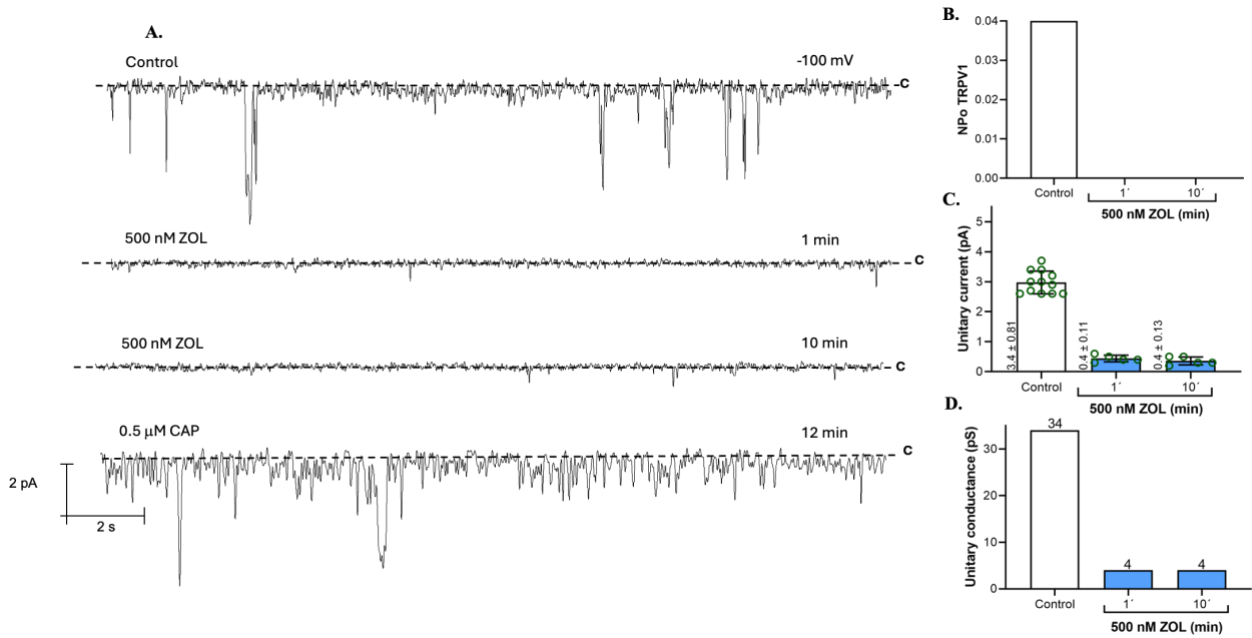


Figura 9. A Registro representativo de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantenimiento de -100 mV con una perfusión de 500 nM ZOL. B. Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a -100 mV en presencia de 500 nM ZOL. C. Corriente unitaria del canal TRPV1. D. Conductancia unitaria en picoSiemens (pS). (N=1).

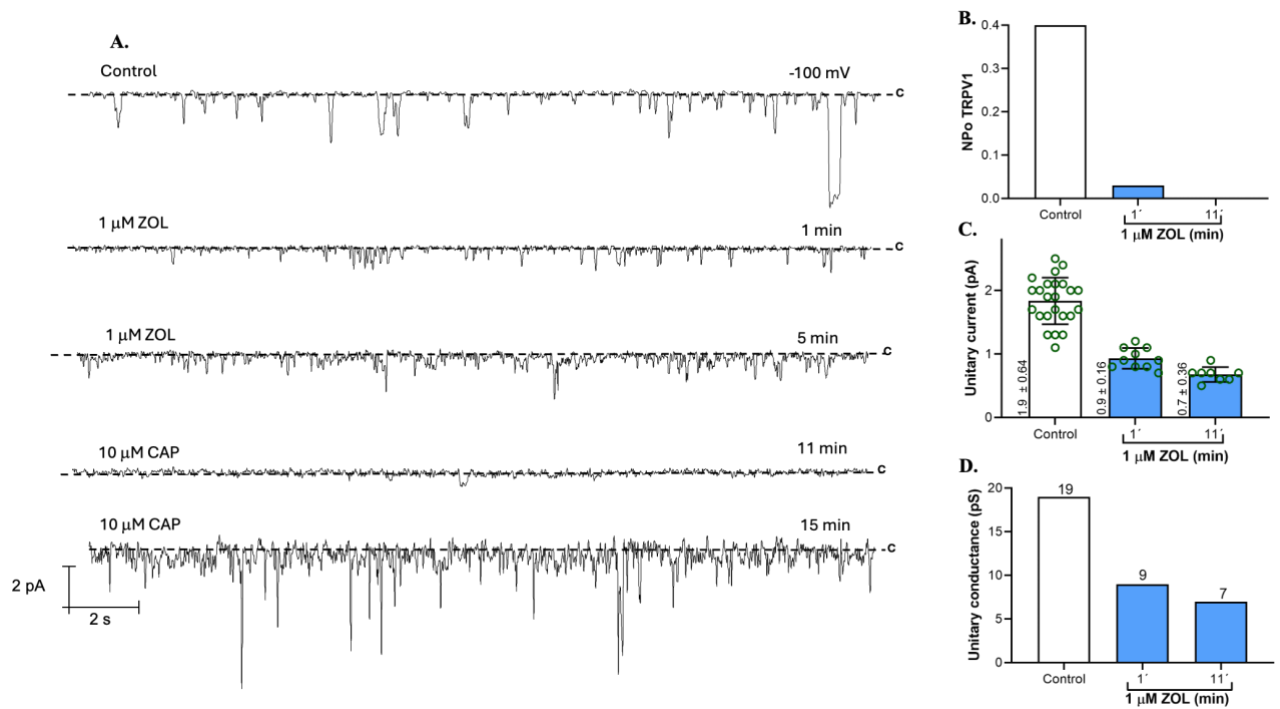


Figura 10. **A** Registro representativo de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantención de -100 mV con una perfusión de 1 μ M ZOL. **B.** Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a -100 mV en presencia de 1 μ M ZOL. **C.** Corriente unitaria del canal TRPV1. **D.** Conductancia unitaria en picoSiemens (pS). SEM (N=1).

5.2 Explorando el sitio de unión al PI(4,5)P₂ del canal TRPV1 en la unión del ZOL

A continuación, abordamos directamente el mecanismo molecular por el cual el ZOL inhibe los canales TRPV1. Dado que los análisis de *docking* sugieren que el sitio de unión al PI(4,5)P₂, podría estar interactuando con el ZOL, realizamos mutaciones puntuales en los residuos Q561, R575, R579, D576 y K688 reemplazando los por el aminoácido alanina (A). A continuación, sobreexpresamos el canal rTRPV1 con las mutaciones puntuales en los residuos R575A y Q561A en ovocitos de *X. laevis* y realizamos registros de canal único para evaluar el posible rol en la inhibición del canal. Como se observa, existe una respuesta inhibitoria tras la aplicación de 100 μ M ZOL al canal TRPV1^{R757A} a un pulso de 20 mV (**Figura 11A**) y -20 mV (**Figura 12A**), colapsando la conductancia hasta estabilizar el estado cerrado (**Figura 12B-C-D**) y la actividad del canal no se vuelve a recuperar a pesar de aplicar concentraciones de 0.5 y 1 μ M de agonista CAP. También observamos que tras la aplicación de 1 μ M ZOL al canal TRPV1^{R757A} a un pulso de 40 mV (**Figura 13A**) muestra una disminución progresiva con el tiempo de las corrientes y solo tras aplicar 1 μ M CAP se vuelve a recuperar la actividad del canal. Si observamos la frecuencia de eventos de apertura y cierre del canal (**Figura 13B**) se puede apreciar como los eventos de apertura van disminuyendo a lo largo del tiempo hasta colapsar la conductancia (**Figura 13D**) y estabilizar el estado cerrado. De acuerdo con los datos obtenidos de canal TRPV1^{R757A}, exploramos la neutralización del canal TRPV1^{Q561A} a concentraciones más baja. Tras la aplicación de 1 nM de ZOL con un pulso de 60 mV (**Figura 14A**) las corrientes unitarias del canal TRPV1^{Q561A} muestra un colapso de la conductancia y aunque se aplica 0.5 μ M CAP el canal no vuelve a recuperar la actividad.

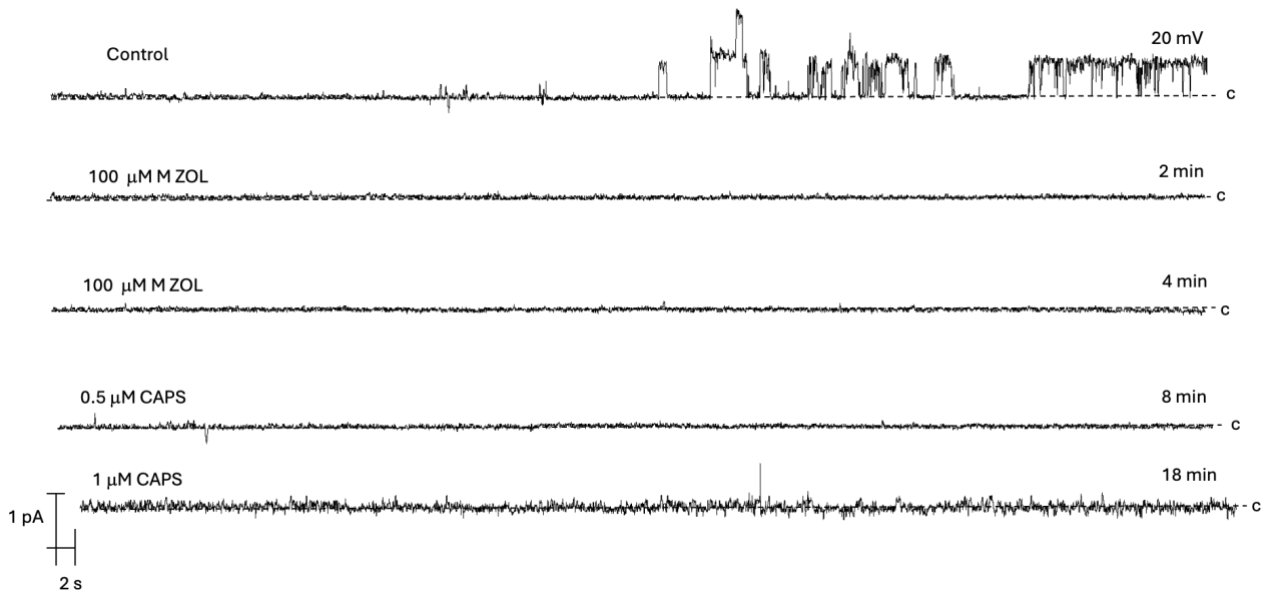


Figura 11. Explorando la neutralización del R575 del sitio de unión PI(4,5)P₂ en presencia de 100 μM ZOL. A Registros representativo de corrientes unitarias inducidas por el mutante R757A utilizando un potencial de mantención de 20 mV con una perfusión de 100 μM ZOL. (N=1).

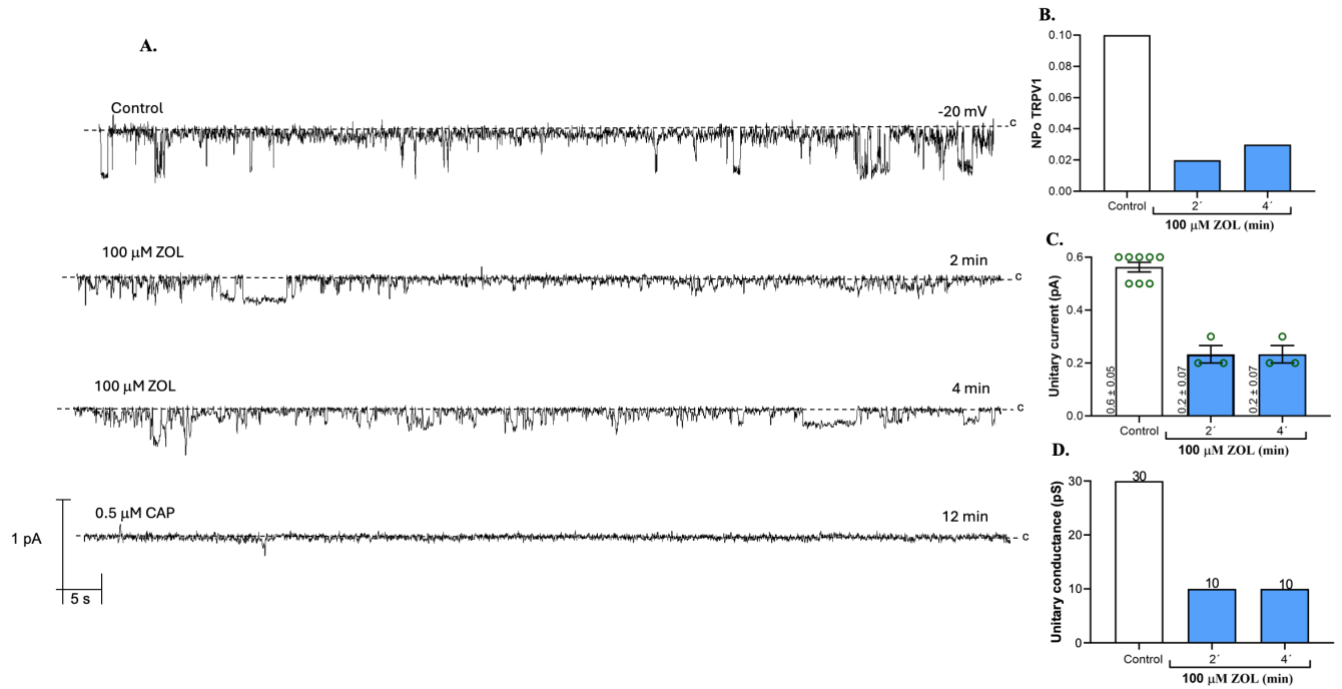


Figura 12. A Registro representativo de corrientes unitarias inducidas por el mutante R757A utilizando un potencial de mantenci3n de -20 mV con una perfusi3n de 100 μ M ZOL. B. Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a -20 mV en presencia de 100 μ M ZOL. C. Corriente unitaria del canal TRPV1. D. Conductancia unitaria en picoSiemens (pS). (N=1).

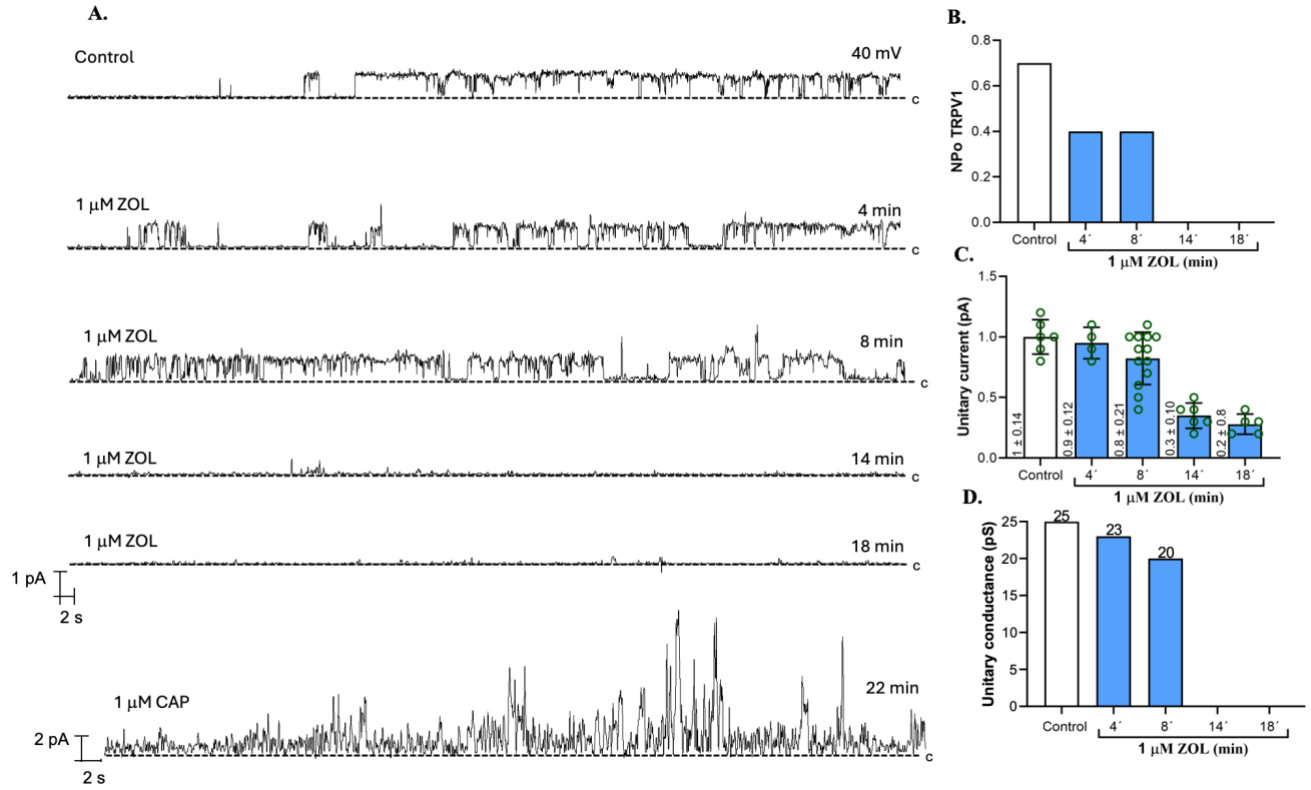


Figura 13. Explorando la neutralización del R575 del sitio de unión PI(4,5)P₂ en presencia de 1 μM ZOL
A Registros representativo de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantención de 40 mV con una perfusión de 1 μM ZOL. **B.** Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a 40 mV en presencia de 1 μM ZOL. **C.** Corriente unitaria del canal TRPV1. **D.** Conductancia unitaria en picoSiemens (pS). (N=1).

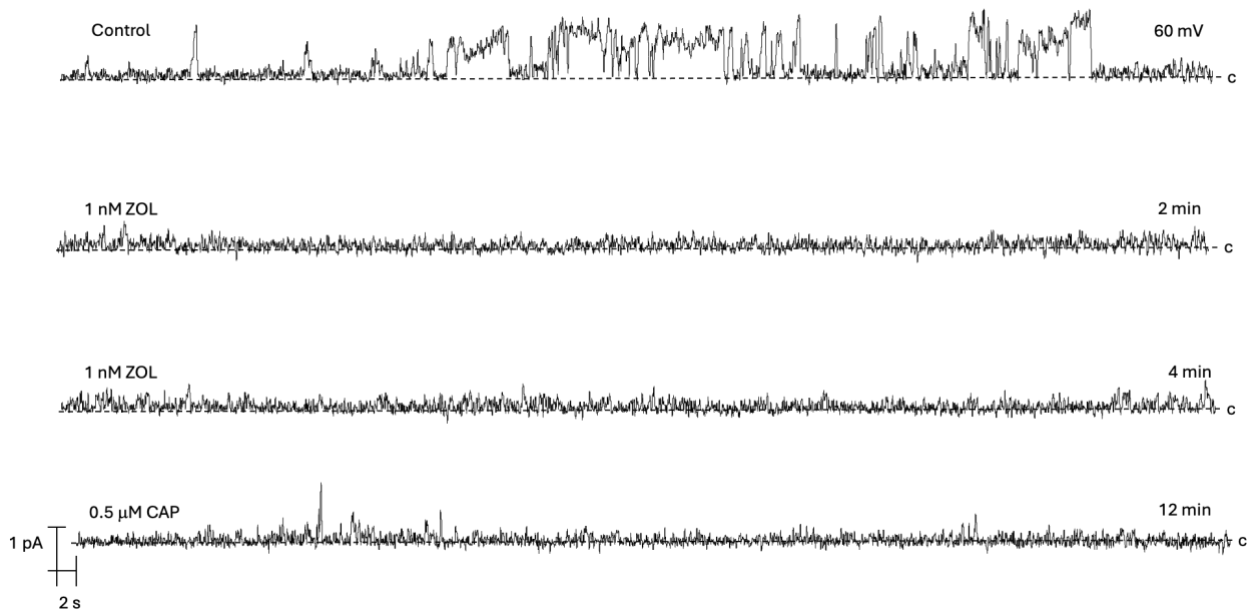


Figura 14. Corrientes unitarias del mutante Q561A del sitio de unión PI(4,5)P₂ en presencia de 1 nM ZOL. A Registros representativo de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantención de 60 mV con una perfusión de 1 nM ZOL. (N=1).

Considerando que las mutaciones simples en los residuos R575 y Q561 no alteró la inhibición del canal TRPV1 con ZOL, nos planteamos realizar una triple mutante de los residuos R575-R579-K688 en la posición del sitio de unión del PI(4,5)P₂. En consecuencia, la sustitución de los residuos R575-R579-K688 por alanina no tuvo efecto en la inhibición del canal TRPV1 tras la aplicación de 1 nM ZOL cuando se obtuvieron los registros de canal único a pulso de 40 mV (**Figura 15A**) y -40 mV (**Figura 16A**) con una duración de 2 minutos. Los resultados obtenidos de las mutaciones simple y de la triple mutante del sitio de unión PI(4,5)P₂, sugiere que dicho sitio no estaría involucrado en la inhibición del canal TRPV1 por el ZOL.

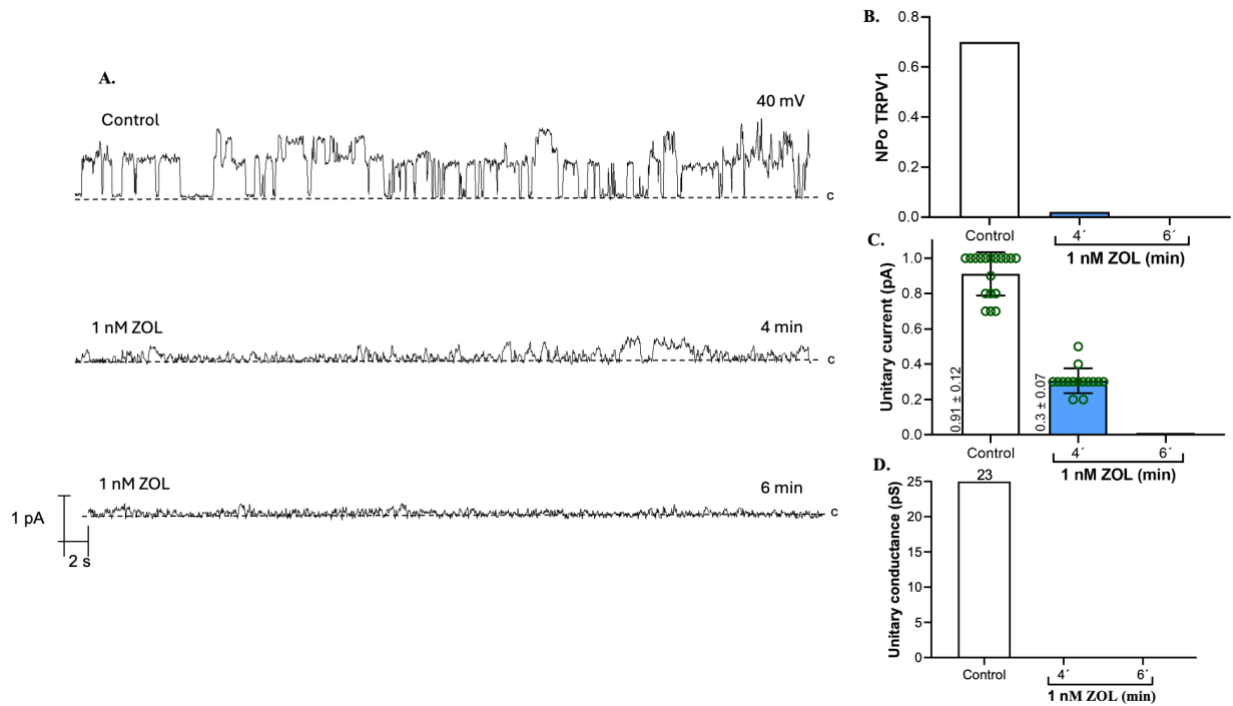


Figura 15. Explorando el efecto de ZOL sobre la triple mutante R575-R579-K688 del sitio de unión PI(4,5)P₂. **A.** Registros representativo de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantenimiento de 40 mV con una perfusión de 1 nM ZOL. **B.** Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a 40 mV en presencia de 1 nM ZOL. **C.** Corriente unitaria del canal TRPV1. **D.** Conductancia unitaria en picoSiemens (pS). (N=1).

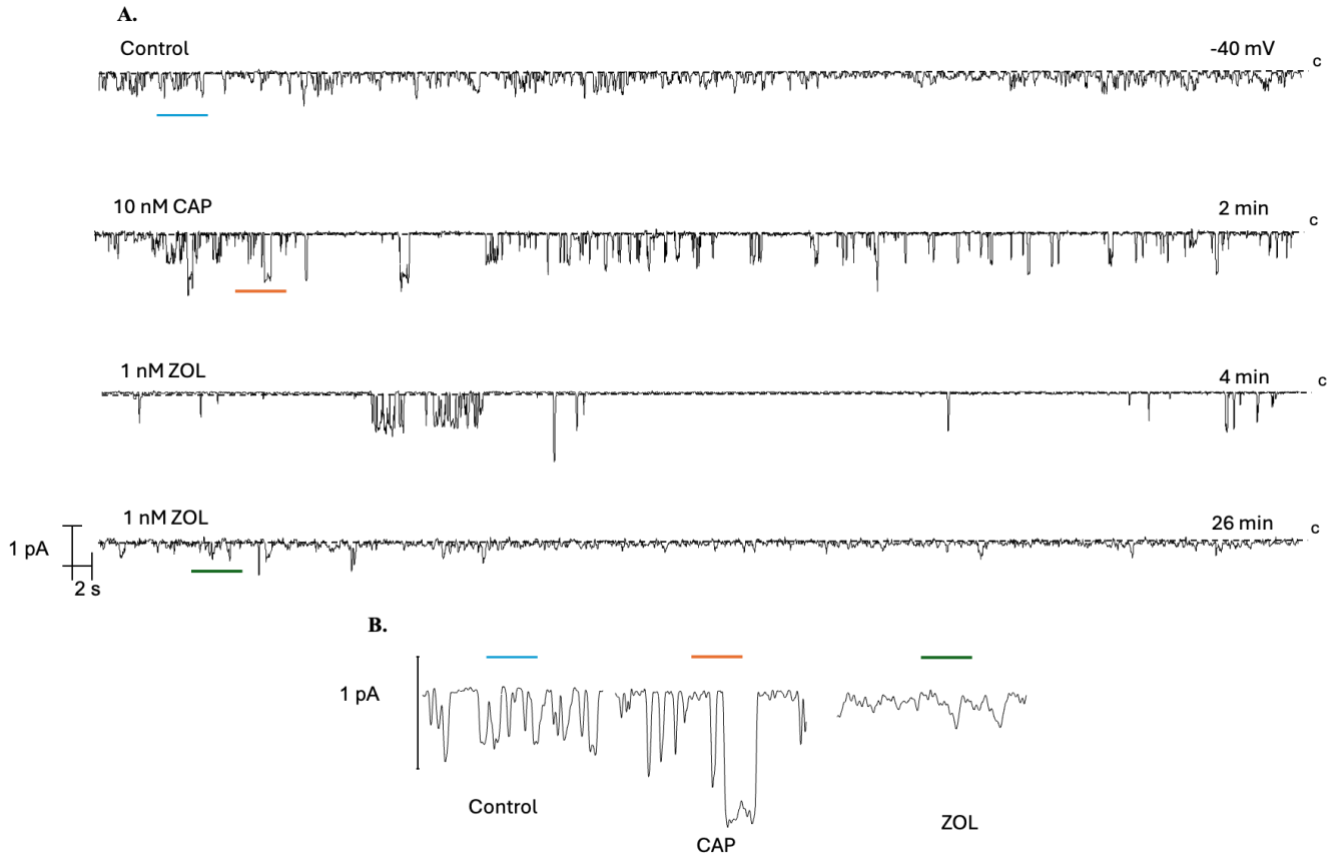


Figura 16. A. Registro representativo de canal único de TRPV1 con la neutralización del R575-R579-K688 con un pulso constante de -40 mV expuesto a 1 nM ZOL muestra una disminución progresiva de la corriente con el tiempo y a pesar de que se expone con 10 nM CAP el canal pierde su actividad. **B.** Ampliaciones del registro representativo A, los colores representa el control (celeste), 10 nM CAP (naranja) y 1 nM ZOL (verde) indican las regiones donde se amplió la corriente unitaria. (N=1).

5.3. Implicaciones del sitio de unión de CAP en la regulación del canal TRPV1 por ZOL

En consideración con los resultados obtenidos del sitio de unión PI(4,5)P₂, investigamos la interacción del ZOL con el bolsillo de CAP del canal TRPV1. Para ello, se realizó una triple mutante en los residuos T550, Y511 y E570 y se reemplazó por el aminoácido alanina. Los experimentos preliminares de canal único muestran que tras aplicar 10 nM (**Figura 17A**) y 500 nM ZOL (**Figura 19A**) las corrientes unitarias no se vieron afectadas. En el experimento a una concentración de 100 nM ZOL (**Figura 18A**) se puede observar que las corrientes unitarias no se ven afectadas y además se registra un aumento de la corriente en función al

tiempo después de la aplicación del ZOL. Estos resultados sugieren que el sitio de unión de CAP se encuentra involucrado en la regulación del canal TRPV1 por ZOL.

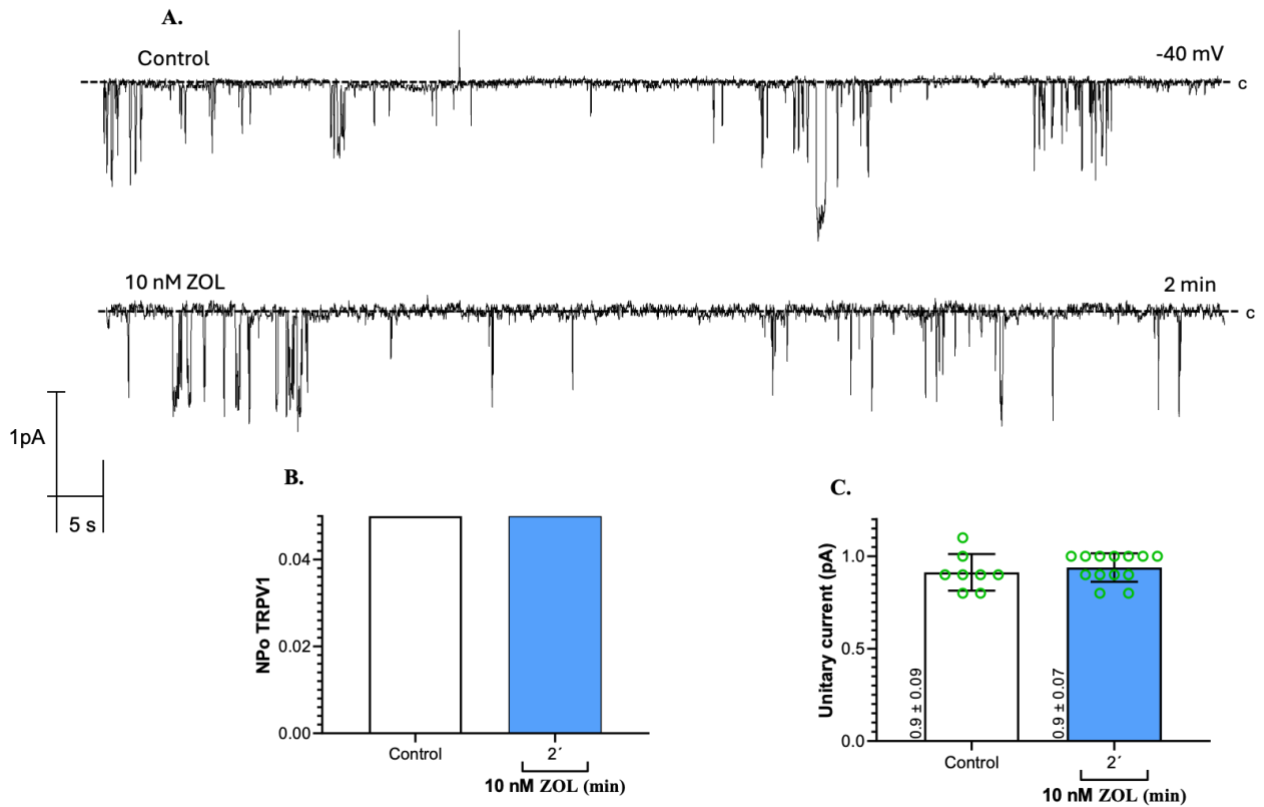


Figura 17. Explorando el efecto del ZOL sobre la triple mutante T550A-Y511A-E570A del sitio de unión de la CAP. A. Registros representativos de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantenimiento de -40 mV con una perfusión de 10 nM ZOL. **B.** Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a -40 mV en presencia de 1 nM ZOL. **C.** Corriente unitaria del canal TRPV1. (N=1).

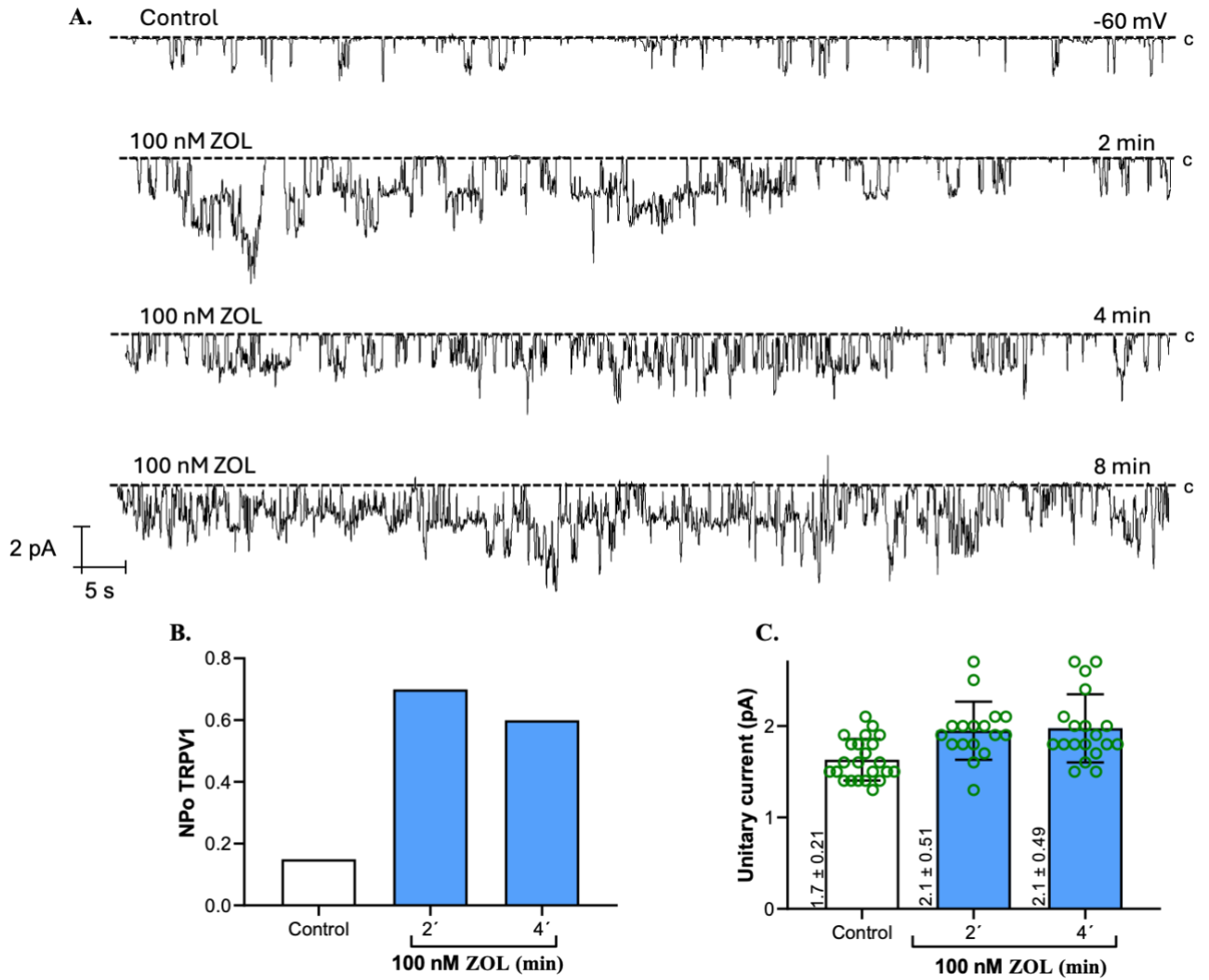


Figura 18. Explorando el efecto del ZOL sobre la triple mutante T550A-Y511A-E570A del sitio de unión de la CAP. **A.** Registros representativos de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantenimiento de -60 mV con una perfusión de 100 nM ZOL. **B.** Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a -60 mV en presencia de 100 nM ZOL. **C.** Corriente unitaria del canal TRPV1. (N=1).

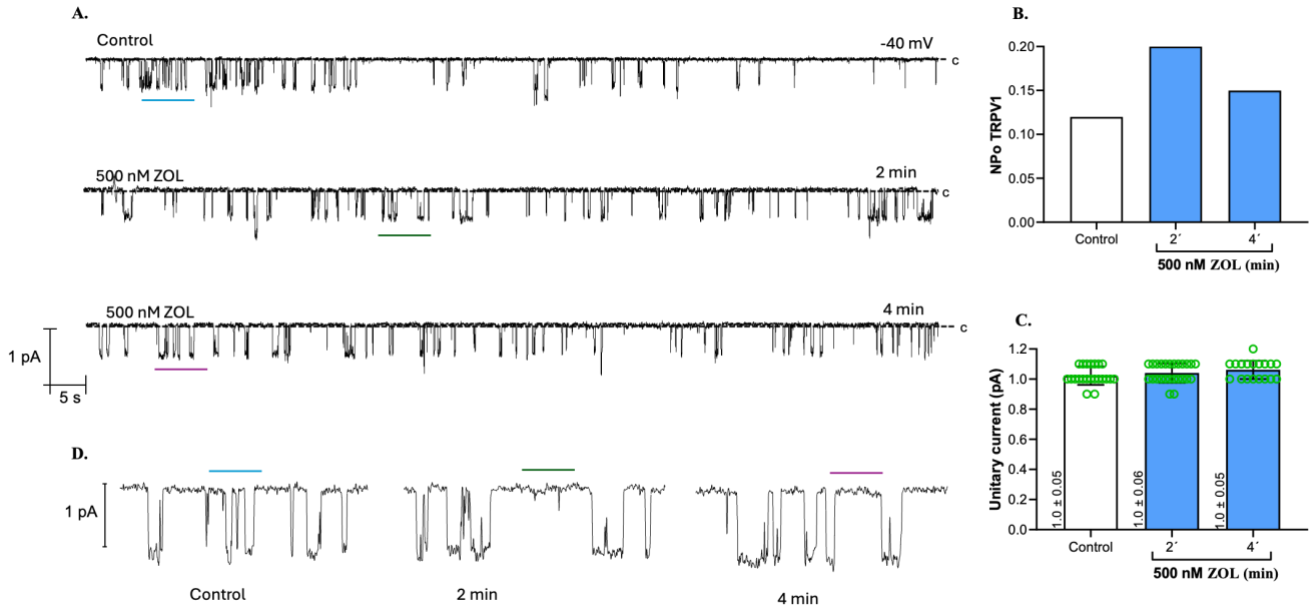


Figura 19. Explorando el efecto del ZOL sobre la triple mutante T550A-Y511A-E570A del sitio de unión de la CAP. A. Registros representativos de corrientes unitarias utilizando un potencial de mantenimiento de -40 mV con una perfusión de 500 nM ZOL. **B.** Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a -40 mV en presencia de 500 nM ZOL. **C.** Corriente unitaria del canal TRPV1. **D.** Ampliaciones del registro representativo B, los colores representa el control (celestes), 2 minutos después de 500 nM ZOL (verde) y 4 minutos después de 500 nM ZOL (purpura) indican las regiones donde se amplió la corriente unitaria. (N=1).

5.4. Efecto del ZOL en el lado extracelular del canal TRPV1 WT

Ahora, evaluamos los efectos del ZOL en el lado extracelular del canal TRPV1 WT. Se hicieron registros de canal único en configuración *inside-out* donde se aplicó ZOL en la solución de la pipeta, en estos experimentos se agregó solución de registro hasta la mitad de la pipeta y luego se terminó de rellenar con 500 nM ZOL. Como podemos observar (**Figura 20**) hay un colapso de la conductancia de manera inmediata tras a un pulso de -40 mV y no recupera su actividad tras aplicar 1 μ M CAP. Sin embargo, no se estabiliza el estado cerrado del canal, de hecho, hay un aumento de la NPo en las corrientes registradas con ZOL. Estos resultados preliminares, sugieren una posible interacción del ZOL con el lado extracelular del canal TRPV1.

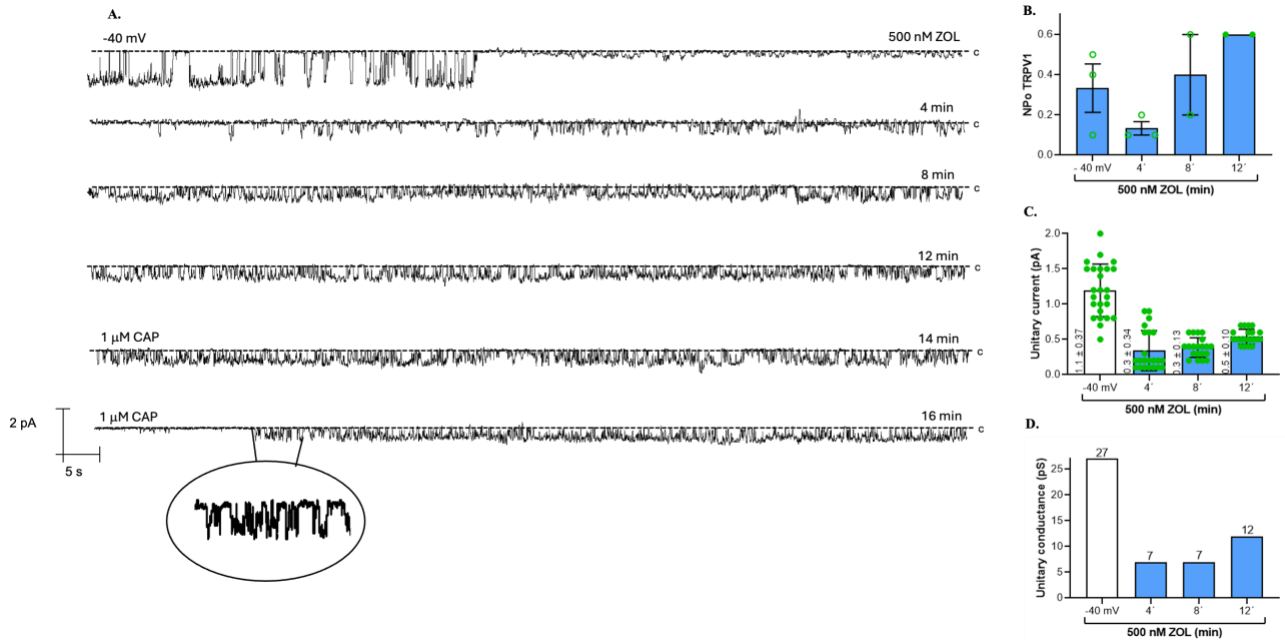


Figura 20. Efecto del ZOL en lado extracelular del canal TRPV1 WT. A. Registro representativo de canal único del canal TRPV1 WT a un pulso de -40 mV durante 2 minutos se observa una disminución en la conductancia de las corrientes tras aplicar 500 nM ZOL y no se recupera la actividad tras agregar 1 μM CAP. B. Probabilidad de encontrar el canal en su estado abierto a -40 mV y en presencia de ZOL 500 nM. C. Corriente unitaria del canal TRPV1. D. Conductancia unitaria en picoSiemens (pS). Los datos se muestran con el promedio ± SEM (N=3).

6. Discusión

El canal TRPV1 es uno de los principales sustratos moleculares que inicia la respuesta al dolor (Caterina *et al.*, 1997). A pesar de que en las últimas dos décadas se ha hecho una búsqueda intensiva de nuevos ligandos como alternativa terapéutica para el alivio del dolor, ningún antagonista ha sido aprobado para uso clínico debido a efectos secundarios observados en los ensayos tanto en modelos animales como en humanos (Daniluk and Voets, 2023).

Actualmente, el ZOL no se encuentra clasificado como un analgésico, su función principal es de ser un agente antirresortivo específico del hueso (Cheer and Noble, 2001). Entendiendo que el uso de este medicamento en pacientes con estas enfermedades conlleva como resultado colateral un efecto analgésico (Ibrahim *et al.*, 2003), estudiar el mecanismo molecular desde un punto de vista fisiológico y farmacológico de su(s) posible(s) blanco(s), nos permitirá establecer cómo ocurre la inhibición del canal, donde se pueda abordar desde otra perspectiva de los efectos ZOL en condiciones patológicas óseas.

Existe pocos reportes que describan las propiedades biofísicas del ZOL en los canales iónicos, se ha reportado que las corrientes del canal BK son activadas a una concentración de 100 μM ZOL (Ma *et al.*, 2012) e inhibe las corrientes del canal K sensible al ATP (KATP) a concentraciones subnanomolar (Maqoud *et al.*, 2021). Aquí, hemos descrito que la potencia de ZOL para inhibir las corrientes macroscópicas del canal WT TRPV1 evocadas por voltaje se encuentra en un rango de concentración de 1 nM hasta 100 μM (**Figura 7**). Estos hallazgos se correlacionan con los experimentos obtenidos de un solo canal donde ocurre colapso de la conductancia del canal (**Figura 8-9-10**).

Recientemente se ha obtenido la estructura del canal TRPV1 humano en presencia del antagonista SB-366791 (N-(3-metoxifenil)-4-clorocinamida) (Neuberger *et al.*, 2023). SB-366791 se une al sitio de unión de la CAP, formando un enlace de hidrógeno el SB-366791 con el residuo Y511 y teniendo interacciones hidrófobas con los residuos L515 (segmento S3) y L547, T550 y L553 (segmento S4) datos respaldados con la electrofisiología y análisis mutagénico (Gunthorpe *et al.*, 2004; Neuberger *et al.*, 2023).

Se ha reportado por Morales-Lázaro *et al.*, (2016), que en células HEK293, el ácido oleico (OA) inhibe de las corrientes en canal TRPV1 a concentración de 5 μ M OA y estabiliza el estado cerrado, los investigadores han reportado un 85% de inhibición en presencia de 4 μ M CAP, 72% por calor, un 98% por protones, ácido lisofostaídico (LPA) en un 95%. Identificando los residuos T550, Y511 y S512 del bolsillo vaniloide como residuos importantes en la unión del OA con el canal TRPV1. La capsazepina (CZP) es un inhibidor competitivo del canal TRPV1 interactuando entre las cadenas laterales de los residuos R557 y E570 del bolsillo vaniloide promoviendo la estabilización del estado cerrado del canal (Bevan *et al.*, 1992; F. Yang *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016). También, se ha reportado que el colesterol inhibe las corrientes activadas por CAP, voltaje y temperatura del canal TRPV1 al unirse al sitio de unión al colesterol (CRAC) en los residuos 579 al 586 en el segmento S5 (Picazo-Juárez *et al.*, 2011).

Basado al análisis computacional (*docking*) obtenidos previamente, planteamos la hipótesis que el ZOL interactúa con el sitio de unión del PI(4,5)P₂ al presentar una menor energía de unión de -6.2 Kcal/mol. En nuestro estudio, el análisis mutagénico y de electrofisiología indican que los residuos R575 (**Figura 11, 12A, 13A**) y Q561(**Figura 14**) ubicado en el segmento S3 parecen no afectar la unión del ZOL al canal TRPV1. De esa misma manera, la triple mutante de los residuos R575-R579-K688 no fueron importante para la inhibición del canal TRPV1 por el ZOL (**Figura 15, 16A**). Estos hallazgos obtenidos mediante electrofisiología sugieren que el sitio unión del PI(4,5)P₂ no se encuentra involucrado en la interacción del ZOL con el canal TRPV1. El PI(4,5)P₂ es un agonista del canal TRPV1 haciendo interacción entre el segmento S3 y el enlazador S4-S5, el grupo fosfato interactúa

con los residuos R557 en el segmento S4 y los residuos R570, R575, R579 con el enlazador S4-S5 y el residuo K694 del dominio TRP (Poblete *et al.*, 2015)

En consideración de los resultados obtenidos del sitio de unión del PI(4,5)P₂ decidimos observar la contribución del sitio de unión de CAP (energía de unión -4.9 kcal/mol) con la triple mutante de los residuos T550-Y511-E570 a través de los registros electrofisiológicos de un solo canal. De acuerdo con los datos obtenidos, no se observa cambio en la corriente del canal TRPV1 en presencia de ZOL en concentraciones de 10, 100, 500 nM, lo que sugiere que estos residuos se encuentran participando activamente en la regulación del TRPV1 por el ZOL (**Figura 17A, 18A, 19A**). Estos experimentos demuestran que el ZOL es un inhibidor alostérico del canal TRPV1 ya que el sitio de unión de la CAP está a una distancia apreciable de las compuertas del canal.

Curiosamente los experimentos del lado extracelular del canal TRPV1 muestra un colapso de la conductancia de manera casi instantánea (**Figura 20**) y no recupera su actividad tras aplicar 1 μ M CAP. De igual manera, en estos experimentos observamos que, a pesar de estar colapsado la conductancia del canal, se da un aumento de la NPo. Es necesario mencionar que estos experimentos tienen sus limitaciones, lo ideal es realizar estos experimentos con la técnica de *patch-clamp* en configuración *outside-out* o usando la técnica de dos electrodos para tener un mayor control en nuestros experimentos. El mecanismo molecular del ZOL en canal TRPV1 es complejo. Existe la posibilidad que el ZOL pueda estar interactuando con varios sitios de unión del canal TRPV1 lo que conllevaría a la inhibición y cierre del canal. Además, la capacidad del ZOL de atravesar la membrana se encuentra limitada por su tamaño como a las dos cargas negativas que posee (Scala *et al.*, 2022). También, es necesario mencionar que datos recientes obtenidos mediante dinámica molecular sugieren que además de los sitios mencionados, el ZOL puede estar interactuando con las repeticiones de anquirina ubicadas en N-terminal.

7. Conclusión

Identificamos al ZOL como un nuevo inhibidor alostérico del canal TRPV1, sin embargo, el mecanismo molecular aún no se ha dilucidado. Nuestros hallazgos sugieren que los residuos T550, Y511, E570 del sitio de unión CAP se encuentra interactuando con el ZOL, sin embargo, es necesario seguir realizando experimentos mutagénicos del canal TRPV1 el sitio de unión de CAP como los experimentos del lado extracelular del canal. Por último, obtener la estructura del canal TRPV1 en presencia del ZOL mediante Cryo-EM ayudaría sustancialmente a dilucidar su mecanismo molecular.

8. Referencias

- A. Matta, J. and P. Ahern, G. (2010) 'TRPV1 and Synaptic Transmission', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(1), pp. 95–101. Available at: <https://doi.org/10.2174/138920111793937925>.
- Abed, E. *et al.* (2009) 'Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells', *Molecular Membrane Biology*, 26(3), pp. 146–158. Available at: <https://doi.org/10.1080/09687680802612721>.
- Agarwala, S., Sharoff, L. and Jagani, N. (2020) 'Effect of Zoledronic Acid and Alendronate on Bone Edema and Pain in Spontaneous Osteonecrosis of the Knee: A New Paradigm in the Medical Management', *Revista Brasileira de Ortopedia*, 55(5), pp. 543–550. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.RBOE.2017.12.008>.
- Akiba, Y. *et al.* (2004) 'Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet β cells modulates insulin secretion in rats', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(1), pp. 219–225. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.06.149>.
- Alvarez, O. *et al.* (2019) 'Methods for Investigating TRP Channel Gating', *Methods in Molecular Biology*, 1987, pp. 167–185. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9446-5_11.
- Amaya-Rodriguez, C.A. *et al.* (2023) 'A journey from molecule to physiology and in silico tools for drug discovery targeting the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channel', *Frontiers in Pharmacology*, 14, p. 1251061. Available at: <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2023.1251061/BIBTEX>.
- Anand, P. and Bley, K. (2011) 'Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch', *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 107(4), pp. 490–502. Available at: <https://doi.org/10.1093/BJA/AER260>.
- Bertin, S. *et al.* (2014) 'Novel immune function for the TRPV1 channel in T lymphocytes', *Channels*, 8(6), pp. 479–480. Available at: <https://doi.org/10.4161/19336950.2014.991640>.
- Bevan, S. *et al.* (1992) 'Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin', *British Journal of Pharmacology*, 107(2), pp. 544–552. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.1992.TB12781.X>.
- Bjurholm, A. *et al.* (1988) 'Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone', *Peptides*, 9(1), pp. 165–171. Available at: [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(88\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0196-9781(88)90023-X).
- Brazill, J.M. *et al.* (2019) 'Nerves in Bone: Evolving Concepts in Pain and Anabolism', *Journal of Bone and Mineral Research*. John Wiley and Sons Inc, pp. 1393–1406. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3822>.
- Cao, E., Cordero-Morales, J.F., *et al.* (2013) 'TRPV1 Channels Are Intrinsically Heat Sensitive and Negatively Regulated by Phosphoinositide Lipids', *Neuron*, 77(4), pp. 667–679. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.12.016>.

- Cao, E., Liao, M., *et al.* (2013) 'TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms', *Nature*, 504(7478), pp. 113–118. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature12823>.
- Castillo, K. *et al.* (2018) 'Thermally activated TRP channels: Molecular sensors for temperature detection', *Physical Biology*. Institute of Physics Publishing. Available at: <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aa9a6f>.
- Caterina, M.J. *et al.* (1997) 'The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway', *Nature*, 389(6653), pp. 816–824. Available at: <https://doi.org/10.1038/39807>.
- Caterina, M.J. (2008) 'On the thermoregulatory perils of TRPV1 antagonism', *Pain*, 136(1–2), pp. 3–4. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.PAIN.2008.02.033>.
- Caterina, M.J. and Julius, D. (2000) *THE VANILLOID RECEPTOR: A Molecular Gateway to the Pain Pathway*. Available at: www.annualreviews.org.
- Chávez, A.E., Chiu, C.Q. and Castillo, P.E. (2010) 'TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus', *Nature Neuroscience* 2010 13:12, 13(12), pp. 1511–1518. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.2684>.
- Cheer, S.M. and Noble, S. (2001) 'Zoledronic acid', *Drugs*, 61(6), pp. 799–805. Available at: <https://doi.org/10.2165/00003495-200161060-00010/METRICS>.
- Contassot, E. *et al.* (2004) 'Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1', *Gynecologic Oncology*, 93(1), pp. 182–188. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2003.12.040>.
- Cortright, D.N. *et al.* (2001) 'The Tissue Distribution and Functional Characterization of Human VR1', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(5), pp. 1183–1189. Available at: <https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.4482>.
- Daniluk, J. and Voets, T. (2023) 'pH-dependent modulation of TRPV1 by modality-selective antagonists', *British Journal of Pharmacology*, 180(21), pp. 2750–2761. Available at: <https://doi.org/10.1111/BPH.16173>.
- Drake, M. T., Clarke, B. L., & Khosla, S. (2008, September). 'Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice', In *Mayo clinic proceedings* (Vol. 83, No. 9, pp. 1032-1045). Elsevier. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00095-1>
- Faussone-Pellegrini, M.S. *et al.* (2005) 'Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the human stomach', *Histochemistry and Cell Biology*, 124(1), pp. 61–68. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00418-005-0025-9/FIGURES/5>.
- Feng, Q. (2014) 'Temperature Sensing by Thermal TRP Channels: Thermodynamic Basis and Molecular Insights', *Current Topics in Membranes*, 74(1), pp. 19–50. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800181-3.00002-6>.
- Ferrandiz-Huertas, C. *et al.* (2014) 'Trafficking of Thermo TRP channels', *Membranes*. MDPI AG, pp. 525–564. Available at: <https://doi.org/10.3390/membranes4030525>.
- Gao, Y. *et al.* (2016) 'TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action', *Nature* 2016 534:7607, 534(7607), pp. 347–351. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature17964>.
- Gees, M. *et al.* (2012) 'TRP channels', *Comprehensive Physiology*, pp. 563–608. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c110026>.

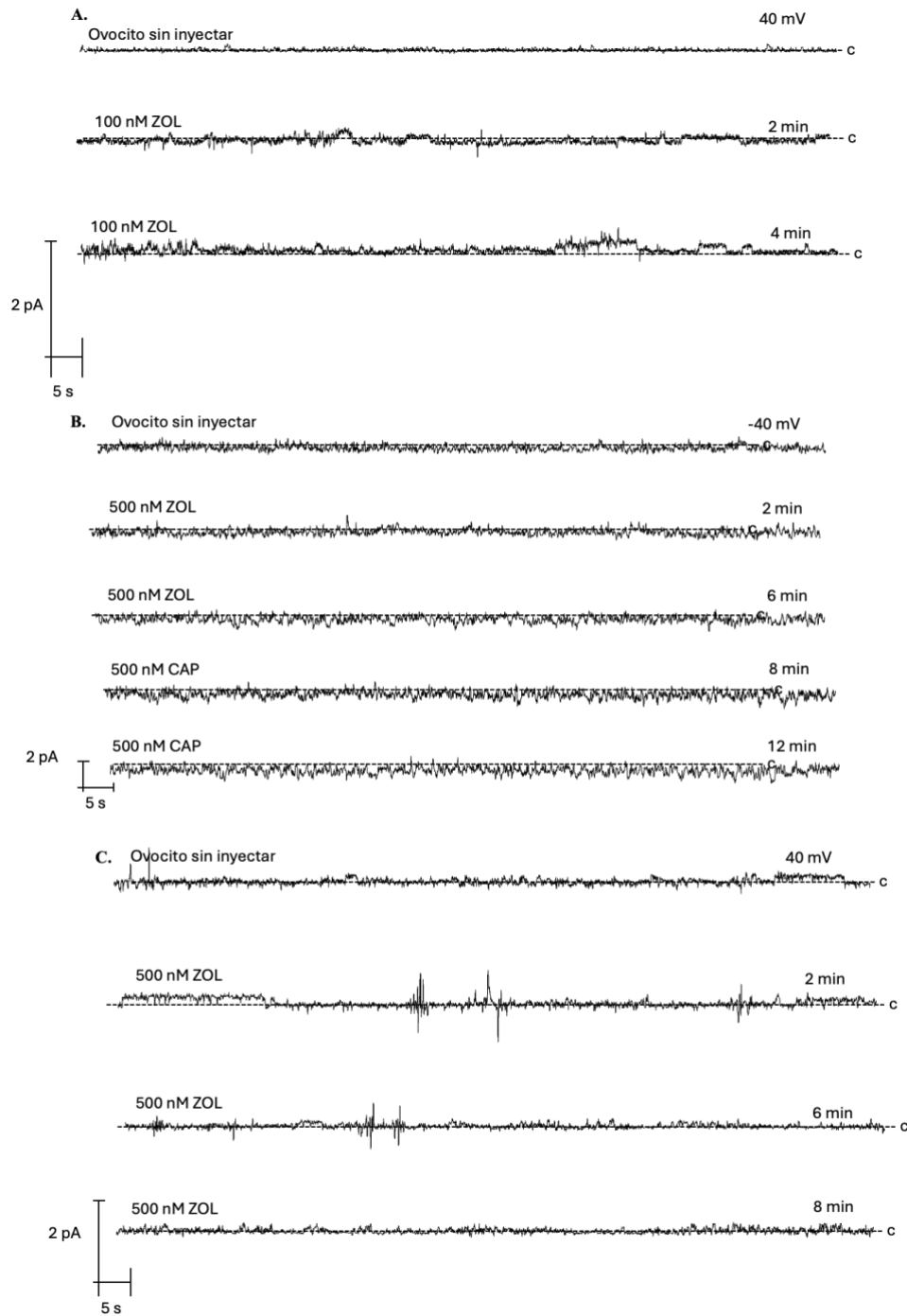
- Golech, S.A. *et al.* (2004) 'Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors', *Brain research. Molecular brain research*, 132(1), pp. 87–92. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MOLBRAINRES.2004.08.025>.
- Gunthorpe, M.J. *et al.* (2004) 'Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist', *Neuropharmacology*, 46(1), pp. 133–149. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00305-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00305-8).
- Hayman, M., & Kam, P. C. (2008). 'Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications', *Current Anaesthesia & Critical Care*, 19(5-6), 338-343. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.07.003>
- Himmel, N.J., Gray, T.R. and Cox, D.N. (2021) 'Corrigendum to: Phylogenetics Identifies Two Eumetazoan TRPM Clades and an Eighth TRP Family, TRP Soromelastatin (TRPS)', *Molecular Biology and Evolution*, 38(1), pp. 329–329. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa254>.
- Hwang, S.J. and Valtschanoff, J.G. (2003) 'Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord', *Neuroscience Letters*, 349(1), pp. 41–44. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00750-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00750-X).
- Ibrahim, A., Scher, N., Williams, G., Sridhara, R., Li, N., Chen, G., ... & Pazdur, R. (2003). 'Approval summary for zoledronic acid for treatment of multiple myeloma and cancer bone metastases', *Clinical Cancer Research*, 9(7), pp. 2394-2399.
- Ito, E., Ikemoto, Y. and Yoshioka, T. (2015) 'Thermodynamic implications of high Q10 of thermoTRP channels in living cells', *BIOPHYSICS*, 11(0), pp. 33–38. Available at: <https://doi.org/10.2142/BIOPHYSICS.11.33>.
- Johansen, M.E., Reilly, C.A. and Yost, G.S. (2006) 'TRPV1 Antagonists Elevate Cell Surface Populations of Receptor Protein and Exacerbate TRPV1-Mediated Toxicities in Human Lung Epithelial Cells', *Toxicological Sciences*, 89(1), pp. 278–286. Available at: <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFI292>.
- Julius, D. (2013). 'TRP channels and pain', *Annual review of cell and developmental biology*, 29, 355-384. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155833>
- Kanaya, K. *et al.* (2016) *TRPV1, ASICs and P2X2/3 expressed in bone cells simultaneously regulate bone metabolic markers in ovariectomized mice*, *J Musculoskelet Neuronal Interact*. Available at: <http://www.ismni.org>.
- Kark, T. *et al.* (2008) 'Tissue-Specific Regulation of Microvascular Diameter: Opposite Functional Roles of Neuronal and Smooth Muscle Located Vanilloid Receptor-1', *Molecular Pharmacology*, 73(5), pp. 1405–1412. Available at: <https://doi.org/10.1124/MOL.107.043323>.
- Kohno, N., *et al.* (2005) 'Zoledronic acid significantly reduces skeletal complications compared with placebo in Japanese women with bone metastases from breast cancer: A randomized, placebo-controlled trial', *Journal of Clinical Oncology*, 23(15), pp. 3314–3321. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.116>.
- Laslett, L.L. *et al.* (2012) 'Zoledronic acid reduces knee pain and bone marrow lesions over 1 year: a randomised controlled trial', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(8), pp. 1322–1328. Available at: <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2011-200970>.
- Latorre, R. *et al.* (2007) 'ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating', *Cell Calcium*, 42(4–5), pp. 427–438. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.04.004>.

- Latorre, R. and Díaz-Franulic, I. (2022) 'Profile of David Julius and Ardem Patapoutian: 2021 Nobel Laureates in Physiology or Medicine', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(1). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.2121015119>.
- Li, L. *et al.* (2012) 'TRPV1 activation prevents nonalcoholic fatty liver through UCP2 upregulation in mice', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 463(5), pp. 727–732. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00424-012-1078-Y/TABLES/1>.
- Liao, M. *et al.* (2013) 'Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy', *Nature*, 504(7478), pp. 107–112. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE12822>.
- Luo, L. *et al.* (2019) 'Molecular basis for heat desensitization of TRPV1 ion channels', *Nature Communications*, 10(1), p. 2134. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09965-6>.
- Ma, Y.G. *et al.* (2012) 'Activation of BKCa Channels in Zoledronic Acid-Induced Apoptosis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells', *PLOS ONE*, 7(5), p. e37451. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037451>.
- Maqoud, F. *et al.* (2021) 'Zoledronic acid as a novel dual blocker of KIR6.1/2-SUR2 subunits of ATP-sensitive K⁺ channels: Role in the adverse drug reactions', *Pharmaceutics*, 13(9), p. 1350. Available at: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13091350/S1>.
- Matsumoto, K. *et al.* (2009) 'Localization of TRPV1 and contractile effect of capsaicin in mouse large intestine: High abundance and sensitivity in rectum and distal colon', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(2), pp. 348–360. Available at: <https://doi.org/10.1152/AJPGI.90578.2008/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30080954430008.JPG>.
- Meza, R.C. *et al.* (2022) 'Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Function at Central Synapses in Health and Disease', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, p. 864828. Available at: <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2022.864828/BIBTEX>.
- Mezey, É. *et al.* (2000) 'Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), pp. 3655–3660. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.7.3655/ASSET/67EAE30E-F9CC-4C23-A055-532F4C308665/ASSETS/GRAPHIC/PQ0504961006.JPEG>.
- Montell, C. (2005) 'The TRP Superfamily of Cation Channels', *Science's STKE*, 2005(272). Available at: <https://doi.org/10.1126/STKE.2722005RE3>.
- Morales-Lázaro, S.L., L.I., S.-R.F., L.-R.A.E., O.-R.M., S.-F.B., . . . & R.T. (2016) 'Inhibition of TRPV1 channels by a naturally occurring omega-9 fatty acid reduces pain and itch', *Nature Communications*, 7(1), p. 13092. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms13092>.
- Morales-Lázaro, S.L. and Rosenbaum, T. (2015) 'A painful link between the TRPV1 channel and lysophosphatidic acid', *Life sciences*, 125, pp. 15–24. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2014.10.004>.
- Morgan, M. *et al.* (2019) 'TRPV1 activation alters the function of A δ and C fiber sensory neurons that innervate bone', *Bone*, 123, pp. 168–175. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2019.03.040>.
- Nagae, M. *et al.* (2006) 'Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone', *Bone*, 39(5), pp. 1107–1115. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.033>.

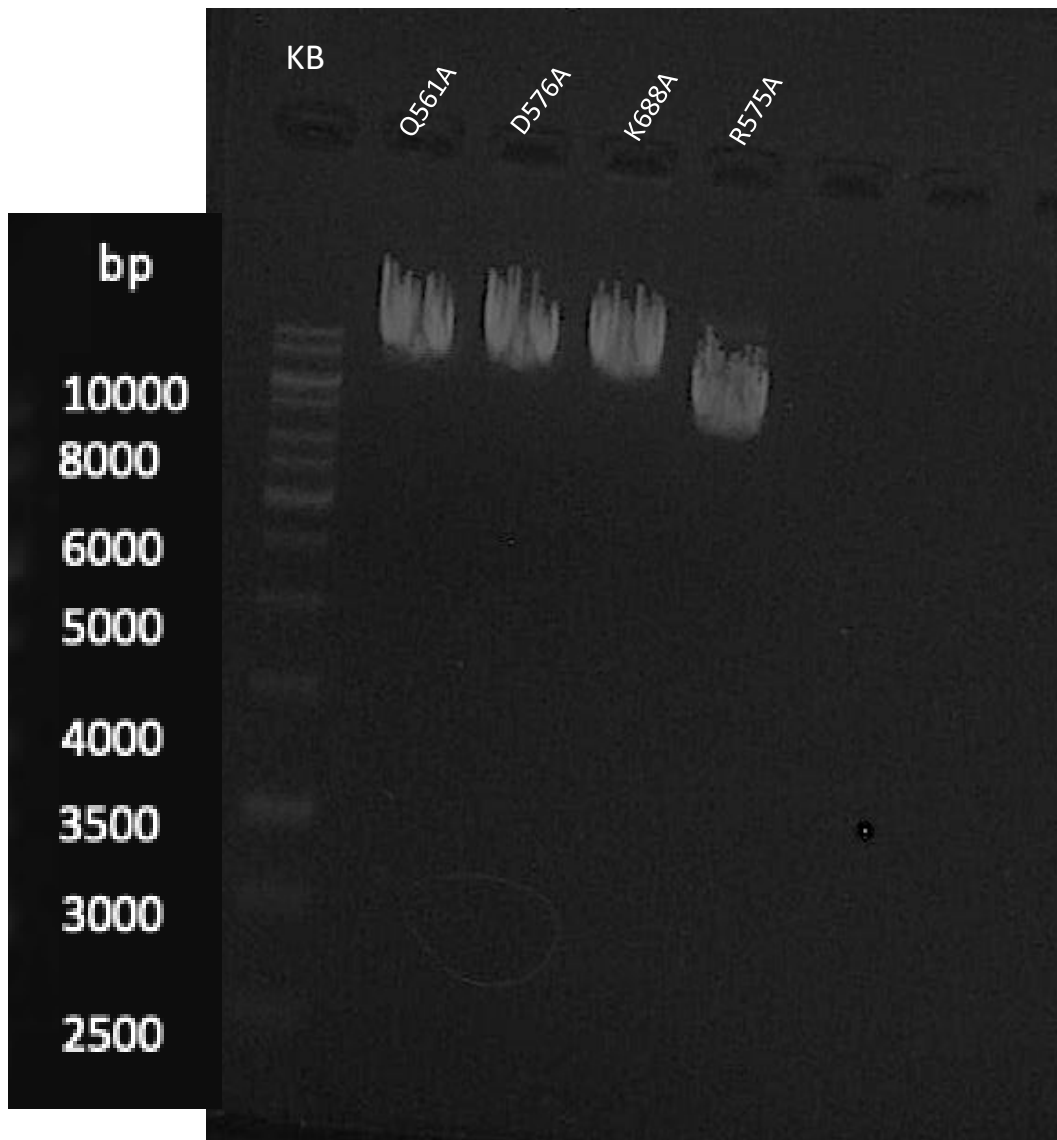
- Nagae, M., Hiraga, T. and Yoneda, T. (2007) 'Acidic microenvironment created by osteoclasts causes bone pain associated with tumor colonization', *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 25(2), pp. 99–104. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00774-006-0734-8>.
- Neuberger, A. *et al.* (2023) 'Human TRPV1 structure and inhibition by the analgesic SB-366791', *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38162-9>.
- Picazo-Juárez, G. *et al.* (2011) 'Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel', *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), pp. 24966–24976. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237537>.
- Poblete, H. *et al.* (2015) 'Molecular determinants of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) binding to transient receptor potential V1 (TRPV1) channels', *Journal of Biological Chemistry*, 290(4), pp. 2086–2098. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.613620>.
- Ramírez-Barrantes, R. *et al.* (2020) 'TRPV1-Estradiol Stereospecific Relationship Underlies Cell Survival in Oxidative Cell Death', *Frontiers in Physiology*, 11, p. 522302. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00444/BIBTEX>.
- Ripamonti, C. *et al.* (2007) 'Decreases in pain at rest and movement-related pain during zoledronic acid treatment in patients with bone metastases due to breast or prostate cancer: A pilot study', *Supportive Care in Cancer*, 15(10), pp. 1177–1184. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00520-007-0230-2/TABLES/3>.
- Rosenbaum, T. and Islas, L.D. (2023) 'Molecular Physiology of TRPV Channels: Controversies and Future Challenges', *Annual Review of Physiology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030222>.
- Sanz-Salvador, L. *et al.* (2012) 'Agonist- and Ca²⁺-dependent desensitization of TRPV1 channel targets the receptor to lysosomes for degradation', *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), pp. 19462–19471. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289751>.
- Scala, R., *et al.* (2022) 'Bisphosphonates Targeting Ion Channels and Musculoskeletal Effects', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.837534>.
- Shuba, Y.M. (2021) 'Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions', *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.612480>.
- Song, K. *et al.* (2016) 'The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia', *Science*, 353(6306), pp. 1393–1398. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaf7537>.
- Stein, R.J. *et al.* (2004) 'COOL (TRPM8) AND HOT (TRPV1) RECEPTORS IN THE BLADDER AND MALE GENITAL TRACT', *The Journal of Urology*, 172(3), pp. 1175–1178. Available at: <https://doi.org/10.1097/O1.JU.0000134880.55119.CF>.
- Steverink, J.G. *et al.* (2021) 'Sensory Innervation of Human Bone: An Immunohistochemical Study to Further Understand Bone Pain', *Journal of Pain*, 22(11), pp. 1385–1395. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2021.04.006>.
- Szallasi, A. *et al.* (2007) 'The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept', *Nature Reviews Drug Discovery* 2007 6:5, 6(5), pp. 357–372. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd2280>.

- Tian, Q. *et al.* (2019) 'Recovery from tachyphylaxis of TRPV1 coincides with recycling to the surface membrane', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(11), pp. 5170–5175. Available at: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1819635116> (Accessed: 14 May 2023).
- Touska, F. *et al.* (2011) 'A "cute" desensitization of TRPV1', *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(1), pp. 122–129. Available at: <https://doi.org/10.2174/1389201111793937826>.
- Tzschentke, T.M. (2021) 'Pharmacology of bisphosphonates in pain', *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc, pp. 1973–1994. Available at: <https://doi.org/10.1111/bph.14799>.
- Wang, G. *et al.* (2018) 'Effects of zoledronic acid and ibandronate in the treatment of cancer pain in rats with lung cancer combined with bone metastases', *Oncology Letters*, 16(2), pp. 1696–1700. Available at: <https://doi.org/10.3892/OL.2018.8804/HTML>.
- Yang, F. *et al.* (2015) 'Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel', *Nature Chemical Biology* 2015 11:7, 11(7), pp. 518–524. Available at: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1835>.
- Yang, S. *et al.* (2015) 'A pain-inducing centipede toxin targets the heat activation machinery of nociceptor TRPV1', *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms9297>.
- Zhang, K., Julius, D. and Cheng, Y. (2021) 'Structural snapshots of TRPV1 reveal mechanism of polymodal functionality', *Cell*, 184(20), pp. 5138–5150.e12. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.08.012>.

9. Anexos



Anexo 1. Registro controles de ovocitos sin inyectar ARN del canal TRPV1. A. Registro representativo a un pulso de 40 mV y perfundido con 100 nM ZOL. B. Registro representativo a un pulso de 40 mV y perfundido con 500 nM ZOL. C. Registro representativo a un pulso de -40 mV, perfundido con 100 nM ZOL Y 500 nM de CAP.



Anexo 2. Electroforesis en gel para las mutaciones Q561, D576A, K688, R579 del canal TRPV1 después de la digestión con la enzima de restricción utilizada para linealizar el ADN. Una escalera de ADN de 1 kb para comprobar el tamaño molecular esperado del ADN no linealizado frente al linealizado.

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA
CÓDIGO CBC 88-2023

El Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso (CBC-UV), con fecha 15 de noviembre de 2023 declara haber evaluado el siguiente protocolo experimental:

INVESTIGADOR RESPONSABLE: César Amaya Rodríguez.

TÍTULO DEL PROYECTO: La unión del ácido zoledrónico con el bolsillo del PI(4,5)P2 inhibe la actividad de los canales TRPV1.

El comité revisó los antecedentes presentados en el FORMULARIO DE SOLICITUD DE APROBACIÓN PARA INVESTIGACIÓN EN ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN valorando criterios bioéticos y de cuidado animal. En esta evaluación se consideró procedentes los aspectos indicados en el formulario y estima que no hay objeciones para el uso de animales propuesto en este proyecto. Por lo anterior, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso **aprueba** este protocolo experimental con las siguientes condiciones:

Vigencia de la aprobación: desde el 15/11/2023 al 15/03/2024.

Cepa o especie animal: *Xenopus laevis*

Número total de animales: 9 ranas

Personas autorizadas en el protocolo: Nieves Navarro y Victoria Prado (para el trabajo con ranas); César Amaya Rodríguez (sólo para el trabajo con huevos de rana).

El Investigador Responsable debe asegurar que todas las personas involucradas en el protocolo e individualizadas en esta acta se hayan capacitado en la realización de los procedimientos indicados en éste. Si requiere cambiar cualquier aspecto de este estudio, como objetivos, personal, patrocinadores, procedimientos y número de animales entre otros, deberá enviar una SOLICITUD DE ENMIENDA al correo bioética.ciencias@uv.cl. Estos cambios no se deben iniciar hasta que el CBC-UV haya aprobado la enmienda.

Una vez terminado el proyecto de investigación, se solicita informar al CBC-UV para proceder al cierre del protocolo. Cabe señalar, que es deber del Investigador Responsable, mantener actualizados los registros de procedimientos realizados con animales. Estos serán revisados por el CBC-UV en las actividades de seguimiento del protocolo aprobado. El no cumplimiento de este protocolo puede significar la revocación de esta aprobación bioética e información al Decano/a.

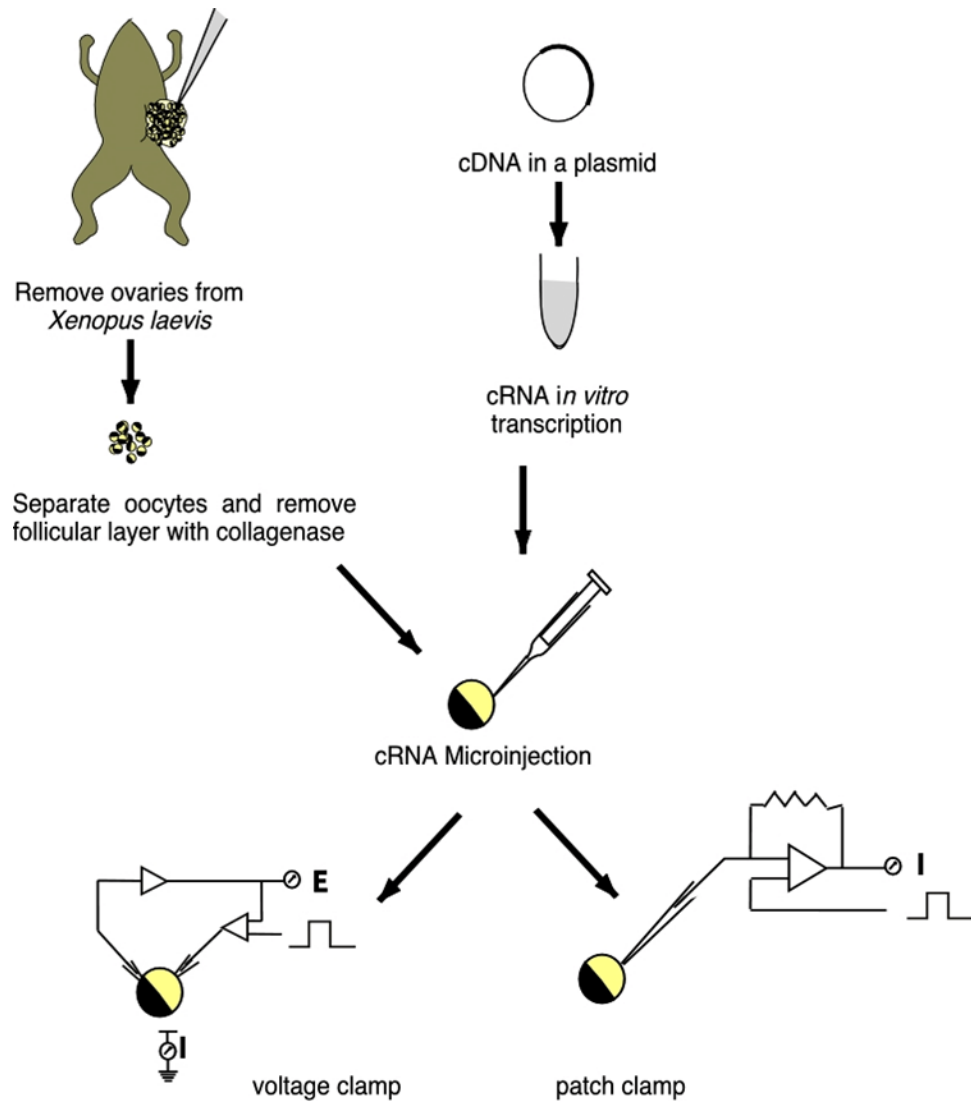


Gabriela Muñoz Cerda
Presidenta

Comité de Bioética, Facultad de Ciencias,
Universidad de Valparaíso

Gran Bretaña 1111 • Playa Ancha • Valparaíso
bioetica.ciencias@uv.cl

Anexo 3. Aval de evaluación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.



Anexo 4. Metodología experimental: i). extracción del lóbulo; ii). tratamiento de los ovocitos; iii). Biología molecular; iv). Microinyección del RNA; v). registros electrofisiológicos mediante la técnica del *patch-clamp*.