



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN  
NUCLEAR INUSUAL DEL CANAL  
IÓNICO TRPV4 EN CÉLULAS DE  
EPITELIO RENAL**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

PRESENTA

**JOSÉ ARTURO MATAMOROS VOLANTE**

**DRA. MA. DEL REFUGIO GARCÍA VILLEGAS**  
ASESORA





Universidad Nacional  
Autónoma de México

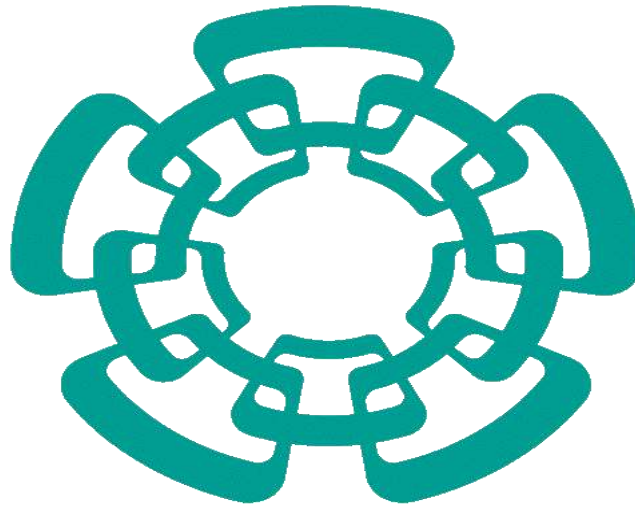


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**Cinvestav**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

**EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL DE LA PRESENTE  
TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 38 DEL DEPARTAMENTO DE  
FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS DEL CINVESTAV, BAJO LA  
DIRECCIÓN DE LA DRA. MA. DEL REFUGIO GARCÍA VILLEGAS. ASÍ  
MISMO CON LAS REVISIONES DE:**

**DR. ELÍAS PIEDRA IBARRA**

**M. EN C. TERESA ORTIZ MELO**

**DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA**

**DR. ALONSO VILCHES FLORES**



**ALGUNOS DE LOS RESULTADOS DEL TRABAJO  
EXPERIMENTAL DE LA PRESENTE TESIS FUERON  
PRESENTADOS EN EL XXX CONGRESO  
NACIONAL DE BIOQUÍMICA, CELEBRADO DEL  
2 AL 8 DE NOVIEMBRE DE 2014 EN LA CIUDAD  
DE GUADALAJARA, JAL.**



# Unusual localization of TRPV4 ionic channel in renal epithelial Cells (MDCK)

José Arturo Matamoros-Volante, Jacqueline Martínez-Rendón and María del Refugio García-Villegas\*

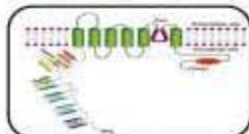
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México. \*Corresponding Author: García-Villegas M.R. (Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, C.P. 07360, México, D.F.; Tel. 57-47-38-00 ext. 5101; [rgarcia@fisiologia.cinvestav.mx](mailto:rgarcia@fisiologia.cinvestav.mx))

## INTRODUCTION

The Transient Receptor Potential Vanilloid 4 channel (TRPV4), is a multimodal activated  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  permeable cation channel involved in broad range of cellular functions such as osmoregulation, mechanosensitivity and nociception, among others. Several mutations on TRPV4 gene are related with several diseases including skeletal dysplasia, and moto-sensory neuropathies.

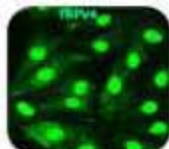
As an ionic channel, the expected subcellular localization of TRPV4 is in the plasma membrane. However, we have seen TRPV4 expression in the nuclei of cultured canine kidney epithelial cells (MDCK) when the cells are grown in sub-confluence conditions, whilst in confluence conditions, TRPV4 was observed in the cytoplasm and cilia. So far, there are no reports about the nuclear localization of TRPV4 in epithelial cells, nevertheless recent evidence has demonstrated the nuclear localization of some membrane proteins structurally related to TRPV4. Examples of this kind of proteins include certain ion channels like Cav1.2, OCR2, BK, and others (Gómez-Ospina, et al. 2006, Esak & Ferkey, 2011), Li, et al., 2014; membrane receptors like different GPCR. Despite TRPV4 is usually expressed in plasma membrane, it may be found in the nucleus, and likely accomplishing some physiological functions like proliferation and/or differentiation.

### TRPV4 STRUCTURE

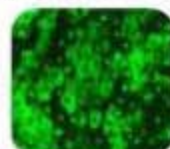


Asa-Gonzalez et al., 2016. *Nature Genetics* 47:393

### IMMUNODETECTION OF TRPV4 IN MDCK CELLS



Sub-confluence conditions



Confluence conditions

## OBJECTIVES

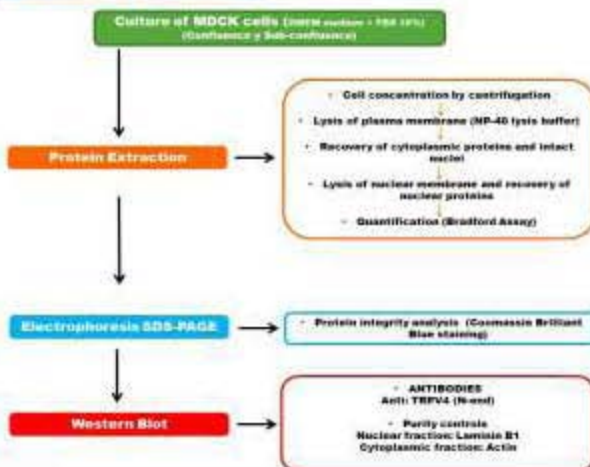
### General

- Analyze this unusual nuclear localization of TRPV4 in MDCK cells

### Particular

- Realize protein extractions of nuclear and cytoplasmic fractions of MDCK cells grown in confluence and sub-confluence conditions.
- Evaluate the expression of TRPV4 in both extracts above mentioned through Western Blot assays.

## MATERIALS & METHODS



## RESULTS AND DISCUSSION

### NUCLEAR AND CYTOPLASMIC PROTEIC FRACTIONS INTEGRITY

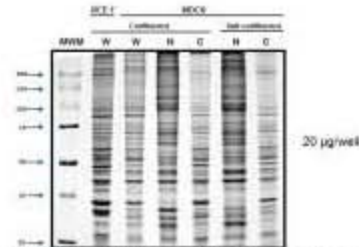


Fig. 1. Protein integrity of nuclear and cytoplasmic fractions (MDCK confluence and sub-confluence conditions, RCE-1 Renal Carcinoma Epithelial Cells (Reference protein) extracts) MDCK: Madin-Darby Canine Kidney Cells, W: Whole cell extract, N: nuclear extract, C: Cytoplasmic extract. (Each well was loaded with the volume corresponding to 20µg. Staining with Coomassie Brilliant Blue indicates that the same amount of protein were loaded).

### TRPV4 SUBCELLULAR LOCALIZATION IN MDCK CELLS

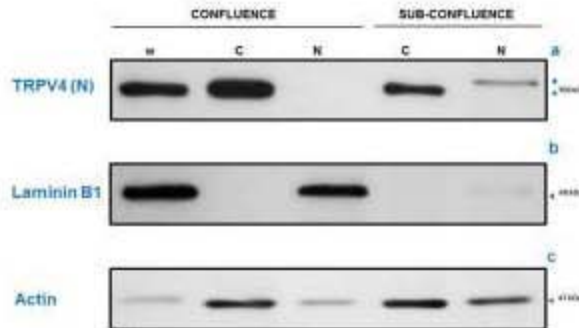


Fig. 2. Western Blot analysis of TRPV4 expression in subcellular fractions of MDCK cells in confluence and sub-confluence conditions. a. Signal from staining with specific antibody against TRPV4. b. Purify control of nuclear fraction using antibody against Laminin B1. c. Purify control of cytoplasmic fraction using antibody against Actin. (30 µg of protein/well)

We identified TRPV4 expression in the total protein and cytoplasmic protein extracts from both conditions whilst in the nuclear extracts TRPV4 was only present in sub confluence conditions. Furthermore, we found that the TRPV4 expressed in the nuclei of sub confluent cells did not correspond to the expected molecular weight of 100kDa but to a higher one suggesting a potential posttranslational modification.

These results demonstrate the unusual nuclear localization of TRPV4, a completely novel characteristic for this well-studied protein. Additional work is necessary to determinate the possible biological function of nuclear TRPV4 channel in MDCK cells.

## CONCLUSIONS

- MDCK cells grown in sub-confluence conditions express TRPV4 ion channel in the nucleus.
- The TRPV4 ion channel expression found in MDCK cells under both growing conditions corresponds to the complete form (98 kDa), presumably discarding proteolytic cleavage. Nevertheless, the TRPV4 expression found in nuclei of sub-confluent cells corresponds to a higher molecular weight than expected 98 kDa, likely by the presence of any type of posttranslational modification.

## REFERENCES

Asa-Gonzalez et al., 2016. *Nature Genetics* 47:393  
 Ben-Sabi-Hewajig, et al., 2015. *PLoS ONE* 10(2): e0127165  
 Esak y Ferkey, 2011. *PLoS ONE* 6(9): e25047.  
 Gómez-Ospina, et al., 2006. *Cell* 127:381-806  
 Li, et al., 2014. *Nature Neuroscience* 17(5):709-13  
 Park, et al., 2015. *PLoS ONE* 10(2): e0127163

## **Agradecimientos:**

A mi madre **Herlinda Volante** por su infinito e incondicional amor, porque sin todo lo que has hecho por mí desde el momento que supiste que me ibas a tener, sin cada uno de tus besos o de tus regaños, no sería la persona que soy ahora. Por supuesto a mi padre **Arturo Matamoros** porque siempre me has apoyado hasta en mis decisiones más absurdas. Porque gracias a ti descubrí que tener curiosidad ante la vida te abre las puertas al conocimiento, y por esa razón estamos aquí. Y a mi hermana **Karla**, a pesar de lo gorda que me caes, sabes que daría la vida por ti. Los amo.

A mi novia **Ashlin Lara** por todo el apoyo y el amor que me has dado. Sin ti nada de esto hubiese ocurrido. Gracias por cada día a tu lado, por ser mi inspiración, y por motivarme a ser mejor cada día. Te amo.

Por su puesto, a la **Dra. Refugio García Villegas**, por abrirme las puertas de su laboratorio, por confiar en mí, por las oportunidades que me brindó, por ser una excelente tutora, y por permitirme aprender de primera mano de una gran científica como lo es usted.

A la **M. en C. Penélope Hernández Magaña** por su invaluable ayuda en la realización de muchas de las técnicas empleadas. Así mismo a los miembros del laboratorio 38 del depto. de Fisiología del CINVESTAV: **Ivette, Jacquie, Gaby E, Gaby T.** Por su apoyo, y por los buenos momentos que me regalaron en el lab.

A mis tíos **Paty** y **Pepe** así como a mis primos **Ricardo** y **Carlos**, porque a pesar del bullying que llegaron a hacerme por estudiar biología y no administración como ellos, nunca han dejado de apoyarme. Muchísimas gracias.

Al **Dr. Elías Piedra** porque la forma y la pasión con la que cada día vive la biología nunca deja de sorprenderme. Porque además de ser mi profesor, se convertido también en un maestro de la vida misma. Sus enseñanzas siguen siendo muy significativas en las nuevas etapas de mi vida académica.

Así mismo les agradezco a mis sinodales, **M. C. Tere Ortiz, Dr. Alonso Vilches,** y el **Dr. Ricardo Mejía** por el tiempo invertido y por sus valiosas observaciones que hicieron para mejorar esta tesis.

A mis buenos amigos **Chino,** algún día quiero ser tan bueno como él, **Ivonne,** porque a pesar de mis múltiples abandonos siempre has estado ahí para mí. A **Paty y Andy** por ser unas inesperadas e increíbles amigas. A todos ustedes buenos biólogos **César, Luis I., Elena, Sara, Yess, Richi, Luis M.,** y todos los que me hicieron pasar por los mil y un momentos de diversión y biología. Porque a pesar de todo siempre han estado ahí para apoyarme.

# INDICIE

RESÚMEN .....	12
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	14
1.1. Canales Iónicos.....	14
1.2. Familia de canales iónicos TRP .....	14
1.3. Subfamilia TRPV.....	17
1.4. TRPV4 .....	17
1.4.1. Características básicas del gen y la proteína TRPV4.....	20
1.4.2. Propiedades Biofísicas.....	22
1.4.3. Mecanismos de activación y regulación.....	22
1.4.4. Patrón de expresión y funciones del canal TRPV4 .....	22
1.4.5. Enfermedades relacionadas a mutaciones o mal funcionamiento de TRPV4 .....	23
1.4.6. Regulación de la localización celular de TRPV4 .....	23
1.5. Localización nuclear del canal iónico TRPV4 .....	24
1.6. Canales TRP que presentan una localización nuclear .....	25
1.7. Otros canales iónicos que presentan una localización nuclear.....	26
1.8. Antecedentes de TRPV4 en células MDCK .....	26
2. JUSTIFICACIÓN .....	28
3. HIPÓTESIS.....	28
4. OBJETIVOS.....	28
4.1. Objetivo General .....	28
4.2. Objetivos Particulares .....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Cultivo celular .....	29
5.2. Anticuerpos.....	29
5.3. Inmunolocalización del canal TRPV4 .....	31
5.4. Extracción de Proteínas.....	31
5.4.1. Extracción de proteínas totales .....	31
5.4.2. Extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares .....	32
5.5. Determinación de la concentración de proteína .....	32



5.6.	Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes (Acrilamida-SDS).....	32
5.7.	Integridad de proteínas .....	33
5.8.	Western Blot .....	33
5.9.	Remoción de anticuerpos y reutilización de las membranas de PVDF .....	34
5.10.	Análisis Estadísticos.....	34
6.	RESULTADOS .....	34
6.1.	Cultivo de células MDCK: condiciones de alta y baja densidad celular.....	34
6.2.	Análisis de la expresión del canal TRPV4 .....	36
6.2.1.	Inmunolocalización del canal TRPV4 .....	36
6.2.2.	Expresión del canal TRPV4 .....	38
6.3.	Extracción y análisis de proteínas nucleares .....	40
6.4.	Expresión nuclear del canal TRPV4 .....	42
7.	DISCUSIÓN .....	43
8.	CONCLUSIONES .....	50
9.	REFERENCIAS.....	51
10.	ANEXOS .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Características estructurales y filogenéticas de los canales TRP .....	16
<b>Figura 2.</b> Topología del canal TRPV4 .....	21
<b>Figura 3.</b> Expresión del canal TRPV4 en células MDCK.....	27
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica de las regiones reconocidas por ambos anticuerpos para detectar al canal TRPV4.....	30
<b>Figura 5.</b> Apariencia del cultivo de células MDCK en ambas condiciones de densidad (baja y alta).....	35
<b>Figura 6.</b> Inmunolocalización del canal TRPV4.....	37
<b>Figura 7.</b> Expresión de TRPV4 en células MDCK y RCE-1 (lisados totales de células confluentes).....	38
<b>Figura 8.</b> Modelos de regresión lineal para el cálculo del peso molecular .....	39
<b>Figura 9.</b> Aislamiento de núcleos .....	40
<b>Figura 10.</b> Tinción con azul de Coomassie en fracciones proteicas derivadas de células MDCK.....	41
<b>Figura 11.</b> Expresión de TRPV4 en células MDCK a baja y a alta densidad .....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características e información destacada de los canales TRPV .....	19
<b>Tabla 2.</b> Características de los anticuerpos utilizados para detectar al canal TRPV4.....	30
<b>Tabla 3.</b> Pesos moleculares calculados de las bandas obtenida mediante los ensayos de Western Blot.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**: Concentración intracitoplasmática de calcio

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>nu</sub>**: Concentración nuclear de calcio

**aa**: Aminoácido(s)

**ANK**: Repetidos de Ankirina

**BK**: Canal de Potasio de Alta Conductancia (del inglés *Big Conductance Potassium Channel*)

**Cav2.1**: Canal de calcio activado por voltaje 2.1.

**DMEM**: Dulbecco's Modified Eagle Medium

**e. g.**: "Por ejemplo" (del latín *Exempli gratia*)

**HRP**: Enzima peroxidasa de rábano (del inglés *Horseradish Peroxidase*)

**I. e.**: "Es decir" o "esto es" (del latín *Id est*)

**IF**: Inmunofluorescencia

**Ins<sub>3</sub>R**: Receptor de inositol trifostato

**MDCK**: Células de Epitelio Renal Canino (del inglés *Madin-Darby Canin Kidney cells*)

**PBS**: Tampón Fosfato Salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

**PRD**: Dominio Rico en Prolinas (del inglés *Proline Rich Domain*)

**RCE-1**: Células de Epitelio Corneal de Conejo (del inglés *Rabbit Corneal Epithelial Cells-1*)

**RE**: Retículo endoplásmico

**RT-PCR**: Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada con Transcriptasa reversa (del inglés *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

**RyR**: Receptor de Rianodina

**SDS-PAGE**: Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

**TBS**: Tampón Tris Salino (del inglés *Tris Buffered Saline*)

**TRP**: Familia de canales iónicos "Receptor de Potencial Transitorio" (del inglés *Transient Receptor Potential*)

**TRPM7**: Receptor de Potencial Transitorio, subfamilia Melastatina, miembro 7 (del inglés *Transient Receptor Potential Melastatin 7*)

**TRPV4**: Receptor de Potencial Transitorio, subfamilia Vaniloide, miembro 4 (del inglés *Transient Receptor Potential Vanilloid 4*)

**WB**: Western Blot

## RESÚMEN

El Receptor de Potencial Transitorio TRPV4 (del inglés *Transient Receptor Potential Vanilloid 4*) es un canal iónico de activación polimodal permeable a cationes mono y divalentes, cuyas funciones principales incluyen la capacidad de percibir y responder a estímulos provenientes del exterior celular (e. g. temperatura, presión osmótica), razón por la cual, la localización del canal en la membrana plasmática, es vital para sus funciones. En el presente trabajo se estudió la posible localización nuclear del canal TRPV4 en células de epitelio renal canino (MDCK) crecidas en dos condiciones diferentes de cultivo: alta y baja densidad celular. Mediante Inmunofluorescencia, inicialmente se confirmaron resultados previos del laboratorio encontrando que dichas células expresan endógenamente al canal TRPV4, y que cuando están a baja densidad éste se localiza principalmente en el núcleo, mientras que en la mayoría de las células crecidas a alta densidad celular, el canal se ubica en el citoplasma. Por medio de Western Blot, se comprobó que el canal TRPV4 aislado del núcleo posee un peso molecular de 122 kDa, lo que corresponde a la proteína completa (871 aminoácidos) que ha sufrido algún tipo de modificación postraduccional (probablemente glicosilación). Se observó la presencia de una banda de peso molecular menor (90 kDa), que únicamente se encontró en la fracción de proteínas del citoplasma, y que podría corresponder a alguna isoforma del canal. Los resultados obtenidos comprueban la presencia del canal TRPV4 completo en el núcleo de células MDCK, y sirve como referencia para que se desarrollen futuros trabajos con el fin de dilucidar la función e importancia biológica de esta localización inusual que no había sido documentada previamente.

**Palabras Clave:** TRPV4, Núcleo, células MDCK, Inmunofluorescencia, Western Blot

## **ABSTRACT**

The TRPV4 ion channel (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) is a cation permeable channel of polymodal activation, whose functions include the ability to sense and respond to stimuli from outside the cell (e. g. temperature, osmotic pressure), for that reason, the channel location in the plasma membrane is vital for its correct function. In this work we studied a possible nuclear localization of TRPV4 ion channel in canine kidney epithelial cells (MDCK) grown under two different time conditions: high and low cell density. We found that these cells endogenously express TRPV4. When cells were evaluated in low density conditions, the channel localized mainly in the nuclei of most cells, whereas in high density conditions, in most cells TRPV4 is present mainly in cytoplasm, whilst in a few cells the channel still localized in the nucleus. Nuclear TRPV4 has a molecular weight of 122 kDa, which corresponds to the complete protein (871 amino acids) possibly as result of posttranslational modification (e. g. glycosylation). Interestingly, the presence of a shorter molecular weight band (90 kDa), which was present only in the cytoplasm but not in the nucleus, suggesting the presence of an unreported variant. These results confirm TRPV4 ion channel nuclear localization, and serves as reference for future work in order to elucidate the function and biological significance of this unusual location.

**Key words:** TRPV4, Nucleus, MDCK cells, Immunofluorescence, Western Blot

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Canales iónicos

El genoma de todos los organismos, desde los procariontes más pequeños hasta los organismos eucariontes de mayor tamaño codifica cientos de canales iónicos que median el flujo de iones a través de las membranas celulares. Gracias a la existencia de estos, es posible la generación de los impulsos nerviosos, el latir del corazón, la percepción de estímulos a través de nuestros sentidos; así mismo, son los responsables de la generación de las violentas descargas eléctricas de las rayas y anguilas eléctricas, la apertura y cierre de estomas en las hojas de las plantas, por mencionar algunas de sus funciones (Hille, 2001).

Los canales iónicos presentan propiedades que los distinguen de otras proteínas en la membrana celular: poseen una alta selectividad a un ión o a un grupo de iones en particular, así mismo, poseen mecanismos que les permiten controlar el cierre o apertura del poro, proceso en el cual participan diferentes estímulos como temperatura, presión, cambios de voltaje, pH, ligandos (nucleótidos, neurotransmisores, hormonas, etc.), (Ramsey, *et al.*, 2005).

Como toda proteína, los canales iónicos pueden ser agrupados de acuerdo con sus estructuras y/o funciones conservadas debido a su origen evolutivo en común. Un ejemplo de estos canales son las proteínas pertenecientes a la familia TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*). Los canales pertenecientes a esta familia se caracterizan por ser permeables a cationes principalmente a  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , que participan en una gran variedad de funciones fisiológicas.

## 1.2. Familia de canales iónicos TRP

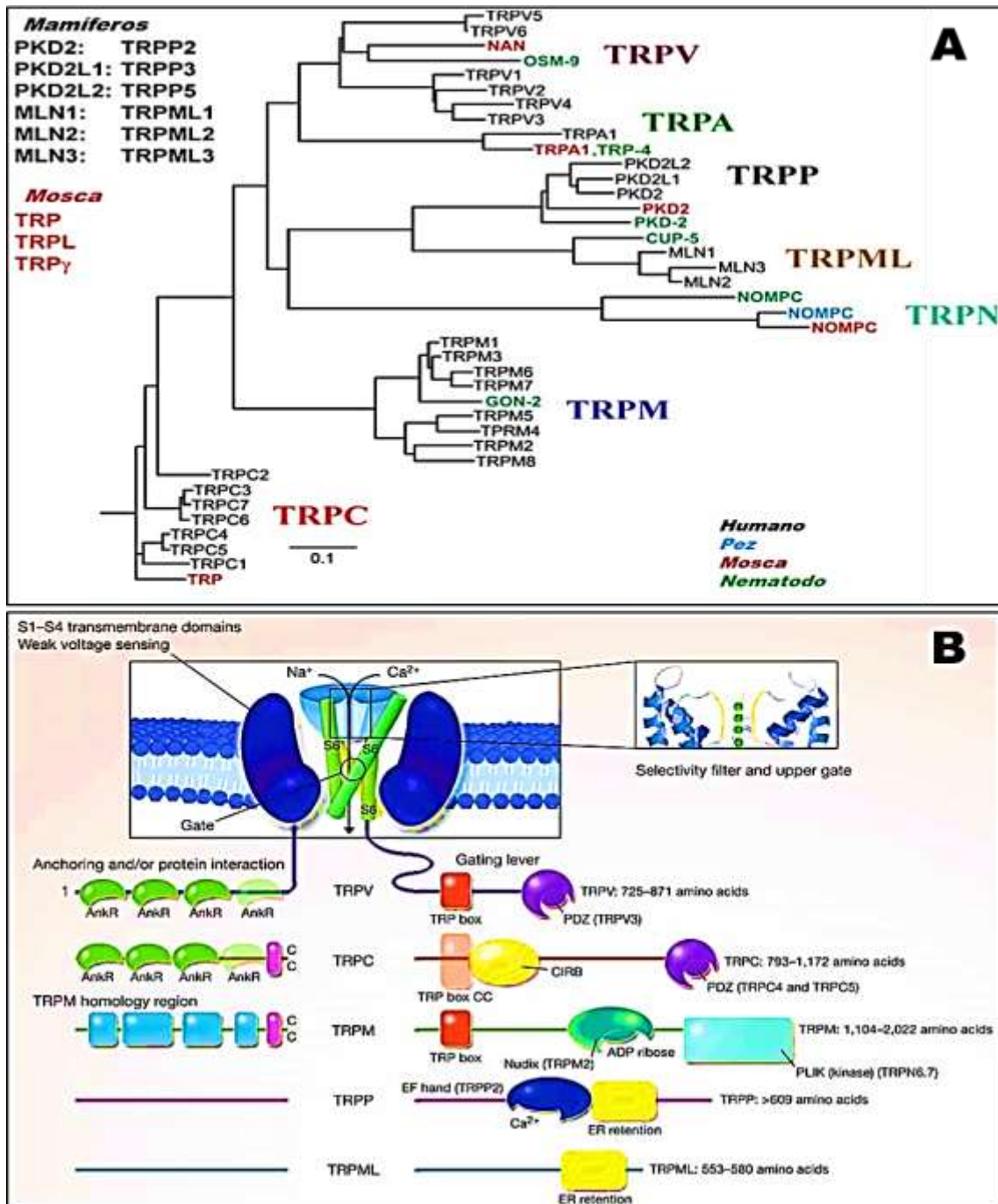
Las proteínas de la familia TRP son un grupo diverso de canales iónicos no selectivos, permeables principalmente a cationes mono y bivalentes (e. g.  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ). Todos los miembros de esta familia son homólogos al canal TRP de *Drosophila melanogaster*, del cual deriva el nombre de la familia. Esta proteína fue reportada por primera vez en 1969, mediante el análisis de moscas mutantes en el gen *trp*, las cuales exhibían una respuesta transitoria y anormal a la luz, en lugar de una respuesta normal y sostenida que mostraban las moscas silvestres (Cosens y Manning, 1969; Montell y Rubin, 1989).

Los canales TRP intervienen principalmente en todas las modalidades de sensación: desde la visión hasta el gusto, la olfacción, la audición, la mecano y la termosensación, así como la percepción de osmolaridad (Montell, 2005). Otros reportes incluyen funciones como: detección y evasión de ambientes hipertónicos en levaduras (Kaleta y Palmer, 2011); percepción y evasión de químicos nocivos en nemátodos (Kahn-Kirby y Bargmann, 2006); percepción de feromonas en ratones (Stowers, *et al.*, 2002), detectar y responder a la luz UV (Moore, *et al.*, 2013); en humanos algunos canales TRP participan en la detección de algunos sabores (Zhang, *et al.*, 2003), así como en la detección de temperaturas (Vay, *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que el mal funcionamiento de algunos canales TRP provoca el desarrollo de patologías como enfermedades neurodegenerativas, ciertos tipos de enanismo o enfermedad poliquística renal, entre otras (Nilius, *et al.*, 2007).

Con base en su estructura primaria, los canales TRP han sido clasificados en siete subfamilias. TRPC (canónicos): TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPML (mucolipina), TRPP (polcistina), TRPA (ankirina), y TRPN (sin potencial mecanoreceptor C o NOMPC) (Pedersen, *et al.* 2005). Las relaciones evolutivas entre los miembros de esta familia se ilustran en la figura 1.

Estructuralmente, los canales TRP están conformados por la unión de cuatro subunidades polipeptídicas, las cuales se unen formando tanto homo como heterotetrámeros para producir un canal funcional. Cada subunidad posee seis segmentos transmembranales (llamados S1-S6). La interacción de los segmentos S5 y S6 de cada una de las cuatro subunidades conforma el poro del canal, mientras que el asa extracelular que conecta a estos dos segmentos funciona como el filtro de selectividad. Es posible que los dominios S1-4 participen en la regulación de la apertura del canal, debido a que en estos se encuentran los sitios de unión a ligandos. Las regiones carboxilo y amino terminal de cada subunidad se encuentran en el citoplasma, ambas poseen un número y tipo determinado de dominios particulares (e. g.: dominios de unión a proteínas, sitios de fosforilación o glicosilación).





**Figura 1.** Características estructurales y filogenéticas de los canales TRP. **A.** Relaciones filogenéticas de las diferentes subfamilias. Cada color representa un canal perteneciente a la especie indicada (solo se incluyeron pocos canales de *D. melanogaster* y *C. elegans*). La barra de escala representa 0.1 sustituciones de nucleótidos por sitio (Modificada de Nilius y Mahieu, 2006) **B.** Representación esquemática de la estructura de las subunidades de los TRP, se hace especial énfasis al poro y al filtro de selectividad ubicado entre los segmentos transmembranales S5-S6 así como el bucle que los conecta (ampliación). El segmento S5 no se ilustra para una mejor apreciación. Se observa también las regiones carboxilo y amino terminal citoplasmáticas de algunas subfamilias, los dominios presentes en estas, así como la longitud de cada subunidad. (Tomada de Clapham, 2003).

Algunas características en común de estas regiones incluyen: repetidos de ankirina (ANK) y dominios ricos en prolinas (PRD) ubicados en la región amino, y en la región carboxilo presentan la caja TRP que es una secuencia de aminoácidos (EWKFAR) conservada en todos los miembros de la familia (Fig. 1B) (Clapham. 2003; Ramsey, *et al.*, 2005; Wu, *et al.*, 2010).

### **1.3. Subfamilia TRPV**

Algunos de los TRP que han sido estudiados con mayor detalle, pertenecen a la subfamilia TRPV, debido a sus diversas e importantes funciones en la fisiología tanto a nivel celular como del organismo. Participan en procesos como la termosensación, la percepción de cambios en la osmolaridad, percepción de estímulos que pueden ser nocivos, entre otras. Estas proteínas reciben su nombre debido a que son homólogos al primer miembro descrito de este grupo: TRPV1, el cual es activado por capsaicina, compuesto que se encuentra en los chiles en cuya estructura química está presente un anillo aromático llamado grupo vanililo (Caterina *et al.*, 1997). Hasta la fecha se han descrito cinco miembros de esta subfamilia en nemátodos, dos en moscas y seis en mamíferos (Montell, 2005). En la tabla 1 se resumen algunas de las características generales, funciones, métodos de activación y propiedades biofísicas de los miembros en mamíferos.

Los canales TRPV1-4 son poco selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  entre 1 y 10), no así TRPV5 y 6 los cuales son altamente selectivos ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$ ). Los canales TRPV son activados por una gran variedad de estímulos como: temperatura, cambios en la osmolaridad, y diversos agonistas químicos. Son regulados por numerosas señales, como  $\text{Ca}^{2+}$ , Calmodulina, PKA, PKC, además de una amplia gama de moléculas y estímulos diferentes (Tabla 1) (Clapham, 2003; Wu, *et al.*, 2010).

### **1.4. TRPV4**

Este canal es uno de los más estudiados, dada su importante participación en un gran número de funciones fisiológicas como la termo y mecanosensación, además de que el mal funcionamiento de este canal está asociado con el desarrollo de diversas enfermedades neuronales, y osteo-articulares (Everaerts, *et al.*, 2010; Nilius y Voets, 2013).

Nombre	Selectividad (P <sub>Ca</sub> /P <sub>Na</sub> )	Conductancia (pS)	Mecanismos de activación	Tejidos con mayor expresión	Funciones	Proteínas con las que interactúa
TRPV1	9.6 (Vaniloides); 3.8 (calor)	3-8	Temperatura(>40°C), depolarización, compuestos vaniloides (capsaicina), anandamida, pH ácido (≤5.9), PKA, PIP <sub>2</sub> , exocitosis	Ganglio Trigémico (GT) y de la Raíz Dorsal (GRD), Vejiga	Sensor de temperaturas altas y de compuestos picantes	TRPV3, Calmodulina, PKC
TRPV2	3	n.d.	Altas temperaturas (≥53°C), exocitosis, estrés mecánico, factores de crecimiento (IGF-1)	GRD, medula espinal (ME), cerebro, bazo, intestinos, miocitos vasculares	Detector de temperaturas muy altas y nocivas, posible participación en la degeneración del musculo	RGA, ACBD3 (PAR7),
TRPV3	2.6	190	Temperatura (30 a 39 °C), camfor	GRD, queratinocitos, lengua, GT, ME, Cerebro	Sensor de altas temperaturas	TRPV1
TRPV4	6	90	Hiposmolaridad, temperatura (>24°C), anandamida, ácido araquidónico, ácido epoxieicosatrienoico, PKC, ester de forbol	Riñón, pulmón, bazo, testículos, endotelio, hígado, corazón, GRD, queratinocitos	Termosensor, receptor de cambios en la osmolaridad (hiposmolaridad)	CaM, MAP7, SGK1 y 2, Quinasas Scr, NHERF2, Acuaporina, PACSIN
TRPV5	>100	75	Generalmente constitutivo, bajo [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , hiperpolarización,	Riñón, duodeno, yeyuno, placenta, páncreas	Reabsorción de calcio en los riñones y posiblemente en el intestino	TRPV6, Anexina 2, CaM, S1001A10
TRPV6	>100	40-70	Generalmente constitutivo, bajo [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , hiperpolarización	Intestino delgado, páncreas, próstata, placenta	Reabsorción de calcio en los riñones	TRPV5, Anexina 2, CaM, S1001A10

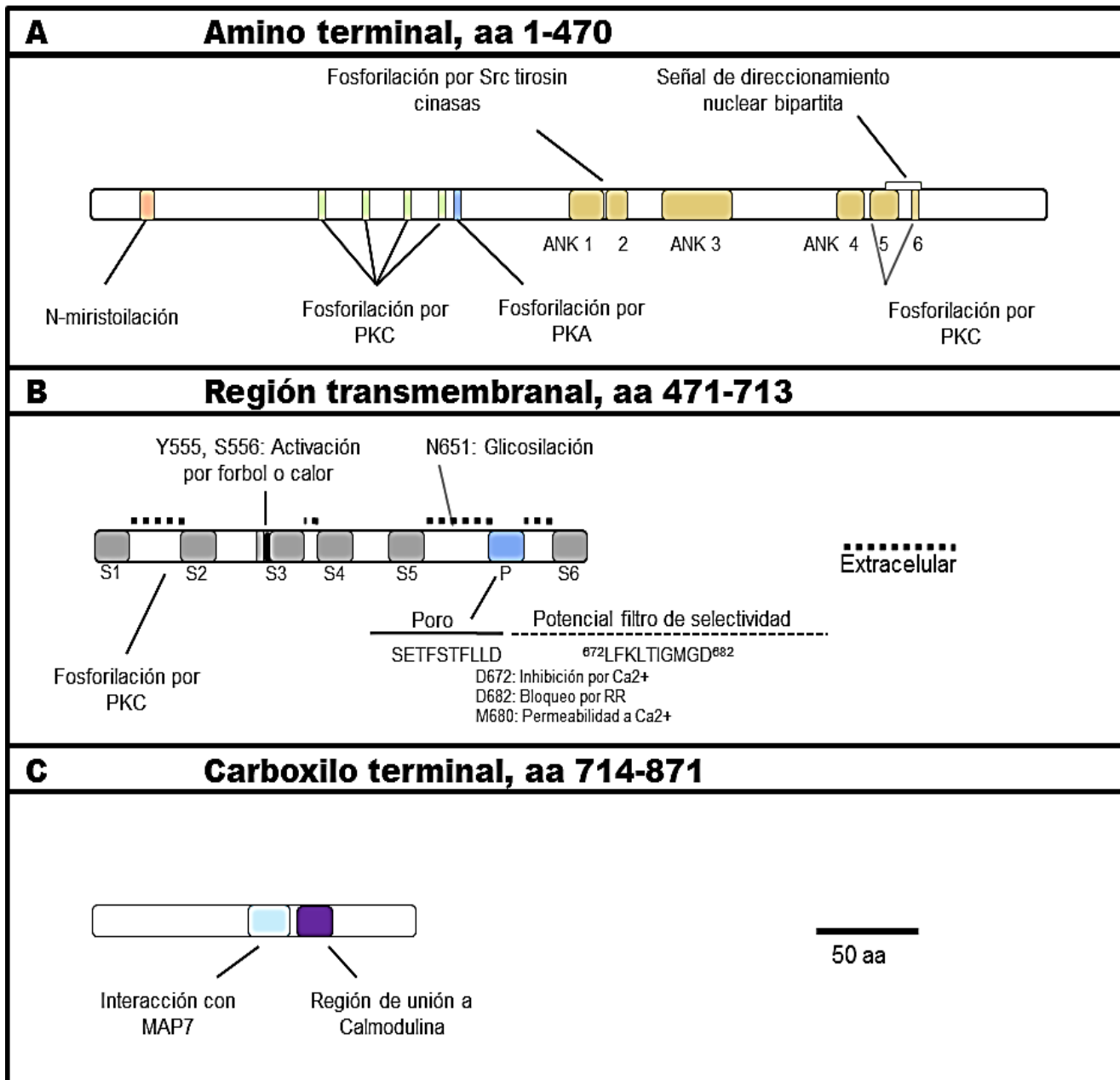
Tabla 1. Características de los miembros de la familia TRPV

TRPV4, también conocido por sus nombres anteriores como OTRPC4, VRL-2, VR-OAC, y TRP12 fue reportado por primera vez en el año 2000 por Liedtke y colaboradores quienes lo describieron como el osmosensor en mamíferos. Sin embargo, se sabe que TRPV4 es un canal de activación polimodal, con funciones mucho más complejas y variadas (Tabla 1), muchas de las cuales aún son desconocidas o han sido poco estudiadas. Cabe destacar que TRPV4 es capaz de integrar distintos estímulos, para así dar respuestas diferentes en cada tipo celular en el que se expresa.

#### **1.4.1. Características básicas del gen y la proteína TRPV4**

El gen de humano que codifica cada subunidad del canal TRPV4 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12 (12q24.1) y consta de 15 exones, con los que se generan al menos cinco variantes por procesamiento alternativo de su RNA mensajero llamadas TRPV4A a la E. La variante A (TPRV4-A) corresponde a la proteína completa (871 aminoácidos), y junto con la variante TRPV4-D constituyen las dos únicas variantes funcionales, ya que son correctamente transportadas hacia la membrana plasmática. Las otras dos variantes presentan problemas durante el tráfico de la proteína y son retenidas en el retículo endoplásmico (RE) (Arniges, *et al.*, 2006; Plant y Strotmann, 2007).

Estructuralmente, el canal TRPV4 posee la misma topología que el resto de los TRP (Fig. 1B), es decir, seis dominios transmembranales, el poro ubicado entre las regiones S5 y S6, mientras que los extremos amino y carboxilo terminales se encuentran inmersos en el citoplasma. Más de la mitad de la proteína corresponde a la región amino (aa 1-470), en la cual sobresale la presencia de seis repetidos de ankirina; el dominio PRD, diversos sitios de fosforilación por PKC y PKA, así como de quinasas de la familia Src, y dominios de miristoilación (Fig. 2A). A su vez, la región conformada por los segmentos transmembranales está compuesta por 242 aminoácidos (aa 471-713), en esta se localiza el poro del canal, formado por la interacción de los segmentos S5 y S6 (Fig. 1B, 2B). El asa extracelular que conecta a dichos segmentos corresponde al filtro de selectividad, adyacente a esta región se encuentra un sitio de glicosilación (N<sup>651</sup>) además de un sitio de fosforilación por PKC (Fig. 2B). Por último, la región carboxilo terminal también presenta dominios importantes para la interacción con diferentes proteínas como CaM, MAP7, y una región de unión a proteínas con dominios PDZ (Fig. 2) (Heller y O'Neil, 2007; Everaerts, *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Topología del canal TRPV4. **A.** Se ilustran la región amino terminal, los dominios y los sitios de modificación. **B.** Región transmembranal, se esquematizan las regiones S1-S6, filtro y el poro de selectividad, así como la secuencia de estos y algunos aa importantes. **C.** región carboxilo terminal, se observan las regiones de interacción con CaM y MAP7. La barra de escala representa 50 residuos de aminoácidos (Modificada de Heller y O'Neil, 2007)

### **1.4.2. Propiedades Biofísicas**

TRPV4 funciona como un canal catiónico no selectivo permeable a iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 6-10$ ), cuyas relaciones I-V exhiben un comportamiento de tipo rectificante saliente. La conductancia del canal único en potenciales de membrana positivos oscila alrededor de los 100 pS, mientras que en potenciales negativos la conductancia se encuentra entre 30 y 60 pS (Tabla 1) (Vennekens, *et al.*, 2008).

### **1.4.3. Mecanismos de activación y regulación**

El canal TRPV4 puede ser activado directa o indirectamente por una amplia variedad de estímulos: calor moderado ( $>24^\circ\text{C}$ ), hinchazón celular inducida por hipotonicidad osmótica, ligandos como la anandamida, el ácido araquidónico y metabolitos del ácido epoxieicosatrienoico, ácido cítrico, así como por algunos compuestos vegetales (bisandrografolido A, apigenina, ésteres de forbol); y por compuestos sintéticos como 4 $\alpha$ PDD y GSK1016790A4 (Plant y Strotmann, 2007; Vennekens, *et al.*, 2008; Everaerts, *et al.*, 2010). A su vez, la actividad del canal es modulada por diversos mecanismos: fosforilación mediada por quinasas como PKC, PKA, Src o WNK (Xu, *et al.*, 2003; Fu, *et al.*, 2006), variaciones en las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , por la interacción con numerosas proteínas como PACSIN 3, MAP7, Acuaporina 5, Caveolina 1, actina, los canales iónicos CFTR, BK, y TRPP2, y el receptor a IP3, entre otras (revisadas detalladamente por Everaerts, *et al.*, 2010).

### **1.4.4. Patrón de expresión y funciones del canal TRPV4**

Se ha detectado la expresión del canal TRPV4 en numerosos tejidos, siendo los riñones en donde se ha encontrado una mayor expresión. Aunque también se ha detectado en el corazón, pulmones, cerebro, hueso, cartílago, vejiga, intestino, hígado, páncreas, placenta, testículos, tracto reproductor femenino, musculo, piel, oído y glándulas salivales. El canal también se expresa en diversas células epiteliales de: cornea, tráquea, bronquios, laringe, colangiocitos, queratinocitos, glándula mamaria. También en células del endotelio vascular y células del sistema inmune. (Vennekens, *et al.*, 2008, Everaerts, *et al.*, 2010).

TRPV4 se expresa en el epitelio renal y en regiones del cerebro importantes para controlar el balance osmótico, participando activamente en la osmoregulación y en la

regulación de la liberación de la hormona vasopresina (Liedtke, *et al.*, 2000; Mizuno, *et al.*, 2003). Es también responsable de la percepción de la temperatura en diversos tejidos como piel, sistema nervioso, endotelio (Güler, *et al.*, 2002; Everaerts, *et al.*, 2010). El endotelio vascular y el tracto urinario, son tejidos que están sometidos a un constante estrés mecánico, también llamado presión por cizallamiento, se ha demostrado que TRPV4 participa en la mecanosensación de dicho estrés (Hartmannsgruber, *et al.*, 2007; Wu, *et al.*, 2007). A su vez, TRPV4 participa en la regulación de la función de barrera y la permeabilidad de los epitelios, como el mamario (Reiter, *et al.*, 2006). En el sistema óseo, TRPV4 desempeña un papel muy importante en la formación y remodelación de los huesos (Masuyama, *et al.*, 2008).

Por otra parte, TRPV4 funciona como un nociceptor, es decir, que es capaz de percibir y responder a estímulos que puedan llegar a causar algún tipo de daño a una célula o al organismo, como cambios de temperatura (Güler, *et al.*, 2002), de osmolaridad (Desai y Clapham, 2005), así como luz UV (Moore, *et al.*, 2013), y dolor hiperalgésico (Alessandri-Haber *et al.*, 2006) entre otros.

#### **1.4.5. Enfermedades relacionadas a mutaciones o mal funcionamiento de TRPV4**

Mutaciones en el gen que codifica para TRPV4 están involucradas con el desarrollo de enfermedades del sistema osteo-articular conocidas como displasias esqueléticas (como algunos tipos de enanismo), así como con el desarrollo de neuropatías moto-sensoriales o incluso efectos letales a nivel fetal (revisado a detalle en Nilius y Voets, 2013). Además de las ya mencionadas, se ha asociado a TRPV4 con el desarrollo de varias enfermedades como la diabetes tipo 2, afectaciones en la audición, cirrosis, fallas cardíacas, asma o inflamación del intestino (Everaerts, *et al.*, 2010).

#### **1.4.6. Regulación de la localización celular de TRPV4**

Todas las funciones descritas anteriormente indican fehacientemente que TRPV4 funciona principalmente como un sensor que permite percibir la información proveniente del espacio extracelular, por lo cual, la localización subcelular del canal es crucial para su correcto funcionamiento.

Muchos son los mecanismos por los cuales la localización celular de TRPV4 es regulada. La existencia de diferentes variantes por procesamiento alternativo, es uno de los mecanismos que regula la localización del canal, ya que solo dos de éstas son funcionales y pueden ser transportadas a la membrana plasmática (Arniges, *et al.*, 2006; Plant y Strotmann, 2007). Otros procesos que regulan dicha localización son los estados de oligomerización, es decir, los repetidos de ankirina en la región amino terminal controlan el ensamble de los tetrámeros funcionales (Arniges, *et al.*, 2006; Shindl y Romanin, 2007), únicamente cuando se forma un tetrámero puede ser exportado hacia la membrana. Por otro lado, la formación de heterotetrámeros, conformados por la unión con subunidades de otros TRP como TRPC1 (Ma, *et al.*, 2010) y TRPP2 (Köttgen, *et al.*, 2008), los cuales pueden localizarse en compartimentos intracelulares diferentes a la membrana plasmática. A su vez, la región carboxilo terminal también regula la multimerización y el tráfico del canal, ya que deleciones en esta región, dependiendo del número de aminoácidos faltantes, pueden tener como resultado una retención parcial o total en el RE (Becker, *et al.*, 2008). Algunos tipos de modificaciones postraduccionales como la glicosilación, pueden regular la ubicación celular de TRPV4, cuando el canal es glicosilado en el residuo asparagina<sup>651</sup> este es retenido en el RE (Xu, *et al.*, 2006). Por otra parte, mediante una marca por ubiquitinización, TRPV4 es endocitado, dependiendo del grado de ubiquitinización, el canal puede permanecer en vesículas intracelulares para poder ser reciclado en otro momento, o bien, ser degradado por el proteosoma (Wegierski *et al.*, 2006). Por si fuera poco, muchas proteínas con las que interactúa TRPV4 pueden llegar a regular su expresión en la membrana plasmática (PACSIN 3, MAP7, OS 9 y Caveolina) (Everaerts, *et al.*, 2010).

### **1.5. Localización nuclear del canal iónico TRPV4**

A pesar de todos los mecanismos de regulación que controlan la localización y el tráfico hacia la membrana plasmática de TRPV4, evidencia reciente obtenida por nuestro grupo de trabajo indica que TRPV4 se localiza en el núcleo de células de epitelio corneal de conejo (RCE-1) así como de epitelio renal canino (MDCK). A su vez, se observó que la localización nuclear del canal depende de la densidad a la que se encuentre el cultivo, ya que, sólo en condiciones de baja densidad celular el canal se encuentra en el núcleo celular; mientras que en condiciones de alta densidad celular el canal al parecer es translocado fuera del núcleo y



se localiza en el citoplasma. Estas observaciones sugieren que esta localización nuclear posiblemente está involucrada en procesos de proliferación y/o diferenciación celular. De comprobarse estas observaciones implicarían una acción novedosa sobre este canal iónico.

Hasta la fecha sólo existe un estudio que reporta la expresión nuclear de TRPV4 en cardiomiocitos ventriculares de rata realizado por Zhao y colaboradores en 2012, en cuyo trabajo indican que TRPV4 se ubica en el núcleo de este tipo de células, y al activar al canal con un estímulo hiposmótico propicia que el canal salga del núcleo y se localice principalmente en el citoplasma. No obstante, las observaciones de nuestro grupo de trabajo, representan el primer reporte de la presencia de TRPV4 en el núcleo de células de epitelio renal, el cual es el tejido donde se sabe que el canal tiene una mayor expresión (Cohen, *et al.*, 2005).

### **1.6. Canales TRP que presentan una localización nuclear**

En el nemátodo *C. elegans*, se ha reportado la presencia de un canal perteneciente a la subfamilia TRPV llamado OCR-2 el cual posee una señal de localización nuclear funcional que propicia su translocación al núcleo (Esak y Ferkey, 2011).

Otro miembro de la familia TRP también se expresa en el núcleo de una manera muy particular; es el caso del canal TRPM7, el cual posee en su región carboxilo terminal un dominio con actividad de quinasa, esta región es escindida del resto del canal y migra al núcleo en donde es capaz de fosforilar a proteínas que forman parte de complejos remodeladores de la cromatina, desempeñando un importante papel en el control de la expresión genética (Krapivinsky, *et al.*, 2014).

Ningún otro miembro de esta subfamilia ha sido encontrado en el núcleo celular, no obstante existen reportes que indican que varios canales TRPs se expresan en compartimientos intracelulares como vacuolas, lisosomas, endosomas, vesículas secretoras, aparato de Golgi y retículo endoplásmico, en donde desempeñan funciones relevantes en los procesos de endocitosis, exocitosis, y en la homeostasis vesicular en general (Dong, *et al.*, 2010).

### **1.7. Otros canales iónicos que presentan una localización nuclear**

Se ha encontrado la expresión nuclear de canales iónicos pertenecientes a otras familias. Un ejemplo de estos es el canal de calcio activado por voltaje 1.2 (Cav1.2), el cual de manera similar que TRPM7, sufre un corte proteolítico, y el fragmento carboxilo terminal es translocado al núcleo donde controla la transcripción de alrededor de 30 genes diferentes ya que actúa como un factor de transcripción (Gómez-Ospina, *et al.*, 2006). Otro ejemplo de canales iónicos que se localizan en el núcleo celular incluyen a los canales de calcio receptor para inositol trifosfato (InsP<sub>3</sub>R) (Leite, *et al.*, 2003), y el receptor de rianodina (RyR) (Bootman, *et al.*, 2009), los cuales son funcionales aun como canales, y participan activamente en la regulación de las concentraciones de calcio en el nucleoplasma ( $[Ca^{2+}]_{nu}$ ), la cual es sumamente importante para el control de la expresión genética, además de participar en procesos como el crecimiento celular y la proliferación (Resende, *et al.*, 2013). Otro tipo de canales iónicos encontrados en el núcleo son: el canal de potasio activado por ATP (K<sub>ATP</sub>) (Quesada, *et al.*, 2002), y el canal de potasio de gran conductancia (BK) (Li, *et al.*, 2014), estos canales tampoco sufren cortes proteolíticos, por lo que conservan sus funciones como canales.

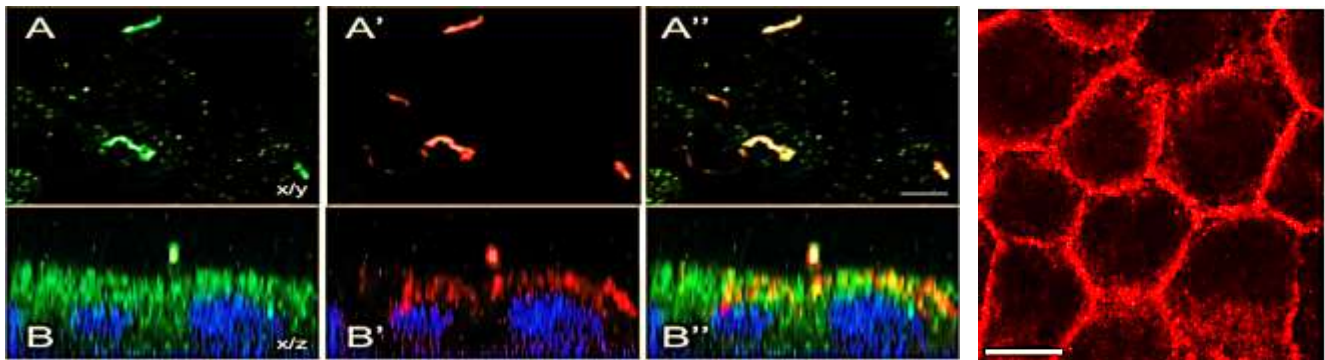
Todas las proteínas antes mencionadas presentan en común varios segmentos transmembranales altamente hidrofóbicas, por lo cual, si se llegan a localizar en el núcleo posiblemente sufren algún tipo de corte proteolítico, para que una fracción presumiblemente hidrofílica pueda ser transportada al núcleo, como TRPM7 o Cav1.2 o bien, están ancladas a la membrana nuclear, y siguen funcionando como canales iónicos como BK, InsP<sub>3</sub>R y RyR. En caso de que TRPV4 también se localice en el núcleo, es posible que se presente en alguna de las dos formas antes mencionadas para cumplir con su rol nuclear.

### **1.8. Antecedentes de TRPV4 en células MDCK**

La evidencia anterior indica que, aunque no es tan común, moléculas altamente especializadas que tienden a encontrarse en la membrana plasmática para poder realizar sus funciones, pueden tener diferentes funciones en otros organelos celulares. En el presente trabajo se realizó un análisis de la localización nuclear inusual del canal TRPV4, utilizando como modelo de estudio la línea celular MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), derivada de epitelio renal canino. Esta línea celular es un modelo de células epiteliales mejor caracterizado en donde se

han hecho una gran cantidad de estudios por lo cual se tiene una caracterización a detalle de muchos de los procesos celulares y moleculares que ocurren en estas células relacionados con proliferación y diferenciación.

Existen algunos reportes de la expresión de TRPV4 en células MDCK, Köttgen y colaboradores (2008), observaron que el canal TRPV4 forma heterotetrámeros con TRPP2, y el canal formado por estas dos proteínas se localiza principalmente en el cilio primario (Fig. 3A) (Köttgen, *et. al.* 2008), el cual es una estructura que sirve como receptor para percibir diversos estímulos provenientes del espacio extracelular. Por otro lado, Wegierski y colaboradores (2009), estudiaron la participación de quinasas de la familia Src en la modulación de la actividad del canal, para ello expresaron heterológamente una construcción de TRPV4 con un epítipo Flag en el extremo carboxilo terminal y encontraron que el canal se localiza principalmente en el dominio lateral de la membrana plasmática (Fig. 3C), esto fue realizado en cultivos de células crecidas a alta densidad (Wegierski, *et. al.* 2009).



**Figura 3.** Expresión del canal TRPV4 en células MDCK. *Der.* Imágenes de microscopia confocal que indican la localización de TRPV4 endógeno en el cilio primario de células MDCK, en la figura A se observa el canal, en A' se observa el marcador de cilio primario tubulina acetilada, y en A'' la sobreposición de las imágenes. En B-B'' es una vista lateral del mismo campo (Tomada de Köttgen, *et. al.* 2008). *Izq.* Imagen de IF en donde se visualiza la localización en el dominio lateral de la membrana plasmática del canal TRPV4-flag transfectado de manera estable en células MDCK crecidas a confluencia. La barra de escala corresponde a 10µm (Tomado de Wegierski, *et. al.* 2009)

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Dado que es la primera vez que se describe al canal TRPV4 en el núcleo de células epiteliales, es necesario obtener evidencias bioquímicas sólidas que confirmen que esta localización subcelular es real además de investigar si el canal nuclear está completo o es sólo un fragmento de la molécula que viaja al núcleo. Y eventualmente determinar la importancia de un canal como TRPV4 en este organelo.

## **3. HIPÓTESIS**

El canal iónico TRPV4 detectado en el núcleo de las células de epitelio renal MDCK corresponde a la proteína completa.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

- Analizar la expresión del canal TRPV4 en el núcleo de células de epitelio renal canino (MDCK).

### **4.2. Objetivos Particulares**

- Evaluar la expresión de TRPV4 en células MDCK cultivadas en condiciones de baja y alta densidad celular mediante Inmunofluorescencia.
- Identificar mediante Western Blot la expresión endógena a nivel de proteína de TRPV4 en extractos de proteínas citoplasmáticas y nucleares de células MDCK cultivadas tanto en condiciones de baja como de alta densidad celular.
- Determinar la pureza de los extractos de cada fracción celular mediante la identificación de actina y lámina B1 (proteínas específicas de citoplasma y núcleo respectivamente).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Cultivo celular

Células MDCK (ATCC: CCL-34) fueron crecidas en medio DMEM convencional, suplementadas con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (GIBCO, Invitrogen, USA). Las células se mantuvieron en incubadora a una temperatura constante de 37° C, y una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron a una densidad de 20,000 células/cm<sup>2</sup>, en una caja Petri de 100 mm de diámetro (1.1 x 10<sup>6</sup> células por caja). Transcurrido un día después de la siembra se consideró como células en baja densidad, mientras que la alta densidad celular se consideró tras siete días de cultivo. El medio fue renovado cada dos o tres días.

### 5.2. Anticuerpos

Para realizar la inmunolocalización se utilizaron los siguientes anticuerpos:

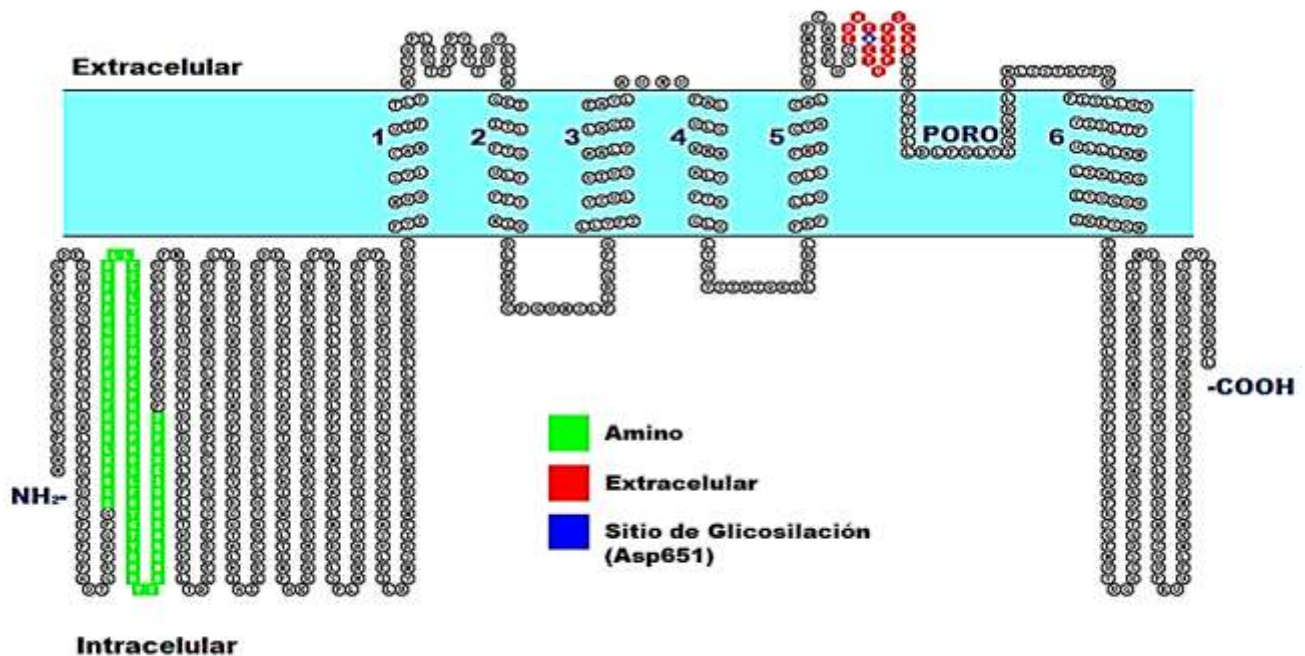
Primarios: Anticuerpo policlonal anti-TRPV4 (reconoce la región amino terminal) fabricado en conejo, utilizado a una dilución 1:1000 (WB) o 1:100 (IF) (Santa Cruz Biotechnology, USA). Anticuerpo policlonal anti-TRPV4 (reconoce la región extracelular localizada entre S5 y S6) fabricado en conejo, utilizado en una dilución 1:300 (WB) (Alomone Labs, Israel). Anticuerpo monoclonal anti-actina fabricado en ratón, dilución 1:500 (WB) (sobrenadante de cultivo de hibridoma, donado amablemente por el Dr. J.M. Hernández, Depto. Biol. Cel. CINVESTAV, México). Anticuerpo monoclonal anti-lamina B1 fabricado en ratón, dilución 1:1000 (WB) (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Secundarios: anticuerpo anti-conejo IgG acoplado a HRP fabricado en cabra, utilizado a una dilución 1:5000 (WB) (Invitrogen, USA)). Anticuerpo anti-ratón IgG acoplado a HRP fabricado en conejo, utilizado a una dilución 1:5000 (WB) (Invitrogen, USA). Anticuerpo anti-conejo acoplado a Alexa 488, dilución 1:200 (WB) (Invitrogen, USA). En la tabla 2 se muestran las secuencias de los epítomos que reconocen los anticuerpos, así como la comparación con la secuencia de perro.

Anticuerpo (Catálogo)	Secuencia (Epítipo vs Perro)	Especie	No. Acceso (UniProt)	Similitud (%)
TRPV4 (H-79) Amino (Santa Cruz, cat. SC-98592) Origen Humano	62-DGRPNLRMKFQGAFRKGVPNPIDLLESTLYESSVVPGPKKAPMDSLFDYGTYRHH <span style="background-color: #0000FF;">SSDNKRWRKK</span> IEKQPQS-134	Humano	Q9HBA0	
	62-DGRPNLRMKFQGAFRKGVPNPIDLLESTLYESSVVPGPKKAPMDSLFDYGTYRHH <span style="background-color: #0000FF;">SSDNKRWRKK</span> IEKQPQS-134	Perro	B2KN54	97.26
Anti-TRPV4 (Extracelular) (Alomone, Cat. ACC-124)	647- <span style="background-color: #0000FF;">NEDQSNCTVPSYP</span> ACRD-662	Rata	Q9ERZ8	
	647- <span style="background-color: #0000FF;">SEDHTNCTVPTYP</span> SCRD-662	Perro	B2KN54	70.58

**Tabla 2.** Características de los anticuerpos utilizados para detectar al canal TRPV4. Se muestran en color azul los aminoácidos diferentes en cada secuencia.

Así mismo en la figura 4 se presenta una representación de la topología del canal TRPV4. Las regiones que son reconocidas por cada anticuerpo antes mencionado son resaltadas en diferente color para su mejor visualización.



**Figura 4.** Representación de las regiones reconocidas por los anticuerpos utilizados para detectar al canal TRPV4. También se indica uno de los sitios de glicosilación del canal, N651, el cual está inmerso dentro del epítipo que reconoce el anticuerpo extracelular. Esquema elaborado mediante el software TOPO2 <http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2> (Johns, 2013)

### **5.3. Inmunolocalización del canal TRPV4**

Las células MDCK fueron sembradas en cajas Petri de 35 mm de diámetro sobre cubreobjetos de vidrio de 10 x 10 mm. Transcurridos los días para que las células se encontraran en condiciones de baja y alta densidad celular, fueron fijadas añadiendo 1 mL de paraformaldehído al 4% en PBS, incubando a 4°C por 20 min, posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS. Las células fueron permeabilizadas con una solución de Tritón X-100 al 0.05% en PBS por 5 min a T.A. y nuevamente lavadas con PBS. Después de esto, se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos utilizando el reactivo Power Block (BioGenex. USA) al 1x en PBS por 5 min a T.A. y lavadas dos veces con PBS. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se hicieron seis lavados con Tween-20 al 0.005 % en PBS. Una vez hecho esto, las células se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a 37°C. Se realizaron seis lavados con Tween 20 al 0.005% en PBS. Adicionalmente, los núcleos fueron teñidos utilizando una solución de yoduro de propidio (IP) 1  $\mu$ M por 5 min. Se lavó el exceso con PBS. Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos limpios utilizando el medio de montaje VectaShield (Vector Labs, USA). Las células tratadas fueron observadas al microscopio (Axiovert 25, Carl Zeiss, Alemania), los fluoróforos fueron excitados utilizando una lámpara de halógeno y el filtro correspondiente).

### **5.4. Extracción de Proteínas**

#### **5.4.1. Extracción de proteínas totales**

A células crecidas en las condiciones antes mencionadas, se les retiró el medio y fueron lavadas dos veces con PBS a 4°C. Posteriormente, se les adicionó buffer de lisis A (500  $\mu$ L para células en alta densidad y 250  $\mu$ L para baja densidad) (Ver composición del buffer en el Apéndice 1), y se incubaron a 20°C durante 20 min, pasado ese tiempo las células fueron despegadas de la caja al rasparlas mecánicamente. Se colectó el lisado en un tubo de 1.5 mL, éste se homogeneizó haciéndolo pasar por una jeringa de insulina por esta alrededor de 15 veces. Finalmente se realizó una centrifugación a 12000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue colectado y almacenado a -20°C.

#### **5.4.2. Extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares**

A las 24 horas o a los 7 días de cultivo se realizó la extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares. Las células se incubaron en hielo por 10 min, posteriormente se lavaron dos veces con PBS (frío), para después ser mantenidas en suspensión al despegarlas de la caja incubándolas con tripsina (GIBCO, Invitrogen, USA) por 10-15 min a 37°C. Posteriormente se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y mediante centrifugación a 1500 rpm por 10 min se obtuvo una pastilla de células, la cual se lavó 3 veces con PBS a 4°C, Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en el buffer de lisis de membranas celulares (Buffer B) (Ver Anexo 1) se colocaron en hielo durante 10 min, y fueron agitadas vigorosamente en un agitador mecánico cada 2 min por 5 s cada vez. Pasados los 10 min se realizó una nueva centrifugación a 1000 rpm por 10 min, el sobrenadante (fracción citoplasmática) fue colectado en un tubo de 1.5 mL y almacenado a -20°C. La pastilla (núcleos) se resuspendió en buffer de lisis (Buffer A), e incubada durante 20 min a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 3 min. El sobrenadante (fracción nuclear) se colectó y almacenó a -20°C para su posterior análisis (modificado de Carey y Smale, 2000)

#### **5.5. Determinación de la concentración de proteína**

La concentración de proteínas se estimó mediante el método de Bradford (1976). Una vez obtenidos los extractos de cada una de las fracciones, se realizó la cuantificación mediante la elaboración de una curva estándar con concentraciones conocidas de Albumina Sérica de Bovino (BSA) (Pierce, USA), mezclando el reactivo de Bradford (Thermo, USA), posteriormente se midió con un espectrofotómetro DU® 650 (Beckman, USA) la absorbancia de las muestras a D.O. 590 nm.

#### **5.6. Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturizantes (Acrilamida-SDS)**

Los extractos obtenidos fueron mezclados con buffer de carga desnaturizante 6x (Laemmli, 1970) (ver Anexo 1), quedando una concentración final de 1x, inmediatamente la desnaturización fue completada al hervir las muestras durante 5 min. Posteriormente se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), a una concentración de 8% de acrilamida/bisacrilamida. Se cargaron 30 µg de extracto proteico por carril, los geles fueron



corridos en una cámara de electroforesis Thetra Cell System (Bio-Rad, USA) la cual contenía buffer de corrida 1x (ver Anexo 1), aplicando una corriente de 15 mA por cada gel durante 2-3 h.

### **5.7. Integridad de proteínas**

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis se verificó que no estuvieran degradadas. Para ello el gel obtenido fue teñido con azul de Coomasie (Anexo 1), y dejado en incubación durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el colorante y el gel fue desteñido (ver Anexo 1) con el fin de visualizar la intensidad y patrón de las bandas.

### **5.8. Western Blot**

Las proteínas contenidas en el gel de poliacrilamida fueron transferidas eléctricamente a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) (Bio-Rad, USA), utilizando una cámara de transferencia húmeda, aplicando una corriente de 400 mA durante ~12hrs. Posteriormente, se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos utilizando leche en polvo baja en grasa al 10% disuelta en TBS-tween 1X (TBS-T) durante 1 h a T.A. Después, se realizaron una serie de seis lavados con TBS-T durante 10 min cada uno para retirar el exceso de leche. Posteriormente la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios, los cuales fueron disueltos en leche al 10% en TBS-T p/v. La membrana fue lavada seis veces con TBST-t (10 min c/u), para ser incubada con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hr a T.A., diluidos en una solución de leche 10%. Posteriormente se realizó una nueva serie de seis lavados con TBS-T. Para detectar la señal luminiscente, la membrana fue incubada durante 5 min en una solución de quimioluminiscencia a base de luminol (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, USA), finalmente en un cuarto oscuro, se colocó una placa para autorradiografía sobre la membrana, la cual fue tratada químicamente con la solución reveladora para poder visualizar la presencia de las proteínas, y una solución fijadora para poder preservar la señal contenida en la placa (Carestream Dental, Kodak, Japón). Después de ser reveladas, las membranas fueron almacenadas a -20°C.

### **5.9. Remoción de anticuerpos y reutilización de las membranas de PVDF**

A las membranas ya utilizadas, se les realizó un *stripping*, proceso por el cual los anticuerpos que se adhirieron a la proteína diana son eliminados y la membrana queda disponible para realizar una nueva incubación con otro anticuerpo. Para ello, las membranas ya utilizadas se incubaron en una solución de ditionito de sodio al 1% en TBS-T (w/v), durante 1 h a T.A. Se realizaron seis lavados con PBS-T como se describió previamente. Se reveló la membrana para asegurarse de que no existía señal del anticuerpo anterior. Después de esto las membranas fueron tratadas para detectar otra proteína con anticuerpos diferentes (lamina B1 o actina).

### **5.10. Análisis Estadísticos**

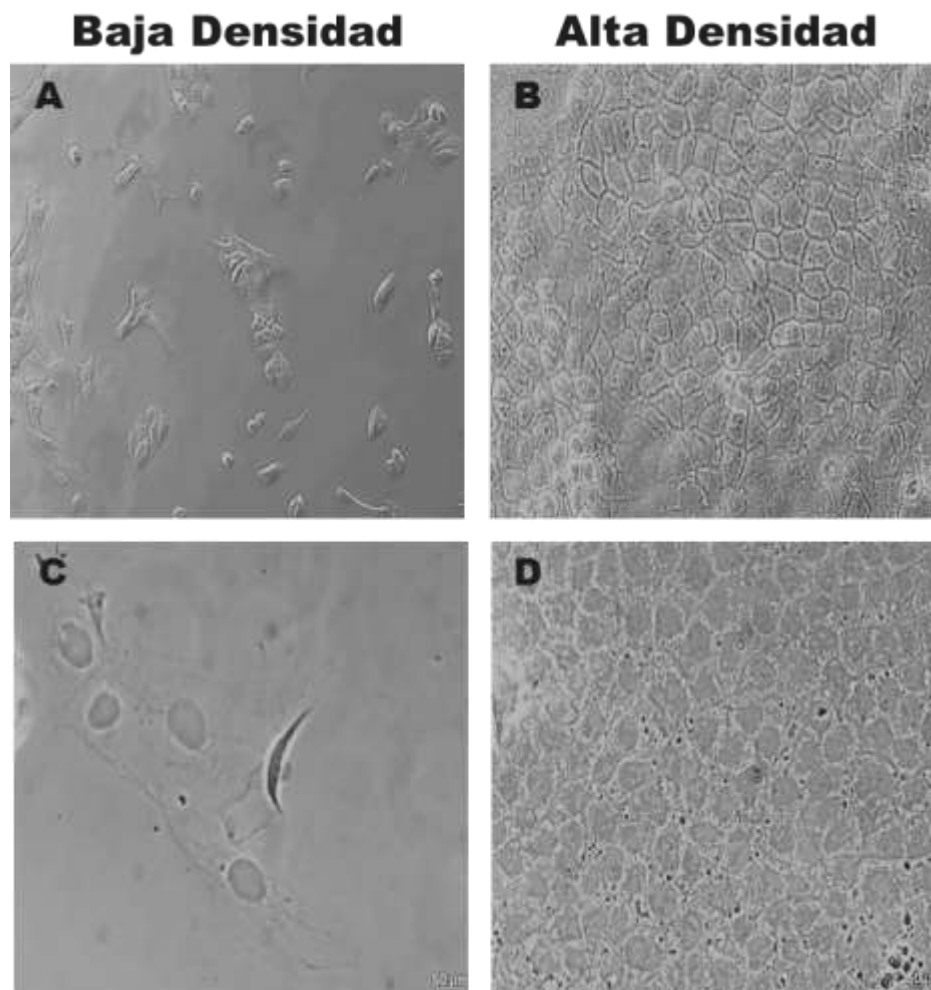
Se realizaron análisis de regresión lineal para determinar el peso molecular de los extractos obtenidos, utilizando el programa Microsoft Excel® 2013. Por otro lado, las imágenes obtenidas por Inmunofluorescencia fueron procesadas utilizando los mismos parámetros en el programa ImageJ (NIH, USA) (software de acceso público <http://imagej.nih.gov/ij>).

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. Cultivo de células MDCK: condiciones de alta y baja densidad celular**

Para proceder con cada ensayo planteado se requirió que las células MDCK fueran cultivadas en dos condiciones diferentes: a baja densidad celular (1 día de cultivo) y alta densidad celular (7 días) cuando las células ya están polarizadas y han establecido contactos celulares (uniones adherentes, comunicantes y estrechas). Antes de cada ensayo se verificó que las células estuviesen en condiciones de crecimiento homogéneas, para lo cual fueron observadas y fotografiadas, para registrar la apariencia y cantidad de células en ambas condiciones. En la figura 5 se muestran imágenes de microscopía óptica de las células MDCK tanto a baja como a alta densidad. Las primeras muestran una confluencia baja ( $\leq 30\%$ ), estas comienzan a formar pequeños grupos de células unidas con morfologías heterogéneas, (Fig. 5A y 5C). Por

otro lado, cuando las células han llegado al séptimo día de cultivo, la confluencia del cultivo se aproxima al 100%, estas adoptan una forma poligonal más homogénea, (Fig. 5B y 5D).



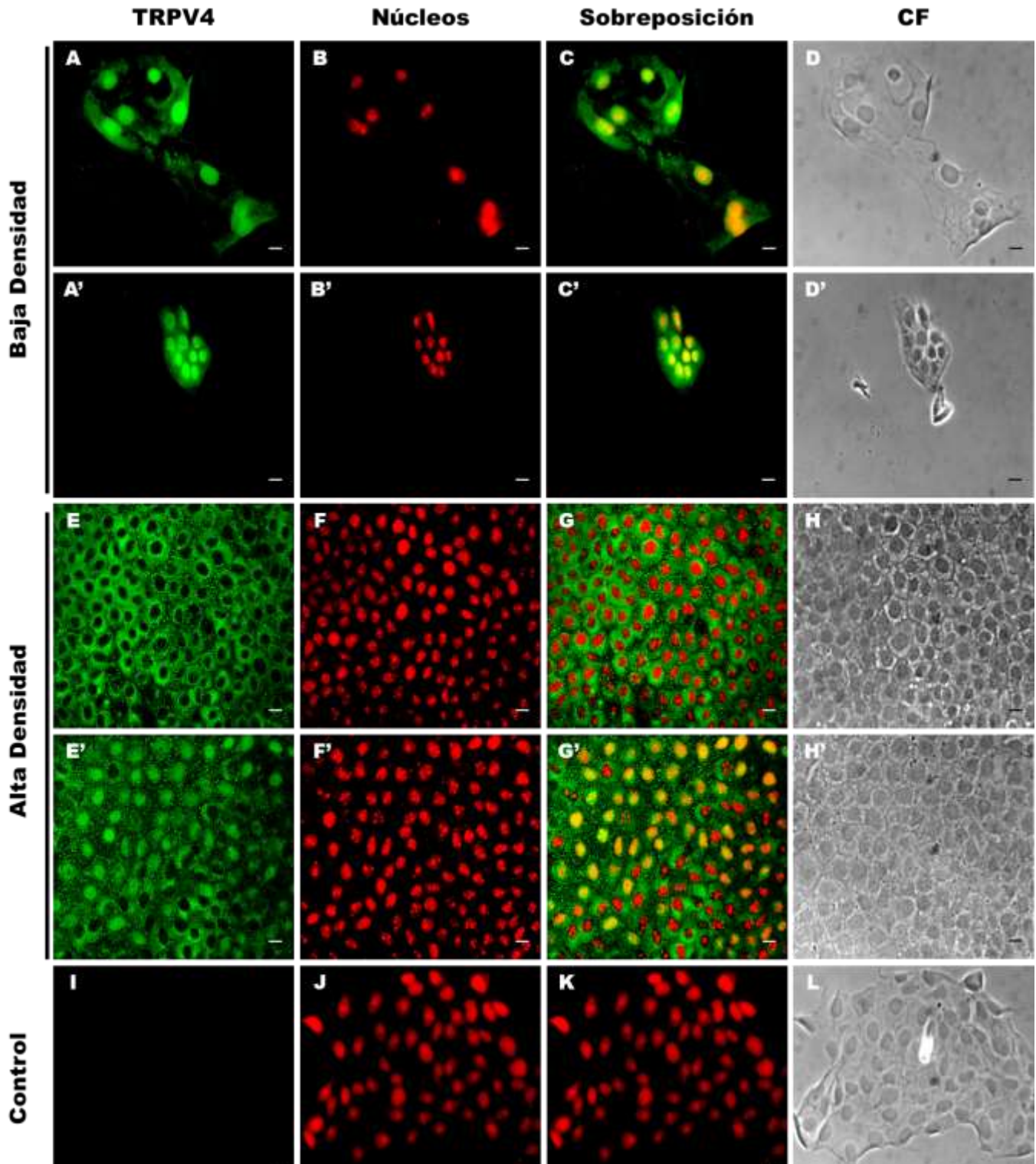
**Figura 5.** Morfología del cultivo de células MDCK en ambas condiciones de densidad celular baja y alta. **A.** Cultivo a baja densidad (1 día) se observan pequeños grupos de células (20x). **B.** Cultivo confluyente con alta densidad celular (7 días) casi 100% de confluencia (20x). **C.** Cultivo a densidad baja (40x). **D.** células en alta densidad (40x).

## **6.2. Análisis de la expresión del canal TRPV4**

### **6.2.1. Inmunolocalización del canal TRPV4**

Inicialmente se realizaron ensayos de Inmunofluorescencia (IF) del canal TRPV4 con el anticuerpo que reconoce al extremo amino terminal del canal para reproducir los resultados obtenidos previamente en el laboratorio sobre la localización nuclear de TRPV4 en células crecidas a baja densidad celular. Se usaron células crecidas a baja y alta densidad para detectar al canal endógeno.

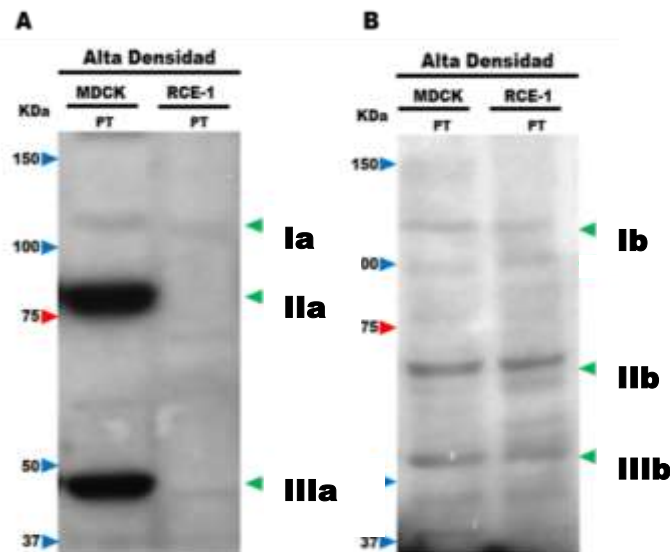
De manera interesante, se observó que, cuando las células se encuentran a baja densidad celular, TRPV4 se localiza principalmente en el núcleo de casi el 100% de las células, además se observa una localización citoplasmática aparentemente menos abundante (Fig. 6A-A'), la tinción con ioduro de propidio (IP) se empleó para marcar el núcleo de cada célula (Fig. 6B, B'), al sobreponer las imágenes, se observa claramente que la señal nuclear de TRPV4 (verde) en células a baja densidad, co-localiza con la marca del IP (rojo) observándose en color amarillo (Fig. 6C-C'). Por otro lado, las células de siete días de cultivo (densidad alta), continúan expresando a TRPV4, pero interesantemente, la mayoría de las células ya no presentan la localización nuclear antes mencionada, sino que el canal se localiza principalmente en la región citoplasmática (Fig. 6E), lo cual se confirma al sobreponer las imágenes del canal con la de tinción con IP (Fig. 6G). No obstante, esto no ocurre en el 100% de las células, ya que algunas aun expresan al canal mayoritariamente en el núcleo (Fig. 6E'), cuya señal co-localiza con la señal nuclear generada por el IP (Fig. 6G'). Existen zonas en donde células que no presentan TRPV4 nuclear, se encuentran rodeadas por células en donde el canal se localiza principalmente en el núcleo (Fig. 6E', G'). Para excluir la posibilidad de estar observando una reacción inespecífica del anticuerpo secundario, se realizó un control donde las células solamente se incubaron con este último (Fig.6H), y el resultado negativo fue confirmado.



**Figura 6.** Inmunolocalización del canal TRPV4. **A-D, A'-D'**. Dos campos diferentes del patrón de localización de TRPV4 (color verde) en células a baja densidad celular. **E-H, E'-H'**. Detección de TRPV4 en dos campos diferentes de células MDCK crecidas a alta densidad celular. **I-L**. Células no confluentes tratadas solo con el anticuerpo secundario. **A, A', E, E'**. Células teñidas con el anticuerpo anti-TRPV4. **B, B', F, F', J**. Núcleos teñidos con ioduro de propidio (Rojo). **C, C', G, G', K**. Sobre posición de imágenes de la inmunolocalización de TRPV4 con la realizada con IP. **D, D', H, H', L**. Imágenes de contraste de fases de los campos analizados. **CF**: Contraste de Fases. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

## 6.2.2. Expresión del canal TRPV4

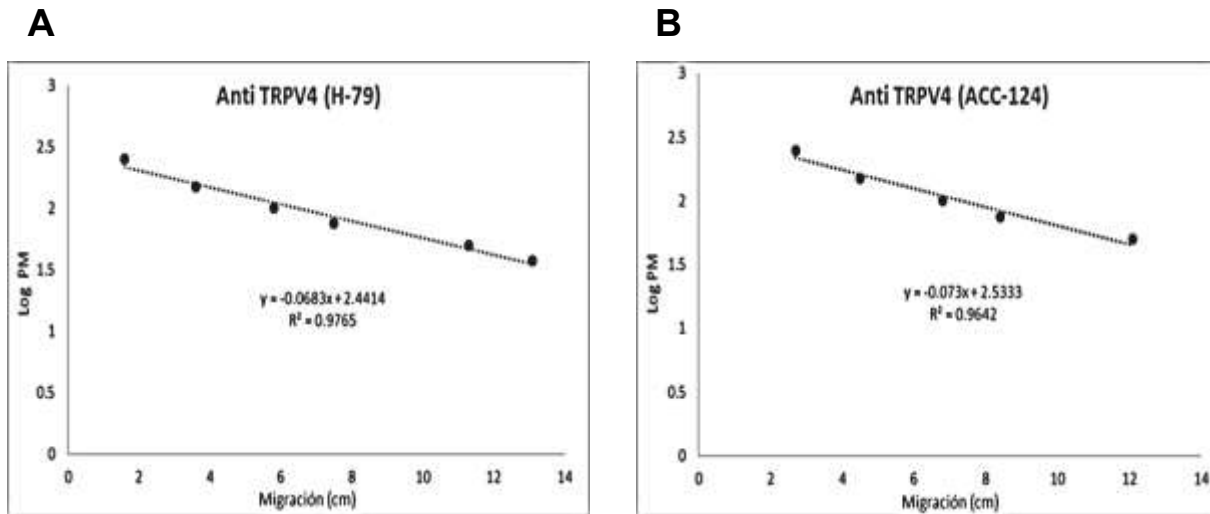
Para apoyar los datos antes mencionados se realizó una nueva detección del canal, esta vez empleando la técnica de Western Blot, para evaluar si la señal obtenida correspondía al peso molecular reportado para el canal (98 kDa). Para esto, se utilizó el mismo anticuerpo usado para la IF (anticuerpo que reconoce la región amino), además se utilizó un anticuerpo que reconoce la región extracelular cercana al poro del canal TRPV4 (ver Tabla 2 y Fig. 4). Para este ensayo se extrajeron proteínas totales de células en alta densidad y se determinó la expresión de una proteína con el peso molecular esperado. Se utilizó como control un extracto de proteína total de células de epitelio corneal RCE1-5T5, debido a que expresan TRPV4 (Martínez-Rendón, datos no publicados). Los resultados obtenidos mostraron que ambos anticuerpos reconocen en ambas líneas celulares, una banda de peso molecular mayor a 100 kDa (Fig. 7A, B). No obstante, ambos anticuerpos reconocen otras bandas correspondientes a proteínas de pesos moleculares menores al esperado, de las cuales no hay certeza de que se trate de una señal inespecífica, o de variantes por procesamiento alternativo, o bien, algún tipo de procesamiento del canal.



**Figura 7.** Expresión de TRPV4 en células MDCK y RCE-1 (lisados totales de células confluentes) **A.** Gel representativo de la señal de TRPV4 obtenida con el anticuerpo que reconoce la región amino (H-79), se observan tres bandas de pesos moleculares diferentes indicadas con las cabezas de flecha de color verde: >100 KDa (en ambas líneas celulares) (denominada Ia), >75 KDa (solo en MDCK)(denominada IIa), <50 KDa (ambas líneas) (denominada IIIa), n=7. **B.** Gel representativo de la señal de TRPV4 obtenida con el anticuerpo que reconoce la región extracelular, se observan tres bandas principalmente, todas en ambas líneas celulares: >100KDa (Ib), <75 KDa (IIb), y >75 KDa (IIIb). n=3. Si bien los anticuerpos muestran bandas extra además de las indicadas en las cabezas de flecha verdes, estas no se consideraron debido a que no fueron repetitivas.

Cada carril fue cargado con 30  $\mu$ g de proteína. PT: Proteína total.

Para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas por el WB, se realizó una medición de la distancia de la migración de los marcadores de peso molecular y de las bandas de interés. Se realizó una gráfica de la distancia de migración contra el logaritmo base diez el peso molecular del marcador (Fig. 8), con el fin de convertir los valores en una relación lineal, y así poder calcular el peso molecular de las bandas encontradas con ambos anticuerpos (Fig. 7). Los valores calculados para dichas bandas se presentan en la Tabla 3.



**Figura 8.** Modelos de regresión lineal utilizados para calcular el peso de las bandas encontradas en la figura 7. **A.** Gráfica correspondiente a los valores de migración y logaritmo base diez del peso molecular para el anticuerpo de la región amino (H-79) **B.** Misma gráfica para lo encontrado con el anticuerpo extracelular (ACC-124). En ambos casos se muestra la ecuación de la relación lineal, así como el coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

<b>A</b>			<b>B</b>		
BANDA	MIGRACIÓN (cm)	PESO MOLECULAR CALCULADO	BANDA	MIGRACIÓN (cm)	PESO MOLECULAR CALCULADO
Ia	5.2	<b>121.96</b>	Ib	6.1	<b>122.46</b>
IIa	7.1	<b>90.46</b>	IIb	9.4	<b>70.32</b>
IIIa	11.8	<b>43.19</b>	IIIb	11.7	<b>47.77</b>

**Tabla 3.** Pesos moleculares calculados de las bandas obtenidas mediante los ensayos de Western Blot (Fig. 7). **A.** Resultados de los pesos moleculares obtenidos con el anticuerpo que reconoce la región amino terminal intracelular.

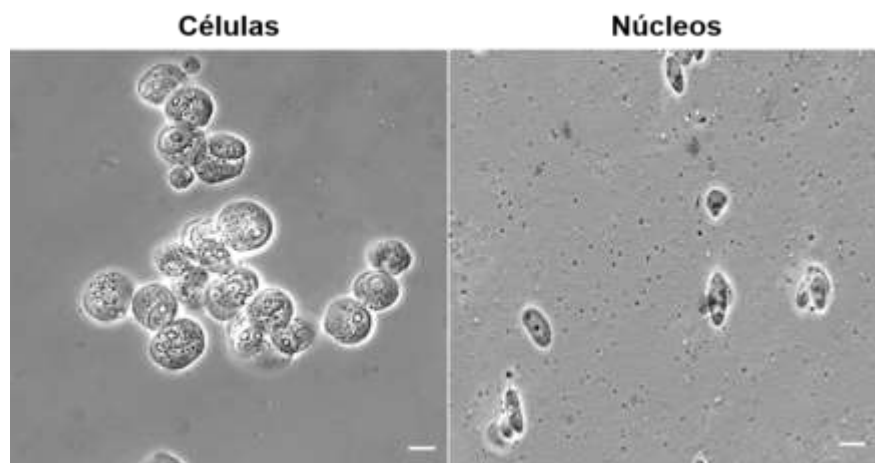
**B.** Pesos moleculares de las bandas detectadas utilizando el anticuerpo que reconoce la región extracelular.

Una vez calculados los pesos moleculares de las bandas detectadas en los ensayos de WB, se observó que en ambas líneas celulares, los anticuerpos evidencian una banda de peso molecular de aproximadamente 122 kDa. Aunque el peso teórico del canal TRPV4 en su forma completa es de aproximadamente 98 kDa, está reportado que esta proteína puede sufrir múltiples modificaciones postraduccionales, (e. g. Glicosilación), que pueden aumentar su peso molecular por lo cual, es probable que la banda de 122 kDa aquí reportada, corresponde al canal TRPV4 en su forma completa (i. e. sin cortes proteolíticos), con algún tipo de modificación postraducciona que produce un aumento en su peso molecular. No obstante, eso no descarta la posibilidad de que las otras bandas correspondan a isoformas del canal o cortes proteolíticos.

### 6.3. Extracción y análisis de proteínas nucleares

Con el fin de corroborar la observación de que el canal TRPV4 se expresa en el núcleo de las células MDCK y evaluar si corresponde al canal completo, se realizó una extracción diferencial de proteínas nucleares y citoplasmáticas, las cuales fueron analizadas mediante WB para evaluar la presencia del canal TRPV4 en cada fracción.

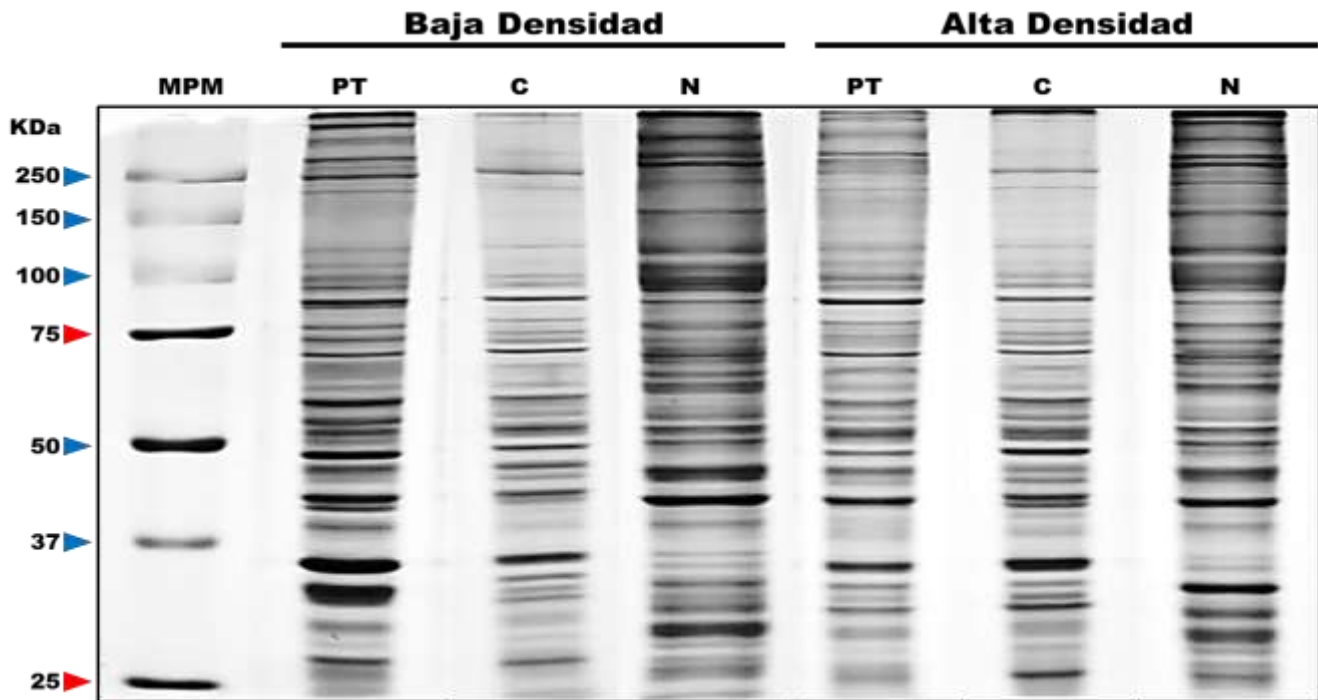
Se aislaron de núcleos de células MDCK crecidas en condiciones baja y alta densidad celular. Para confirmar que el fraccionamiento celular, las muestras de núcleos fueron evaluadas al microscopio (Fig. 9).



**Figura 9.** Aislamiento de núcleos de células MDCK. A la izquierda se observan células en suspensión antes de ser lisadas para obtener los núcleos. A la derecha se observan únicamente los núcleos celulares. Barra de escala: 50  $\mu$ m.



Una vez confirmado que los núcleos habían sido aislados, se obtuvieron las proteínas de ambas fracción es y estas fueron separadas mediante electroforesis. Posteriormente fueron teñidas con azul de Coomassie, para determinar la integridad de las proteínas y descartar degradación; además la tinción con este compuesto permitió observar que cada extracto mostraba un patrón diferente de bandas de proteínas. Dado que se trataba de diferentes fracciones celulares se esperaba que dicho patrón fuera diferente en cada muestra (Fig. 10).



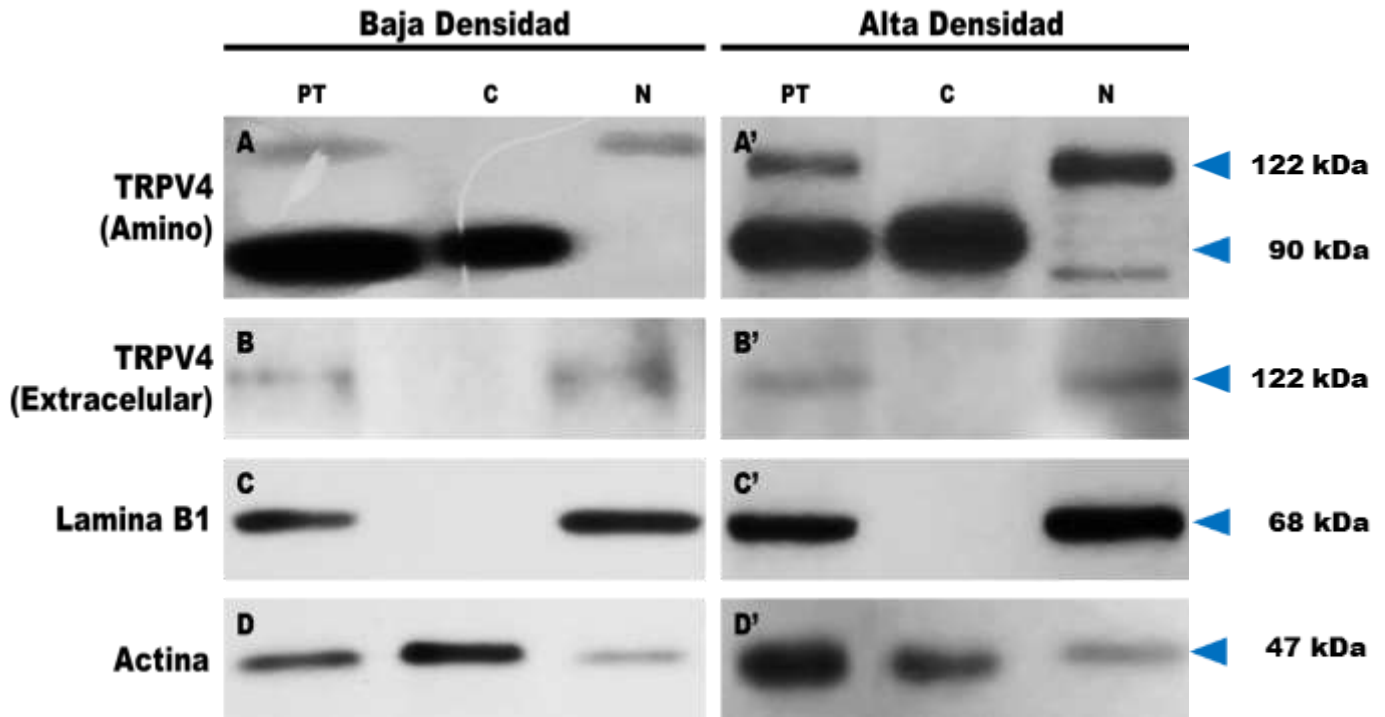
**Figura 10.** Tinción con azul de Coomassie en fracciones proteicas derivadas de células MDCK. **PT:** Proteína Total, **C:** Citoplasma, **N:** Núcleo. Cada carril fue cargado con 20  $\mu\text{g}$  de proteínas. MPM marcador de peso molecular, se indican los tamaños de las bandas correspondientes.

#### 6.4. Expresión nuclear del canal TRPV4

Una vez confirmada la integridad de las proteínas nucleares y citoplasmáticas, se realizó un análisis por WB para determinar la fracción proteica en la que se encontraba el canal TRPV4, así como para determinar su peso molecular.

Los resultados obtenidos demostraron que en condiciones de baja densidad celular el canal TRPV4 en su forma completa de 122 kDa (utilizando el anticuerpo H-79 que reconoce la región amino, Fig. 4), se expresa tanto en los lisados totales como en los nucleares. No obstante, esta banda no se observa en los extractos citoplasmáticos, sugiriendo que en estas condiciones el canal se localiza principalmente en el núcleo celular en donde TRPV4 se presenta en su forma completa. De manera interesante, se encontró otra banda de 90 kDa que solamente se observa en los lisados totales y citoplasmáticos, pero no en los nucleares (Fig. 11A). Notablemente, en condiciones de alta densidad celular se observan resultados muy similares, ya que el canal en su forma completa se encuentra en los lisados totales y nucleares pero no en la fracción citoplasmática; mientras que la banda de 90 kDa, se encuentra únicamente en los extractos totales y citoplasmáticos, pero no en los nucleares (Fig. 11A'). Por otro lado, al utilizar otro anticuerpo nombre (antiTRPV4 extracelular ACC-124, Fig. 4), se obtuvieron resultados similares, ya que la banda de 122 kDa solamente se encuentra en proteínas totales y nucleares, pero no en aquellas derivadas de citoplasma, en ambas condiciones de crecimiento empleadas (Fig. 11B y B').

Las membranas incubadas con el anticuerpo que reconoce la región amino terminal de TRPV4, fueron tratadas para eliminarles el anticuerpo, y posteriormente fue incubada con los anticuerpos usados como controles de pureza de las fracciones lamina B1 que se localiza en la envoltura nuclear y se espera encontrar solamente en las fracciones de proteínas nucleares, y actina para la fracción citoplasmática. El anticuerpo específico contra Lamina B1 únicamente indicó la presencia de una banda en 68 kDa, la cual, como era de esperarse, solamente se encuentra en lisados totales y nucleares (Fig. 11C y C'). Por otro lado, el anticuerpo específico para actina reconoció una banda con un peso de 47 kDa, la cual se detectó en todos los extractos utilizados pero en cantidades menores en la fracción nuclear (Fig. 11D y D'), lo cual no necesariamente indica que el extracto nuclear haya estado contaminado con proteínas citoplasmáticas (ver discusión).



**Figura 11.** Expresión de TRPV4 en células MDCK a baja densidad (izq.) y a alta densidad (der.). **A-A'**. Marcas generada por el anticuerpo anti-TRPV4 de la región amino (n=5) **B-B'**. Banda generada por el anticuerpo anti-TRPV4 extracelular (n=3). **C-C'**. Control de la fracción nuclear, Lamina B1. **D-D'**. Control de la fracción citoplasmática, actina. **PT:** Proteína Total, **C:** Citoplasma, **N:** Núcleo. Cada carril fue cargado con 30  $\mu$ g de proteínas.

## 7. DISCUSIÓN

El canal iónico TRPV4 es una proteína cuyas funciones son tan variadas como el tipo de células en donde se expresa, sin embargo, algo que generaliza las funciones de este canal, sea cual sea el tipo celular donde se encuentre, es la capacidad de percibir y responder a estímulos provenientes del exterior celular (e. g. temperatura, presión osmótica), razón por la cual, la localización del canal en la membrana plasmática, así como los mecanismos de regulación de esta son vitales. En el presente trabajo se estudió la posible localización nuclear del canal TRPV4 en células de epitelio renal (tipo celular que posee mayor expresión de esta proteína) crecidas en condiciones de alta y baja densidad celular.

En este trabajo se utilizó como modelo la línea celular MDCK, la cual deriva de epitelio renal de perro. Muchos son los trabajos que se han hecho con esta línea celular, principalmente aquellos dirigidos a entender la fisiología renal en cuanto a transporte de solutos (e.g. iones).

Se sabe que estas células tienen gran similitud, tanto morfológica como bioquímica, con las células del ducto colector cortical (Valentich, 1981). A medida que estas células proliferan, van entrando en un complejo proceso de diferenciación que incluye, entre otras cosas: formación de uniones celulares (e. g. estrechas, comunicantes, adherentes), polarización, formación de estructuras especializadas (e. g. microvellosidades, cilio primario), inclusive cuando son inyectadas en ratones atímicos son capaces de regenerar estructuras similares a túbulo renales (Saier, 1981). Todo esto nos indicó que, cuando las células se encuentran en condiciones de alta densidad (Fig. 5B), es probable que el proceso de diferenciación se encuentra en un estado avanzado, ya que es posible visualizar estructuras como el cilio primario (Martínez-Rendón, 2015, datos no publicados). Además que se ha postulado que uno de los detonantes del proceso de diferenciación en este tipo celular es el establecimiento de contactos celulares (Karts y Merker, 1988). Lo cual hace evidente que las células al estar en condiciones de baja densidad (Fig. 5A) poseen diferencias respecto a los perfiles de expresión de genes, síntesis y regulación de localización de proteínas, comparadas con células con un grado mayor de diferenciación (células en alta densidad celular, Fig. 5B).

Las observaciones obtenidas por nuestro grupo de trabajo sugerían la presencia de TRPV4 en el núcleo celular (Martínez-Rendón, 2015, datos no publicados), sin embargo, se pensó que probablemente se trataba de un artefacto de la técnica empleada o algún tipo de reacción inespecífica del anticuerpo usado. Por lo cual, el presente trabajo se enfocó en analizar si TRPV4 se localiza en el núcleo. Para ello se emplearon dos metodologías que permitieron corroborar dicha observación. Mediante inmunofluorescencia, se confirmó que en condiciones de baja densidad celular, TRPV4 se expresa principalmente en el núcleo (Fig. 6A, A'), mientras que en células confluentes, TRPV4 tiene una localización más heterogénea, la mayoría de las células no expresan el canal nuclear, sino disperso en el citoplasma (Fig. 6E), mientras que en algunas células aún hay presencia del canal en el núcleo (Fig. 6E'). Al contrario de lo esperado, no se observa que el canal esté ubicado exclusivamente en la membrana plasmática, sino en el citoplasma. Es probable que la cantidad de canal localizada en la membrana este en una cantidad tan baja que dificulte su visualización por este tipo de técnica. Se sabe que existe una acumulación de TRPV4 en el citoplasma que funciona como una especie de reservorio que se está en un proceso constante de inserción, endocitosis y degradación, el cual es controlado principalmente por ubiquitinización (Wegierski *et al.*, 2006).

Así mismo, la fosforilación de TRPV4 mediada por PKA (Mamenko, *et al.*, 2013), o WNK (Fu, *et al.*, 2006) promueve la inserción del canal en la membrana plasmática. De igual manera, los niveles de glicosilación regulan la inserción en la membrana plasmática (Xu, *et al.*, 2006).

A pesar de que no ha sido reportada la localización nuclear de este canal en ningún tipo de epitelio, Zhao y colaboradores (2012), reportaron que TRPV4 se localiza en el núcleo de cardiomiocitos ventriculares de rata, y aunque no lo mencionan, las células que evaluaron parecen encontrarse en condiciones de baja densidad (Zhao, *et al.*, 2012). Por otro lado, existen trabajos en donde se ha observado que TRPV4 se expresa en el núcleo de células derivadas de epitelio mamario (HC11) cuando estas se encuentran en condiciones de baja densidad celular, mientras que células en alta confluencia prácticamente no mostraban señal de TRPV4 en el núcleo es casi nula (Reiter, *et al.*, 2006), no obstante, a pesar de lo interesante de los resultados los autores no indagan en esta observación. Existe una variedad de trabajos en donde, al analizar la expresión de esta proteína por IF, se observa una clara localización nuclear, sin embargo en la inmensa mayoría los autores, ignoran dicho resultado, o bien indican que se trata de un artefacto. Lo anterior ha sido observado en células uroteliales de uretra y vejiga (Janssen, *et al.*, 2011), células de musculo liso arterial pulmonar (Martin, *et al.*, 2012), células de endotelio capilar cerebral (Hatano, *et al.*, 2013), por mencionar algunas. El aplicar sólo anticuerpo secundario, confirmó que la señal no se debe a reacción cruzada entre un antígeno celular y dicho anticuerpo (Fig. 6I).

Para confirmar la localización nuclear de TRPV4 se utilizó también la técnica de WB, aunque esta técnica también se basa en la detección inmunológica de antígenos, dado que las proteínas son separadas por electroforesis (i. e. por su peso molecular), se puede tener mayor seguridad que la señal obtenida corresponda a la proteína de interés debido a que se puede conocer el peso molecular. En primera instancia se empleó el mismo anticuerpo utilizado para realizar la IF (contra la región amino terminal), y proteínas obtenidas de lisados totales de células MDCK crecidas a alta densidad celular. Los resultados indicaron la presencia de una banda de peso molecular de 122 kDa (Fig. 7, Tabla 3). Si bien esa señal no corresponde al peso teórico establecido para el canal que es de 98 kDa, se sabe que TRPV4 es capaz de sufrir modificaciones postraduccionales, entre las que destacan las *N*-glicosilaciones las cuales son capaces de aumentar el peso molecular de una proteína debido a la adición enzimática de

polisacáridos (Voolstra y Huber, 2014), una de ellas ocurre en el residuo de asparagina en la posición 651 (N<sup>651</sup>) (Fig. 4), dicha modificación es capaz de controlar la cantidad de proteína que es transportada a la membrana plasmática, ya que la mutación de dicho residuo propicia que aumenten los niveles de canal en la membrana (Xu, *et al.*, 2006). Por lo cual, es muy probable que dicha banda corresponda al canal TRPV4 haya sufrido modificaciones postraduccionales que hayan aumentado su peso molecular.

Por otro lado, se obtuvieron dos bandas de pesos moleculares menores, una de 90 kDa y la otra de 47 kDa. Si bien, podría pensarse que dichas bandas son inespecíficas, su detección es muy reproducible en especial aquella correspondiente a 90 kDa. Hacen falta ensayos para determinar la naturaleza de dichas bandas. Existen reportes que evidencian la presencia de al menos dos bandas de pesos moleculares similares a los aquí encontrados, tal es el caso de Liedke y Friedman (2003), quienes analizaron la expresión de TRPV4 en extractos proteicos de riñón de ratón, y encontraron la presencia de una banda de 107 kDa, y otra más pequeña en 75 kDa; Janssen y colaboradores (2011) encontraron la expresión de proteínas con pesos de 100 y 75 kDa en lisados de riñón y vejiga de rata; a su vez Zhao y colaboradores (2012), indicaron la presencia de una banda de 70 y otra de 90 kDa en lisados de miocitos ventriculares de rata. De nueva cuenta, algunos de estos autores indican que esto se trata de una señal inespecífica, sin embargo, otros consideramos que es probable que dichas bandas de peso molecular menor correspondan a variantes producidas por procesamiento alternativo. Se sabe que el canal TRPV4 (al menos en humanos) presenta cinco diferentes variantes de procesamiento alternativo de su RNA mensajero denominadas TRPV4 A (la cual corresponde a la proteína de tamaño completo y peso molecular de 98 kDa), TRPV4 B (la cual carece del exón 7, cuyo PM es de 91 kDa), TRPV4 C (carece del exón 5, y pesa 93 kDa), TRPV4 D (la cual posee una pequeña delección dentro del exón 2, con peso de 95 kDa), y TRPV4 E (que le faltan los exones 5 y 7 del residuo 237 al 284, y del 384 al 444 y cuyo peso es de 86 kDa) (Arniges, *et al.*, 2006).

Dado que en este trabajo se analizaron por WB lisados de células de epitelio renal de perro (MDCK) y tomando en cuenta que los datos del tamaño de TRPV4 y sus isoformas disponibles en la literatura han sido reportados en tejidos y especies diferentes es posible que las

modificaciones postraduccionales y/o variantes (de estar presentes) de TRPV4 sean tanto especie como tejido-específicas.

Dado que el anticuerpo que reconoce la región del extremo amino terminal fue utilizado para los ensayos de IF y de WB, cabía la posibilidad de que la señal se tratase de una reacción cruzada con otro antígeno diferente, por lo cual se empleó un anticuerpo distinto para confirmar los resultados (por WB). Este otro anticuerpo reconoce una secuencia localizada en el asa extracelular que conecta los dominios transmembranales S5 y S6 (Tabla 2, Fig. 4). Los resultados indicaron la presencia de una banda con un peso molecular de 122 kDa (Fig. 7B), confirmando que el canal TRPV4 se expresa en las células MDCK en su forma completa, y que sufre algún tipo de modificación que aumenta su peso molecular en aproximadamente 24 kDa.

Una vez corroborada la expresión de TRPV4 en células MDCK, se realizó una extracción diferencial de proteínas nucleares y citoplásmicas con el fin de confirmar si TRPV4 se localiza en el núcleo de las células MDCK. Dado que TRPV4 es una proteína que posee seis segmentos transmembranales (Fig. 2 y 4), en un principio se consideró que podría sufrir algún tipo de corte proteolítico y uno de los fragmentos era el que migraba hacia el núcleo, como el canal TRPM7 (Krapivinsky, *et al.*, 2014), o el canal Cav1.2 (Gómez-Ospina, *et al.*, 2006). Sin embargo, ambos anticuerpos evidenciaron la presencia de una banda correspondiente a un peso de 122 kDa (Fig. 11) en lisados totales y nucleares, confirmando la presencia de TRPV4 en el núcleo de las células MDCK, que corresponde al canal en su forma completa. Se sabe que lo mismo ocurre con otros canales que presentan una localización nuclear, como el canal BK, (Li, *et al.*, 2014), o el InsP<sub>3</sub>R (Leite, *et al.*, 2003). Dado el carácter hidrofóbico de TRPV4, es factible suponer que TRPV4 se localiza en la membrana nuclear, no obstante se requiere de mayor investigación para demostrar esto.

De manera sorprendente, el análisis de WB de las fracciones subcelulares indicó que en el citoplasma el canal no está en su forma completa (Fig. 11), aun cuando los análisis por IF revelaron la presencia de TRPV4 en el núcleo y citoplasma (Fig.6). Estas observaciones no implican que no exista TRPV4 en el citoplasma (o membrana plasmática) de las células, ya que cabe la posibilidad de que la cantidad contenida en este sea tan pequeña que la técnica es incapaz de detectarla. Existe un reporte realizado en células MDCK en donde se comprobó

por diferentes técnicas (incluyendo electrofisiología) la presencia del canal BK, no obstante, al intentar identificar la proteína por métodos inmunológicos (IF, WB) no se observa señal alguna de la presencia de este (García-Villegas, *et al.*, 2007). Otra posibilidad, es que existan dos variantes de la proteína, una con peso de 122 kDa que se localiza principalmente en el núcleo celular (y una cantidad mínima en la membrana), y otra con peso de 90 kDa que se localiza en el citoplasma (y posiblemente en la membrana). Y a medida que las células van proliferando, las más jóvenes ya no presentan TRPV4 nuclear (122 kDa), y solamente poseen la variante de menor peso molecular (90 kDa). Se ha reportado que TRPV4 (en humanos) existen al menos cinco variantes por procesamiento alternativo de pesos moleculares diferentes, y algunas de ellas son retenidas en el RE (Arniges, *et al.*, 2006), este mecanismo se ha propuesto como control de la cantidad de proteína que llega a la membrana. Hay reportes de otras variantes del canal con deleciones en la región carboxilo terminal, las cuales también son retenidas parcial o totalmente en el RE (Becker, *et al.*, 2008). Hasta ahora no existen reportes de variantes por procesamiento alternativo en *C. familiaris*, sin embargo, resultados *in silico* obtenidos por nuestro grupo indican la presencia de variantes más cortas de TRPV4 en esta especie, inclusive algunas de ellas de peso molecular semejante al aquí reportado (~83 kDa). Así mismo, se ha encontrado la presencia *in silico* de señales de localización nuclear, las cuales son señales que están presentes en proteínas nucleares que son transportadas hacia este orgánulo mediante proteínas acarreadoras llamadas importinas. No obstante, se requiere que estos resultados sean validados experimentalmente (Rodríguez-Ramírez, 2015, datos no publicados).

Para confirmar los resultados se emplearon anticuerpos como control de pureza de las fracciones nuclear y citoplasmática. Como se esperaba, el anticuerpo específico contra Lamina B1, proteína de 68 kDa que es esencial para la formación, mantenimiento y funcionamiento de la envoltura nuclear (Wilson y Berk, 2010), solamente indicó la presencia de la proteína en lisados totales y nucleares pero no en citoplasmáticos (Fig. 11 C, C'), indicando que la fracción nuclear contiene solamente proteínas derivadas de este organelo. A su vez, el anticuerpo específico contra actina, proteína de 47 kDa localizada principalmente en el citoesqueleto (Domínguez y Holmes, 2011); a diferencia de lo que se esperaba, se detectó la presencia de actina en los extractos nucleares (además de los totales y citoplasmáticos) aunque un mucho



menor cantidad. Esto no necesariamente indica que haya contaminación de proteínas del citoplasma en los extractos nucleares, ya que la actina también se localiza en el núcleo, en donde participa en procesos como transcripción, remodelación de la cromatina, transporte de RNAm y proteínas (Kumeta, *et al.*, 2012). No obstante, la posibilidad de que hubiese existido contaminación de proteínas citoplasmáticas en el extracto celular es poca, dado que la señal de TRPV4 generada por el anticuerpo de la región amino indica una abundante expresión de la banda de peso molecular de 90 kDa, de existir contaminación, probablemente dicha marca también hubiera sido encontrada en los extractos nucleares, (Fig. 11), No obstante, para descartar totalmente la presencia o ausencia de contaminación, es necesario utilizar otro anticuerpo que reconozca una proteína que sea exclusivamente citoplasmática y no nuclear.

En resumen, los resultados obtenidos confirman que el canal iónico TRPV4 se expresa en las células MDCK en ambas condiciones de confluencia empleadas, y que además, esta proteína tiene una localización nuclear, tanto en células en condiciones de baja densidad como en aquellas a densidad alta celular. Adicionalmente se encontró que en células MDCK existen dos especies del canal, una que corresponde al canal completo, con un peso molecular de 122 kDa, el cual posiblemente ha sufrido una glicosilación; cuya localización principal es en el núcleo, y otra de menor tamaño (90 kDa) que se localiza principalmente en el citoplasma celular. Por otra parte, los resultados sugieren que a medida que las células proliferan y se diferencian, TRPV4 es translocado fuera del núcleo, o bien que en las más jóvenes el canal ya no se dirige hacia este organelo. Estos resultados son los primeros que confirman la presencia de esta proteína en el núcleo de células de epitelio renal, abriendo la posibilidad a desarrollar futuros proyectos para determinar la función de TRPV4 en el núcleo.

## 8. CONCLUSIONES

- Las células de epitelio renal canino (MDCK) expresan al canal iónico TRPV4 tanto en condiciones de baja como de alta densidad celular.
- TRPV4 se localiza en el núcleo de células MDCK, cultivadas en ambas condiciones.
- El peso molecular de TRPV4 nuclear (122 kDa) corresponde al canal completo, y es probable que presente algún tipo de modificación postraducciona.
- La mayoría de las células a baja densidad expresan el canal en el núcleo, a su vez, más de 90% de las células a alta densidad presentan una localización citoplasmática, mientras que el 10% restante aun presenta la localización nuclear.
- Es posible que las células MDCK expresen dos variantes diferentes del canal, una con peso molecular de 122 kDa, la cual se localiza principalmente en el núcleo y otra de un peso de 90 kDa, que presenta una localización citoplasmática.

## 9. REFERENCIAS

- Alessandri-Haber, U.A, Dina, O.A., Joseph, E. K., Reiching, D., y Levine, J. D. 2006. A transient receptor potential vanilloid 4-dependiente mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *J. Neurosci.* 26, 3864-3874.
- Arniges M., Fernández-Fernández J. M., Albrecht N., Schaefer, M., y Valverde M. A. 2006. Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J.Biol.Chem.* 281:1580-1586.
- Becker, D., Muller, M., Leuner, K., y Jendrach, M., 2008. The C-terminal domain of TRPV4 is essential for plasma membrane localization. *Mol. Membr. Biol.* 25, 139e151.
- Bootman M. D., Fearnley C., Smyrniak I., MacDonald F., y Roderick H.L. 2009. An update on nuclear calcium signaling. *J. Cell Sci.* 122, 2337-2350.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.* 1: 248-254
- Carey y Smale, 2000. Transcriptional regulation in eukaryotes, USA, Ed. CSHL, p. 88-90
- Caterina M. J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., y Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389, 816-824.
- Clapham D. E. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426(6966):517-24.
- Cohen D. M. 2005. TRPV4 and the mammalian kidney. *Pflugers Arch.* 451(1):168-75.
- Cosens D. J. y Manning A. 1966. Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature.* 224, 285 – 287.
- Desai B. N., y Clapham. D. 2005. TRP channels and mice deficient in TRP channels. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.* 451: 11–18.
- Domínguez R., y Holmes K. C. 2011. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.* 40:169-86.
- Dong X. P., Wang X. y Xu H. 2010. TRP channels of intracellular membranes. *J. Neurochem.* 113(2):313-28.
- Don-Salu-Hewage A., Chan S. Y., McAndrews K. M., Chetram M. A, Dawson M. R., Bethea D. A., y Hinton C. V. 2013. Cysteine (C)-X-C Receptor 4 Undergoes Transportin 1-Dependent Nuclear Localization and Remains Functional at the Nucleus of Metastatic Prostate Cancer Cells. *PlosOne.* 8(2): e57194.

- Everaerts W., Nilius B. y Owsianik G. 2010. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: From structure to disease. *Progress in Bioph and Mol Biol.* 103: 2-17.
- Ezak M. y Ferkey D. M. 2011. A Functional Nuclear Localization Sequence in the *C. elegans* TRPV Channel OCR-2. *PlosOne.* 6(9): e25047.
- Fu, Y., Subramanya A., Rozansky D., y Cohen D.M. 2006. WNK kinases influence TRPV4 channel function and localization. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290(6):F1305-14.
- García-Villegas R., Escamilla J., Fiorentino R., y Cereijido M. 2007. Potassium channels lost during harvesting of epithelial cells are restored with a kinetics that depends on channel species. *Cell Physiol Biochem.* 20(5):405-16.
- Gómez-Ospina N., Tsuruta F., Barreto-Chang O., Hu L., y Dolmetsch R. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell.* 2006;127(3):591-606. doi:10.1016/j.cell.2006.10.017.
- Güler A. D., Lee H. Iida T., Shimizu I. Tominaga M. y Caterina M. 2002. Heat-evoked activation of the ion channel TRPV4. *J. Neurosci.* 22(15):6408-14.
- Hartmannsgruber V., Heyken W. T., Kacik M., Kaistha A., Grgic I., Harteneck C., Liedtke W., Hoyer, J., y Kohler R. 2007. Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression. *PlosOne.* 2, e827.
- Hatano N., Suzuki H., Itoh Y., y Muraki K. 2013. TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells. *Life Sci.* 12; 92(4-5):317-24.
- Heller S., y O'Neil R. G. 2007. Molecular Mechanisms of TRPV4 Gating. En: Liedtke W. B, Heller S., (editores). *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.* Florida, EUA. CRC Press. Capítulo 8. Consultado el 13 de enero de 2015, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5255/?report=reader#!po=8.82353>.
- Hille, B. 2001. *Ion channels of excitable membranes.* 3a ed. Sinauer Associates. Massachusetts, EUA. p. 2-22.
- Janssen D. A., Hoenderop J. G., Jansen K. C., Kemp A. W., Heesakkers J. P., y Schalken J. A. 2011. The mechanoreceptor TRPV4 is localized in adherence junctions of the human bladder urothelium: a morphological study. *J. Urol.* 186(3):1121-7.
- Johns S. J. 2013. TOPO2, Transmembrane protein display software. Disponible en: <http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO2/>
- Kahn-Kirby A. H. y Bargmann C.I. 2006. TRP channels in *C. elegans*. *Annu. Rev Physiol.* 68:719-36.

- Kaleta M. y Palmer C. 2011. TRP Channels in Yeast. En: Islam S. (editor). Transient Receptor Potential Channels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Volume 704, pp 315-321.
- Karts W. y Merker H. J.: 1988. The differentiation behavior of MDCK cells grown on matrix components and in collagen gels. *Cell Differ.* 22(3):211-24.
- Kottgen M., Buchholz B., Garcia-Gonzalez M. A., Kotsis F., Fu X., Doerken M., Boehlke C., Steffl D., Tauber R., Wegierski T., Nitschke R., Suzuki M., Kramer-Zucker A., Germino G.G., Watnick T., Prenen J., Nilius B., Kuehn E. W., y Walz G. 2008. TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *J. Cell Biol.* 182:437-447.
- Krapivinsky G., Krapivinsky L., Manasian Y., y Clapham D. E. 2014. The TRPM7 chanzyme is cleaved to release a chromatin-modifying kinase. *Cell.* 157(5):1061-72.
- Kumeta M., Yoshimura S. H., Hejna J., y Takeyasu K. 2012. Nucleocytoplasmic Shuttling of Cytoskeletal Proteins: Molecular Mechanism and Biological Significance. *Int J Cell Biol.* Vol. 2012, Article ID 494902, 12 pages.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685
- Leite M. F., Thrower M. C., Echevarria W., Koulen P., Hirata K., Bennett A. M., Ehrlich B. E., y Nathanson M. H. 2003. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(5): 2975–2980.
- Li B., Jie W., Huang L., Wei P., Li S. Luo Z., Friedman A. K., Meredith A. L., Han M. H., Zhu X. H., y Gao T. M. 2014. Nuclear BK channels regulate gene expression via the control of nuclear calcium signaling. *Nat. Neurosci.* 17(12):1841.
- Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., Hudspeth, A. J., Friedman, J. M., y Heller, S., 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103, 525e535.
- Liedtke W. y Friedman J. M.: 2003. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100(23): 13698–13703.
- Ma, X., Qiu, S., Luo, J., Ma, Y., Ngai, C. Y., Shen, B., Wong, C. O., Huang, Y., y Yao, X. 2010. Functional role of vanilloid transient receptor potential 4-canonical transient receptor potential 1 complex in flow-induced Ca<sup>2+</sup> influx. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30:851-858.
- Mamenko, M., Zaika O. L., Boukelmoune, N., Berrout J., O'Neil R., y Pochynyuk O. 2013. Discrete control of TRPV4 channel function in the distal nephron by protein kinases A and C. *J. Biol. Chem.* 288: (28), 20306-20314.

- Martin E., Dahan D., Cardouat G., Gillibert-Duplantier J., Marthan R., Savineau J. P., y Ducret T. 2012. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 464(3):261-72.
- Masuyama R., Vriens J., Voets T., Karashima Y., Owsianik G., Vennekens R. Lieben L., Torrekens S., Moermans K., Vanden Bosch A., Bouillon R., Nilius B., y Carmeliet G. 2008. TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell Metab.* 8, 257-265
- Mizuno, A., Matsumoto, N., Imai, M., y Suzuki, M., 2003. Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am. J. Physiol.* 285, C96eC101.
- Montell C. 2005. The TRP superfamily of ion channels. *Sci. STKE.* 272:re3.
- Montell C. y Rubin G. M. 1989. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* 2(4):1313-23.
- Moore C., Cevikbas F., Pasolli H. A, Chen Y., Kong W., Kempkes C., Parekh P., Lee S. H., Kontchou N., Yeh I., Jokerste N. M., Fuchs E., Steinhoff M., y Liedtke W. B.. 2013. UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 110(38): E3225–E3234.
- Nilius B. y T. Voets. 2013. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO reports.* 14(2):152-163.
- Nilius y Mahieu, 2006. A Road Map for TR(I)Ps. *Mol. Cell.* 22, 297–307
- Nilius B., Owsianik G, Voets T. y Peters J.A. 2007. Transient Receptor Potential ion channels in disease. *Physiol. Rev.* 87(1):165-217.
- Pedersen S. F., Owsianik G. y Nilius B. 2005. TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* 38(3-4):233-52.
- Plant, T .D., y Strotmann, R., 2007. Trpv4. *Handb Exp. Pharmacol.*, 189e205.
- Quesada I., Rovira J. M., Martin F., Roche E., Nadal A., y Soria B. 2002. Nuclear KATP channels trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> transients that modulate nuclear function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99(14):9544-9.
- Ramsey I., Delling M., y Clapham, D. 2005. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev Physiol.* 68 (2): 619-47.
- Reiter B., Kraft R., Günzel D., Zeissig S., Schulzke J.D., Fromm M. y Harteneck C. 2006. TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB J.* 20(11):1802-12.

- Resende R. R., Andrade L. M., Oliveira A. G., Guimarães E. S., Guatimosim S., y Leite M. F. 2013. Nucleoplasmic calcium signaling and cell proliferation: calcium signaling in the nucleus. *Cell Comm. Signal.* 11(1):14.
- Saier Jr. M. H. 1981. Growth and differentiated properties of a kidney epithelial cell line (MDCK). *Am J Physiol.* 240(3):C106-9.
- Shindl R., y Romanin C. 2007. Assembly domains in TRP channels. *Bioch. Soc. Transactions.* 35(1): 84-85.
- Stowers L., Holy T. E, Mesiter M., Dulac C., y Koentges G. 2002. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science.* 95(5559):1493-500.
- Valentich J. D: 1981. Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule. *Ann N Y Acad Sci.* 372:384-405.
- Vay L., Gu C., y McNaughton P. A. 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* 165(4):787-801.
- Vennekens, R., Owsianik, G., y Nilius, B., 2008. Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr. Pharm. Des.* 14 18e31.
- Voolstra O., y Huber A. 2014. Post-Translational Modifications of TRP Channels. *Cells.* 2014. 3(2): 258–287.
- Wegierski T., Hill K., Schaefer M., y Walz G. 2006. The HECT ubiquitin ligase AIP4 regulates the cell surface expression of select TRP channels. *EMBO J.* 25, 5659e5669.
- Wegierski T., Lewandrowski U., Muller B., Sickmann A., y Walz G. 2009. Tyrosine phosphorylation modulates the activity of TRPV4 in response to defined stimuli. *J Biol Chem.* 284, 2923e2933.
- Wilson K. L., y Berk J. M. 2010. The nuclear envelope at a glance. *J Cell Sci.* 15;123(Pt 12):1973-8.
- Wu L. J., Sweey T. B., y Clapham D. E. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 62(3):381-404.
- Wu, L., Gao, X., Brown, R. C., Heller, S., y O'Neil, R. G., 2007. Dual role of the TRPV4 channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. (Renal).* 293, F1699eF1713
- Zhao, H., Tian, W., Yoshida, K., Roullet, J. B., y Cohen, D. M., 2003. Regulation of a TRP channel by tyrosine phosphorylation: src family kinase-dependent phosphorylation of

TRPV4 on Y253 mediates its response to hypotonic stress. *J. Biol. Chem.* 278, 11520e11527.

Xu, H., Fu, Y., Tian, W., y Cohen, D. M., 2006. Glycosylation of the osmoresponsive transient receptor potential channel TRPV4 on Asn-651 influences membrane trafficking. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 290, F1103eF1109

Zhang Y., Hoon M. A., Chandrashekar J., Mueller K. L., Cook B., Wu D., Zuker C., y Ryba N.J. 2003. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell.* 112(3):293-301.

Zhao Y., H. Huang, Y. Jiang, H. Wei, P. Liu, W. Wang y W. Niu. 2012. Unusual localization and translocation of TRPV4 protein in cultured ventricular myocytes of the neonatal rat. *Eur. J. of Histochem.* 56:e32.



## 10. ANEXOS

### Anexo 1: Reactivos, Soluciones y Buffers empleados

#### PBS 1x (1 L)

- 9.6 g de PBS (Bio Rad, USA)
- 900 mL de ddH<sub>2</sub>O
- Ajustar el pH a 7.4
- Aforar a un litro con ddH<sub>2</sub>O y filtrar

#### Buffer de Lisis A

- 10 mM de Tris (Bio Rad, USA) HCl pH 8
- 30 mM de NaCl (Merck, USA)
- 0.2 % de NP-40 (Igepal, Sigma, USA)
- 10 mM EDTA (Sigma, USA) pH 8
- Inhibidores de proteasas al 1x (Complete Mini, Roche, Alemania)

#### Buffer de Lisis B

- 10 mM de Tris (Bio Rad, USA) HCl pH 7.4
- 10 mM de NaCl (Merck, USA)
- 0.5 % de NP-40 (Igepal, Sigma, USA)
- 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Merck, USA)
- Inhibidores de proteasas al 1x (Complete Mini, Roche, Alemania)

#### Soluciones para electroforesis y WB

##### Acrilamida/Bisacrilamida 30:0.8% (100 mL)

- 30 g de acrilamida (Bio Rad, USA)
- 0.8 g de bisacrilamida (Bio Rad, USA)
- Ajustar el volumen a 100 mL y filtrar la solución por 0.22 µm

##### Buffer PAGE Tris.Cl pH 6.8 (4x)

- 0.5 M de Tris, ajustar pH a 6.8
- 0.4% de SDS (Bio Rad, USA)
- Filtrar la solución por 0.22 µm

##### Buffer PAGE Tris.Cl pH 8.8 (4x)

- 1.5 M de Tris, ajustar pH a 8.8
- 0.4% de SDS
- Filtrar la solución por 0.22 µm

##### Buffer de Corrida (5X)

- 0.125 M de Tris base
- 0.96 M de Glicina (Bio Rad, USA)
- 0.5% de SDS
- No ajustar el pH

##### Buffer de Electrotransferencia

- 25 mM de Tris base
- 200 mM de Glicina
- 15% de Metanol (J. T. Baker, USA)
- 0.5% de SDS
- No ajustar el pH

##### Gel concentrador (3.9%)

- 0.65 mL de acrilamida/bis 30/0.8%
- 1.25 de Tris.Cl pH 6.8
- 3.05 mL de ddH<sub>2</sub>O
- 25 µl de TEMED (Research Organics, USA)
- 5 µl de persulfato de amonio al 10% (Bio Rad, USA)

### **Gel separador (8%)**

- 4 mL de acrilamida/bis 30/0.8%
- 3.75 de 4x Tris.Cl pH 8.8
- 7.25 mL de ddH<sub>2</sub>O
- 50 µl de TEMED
- 10 µl de persulfato de amonio al 10%

### **Buffer de carga 6x**

- 7 mL de 4x Tris.Cl pH 6.8
- 3 mL de glicerol (Concentración final de 30 %) (Research Organics, USA)
- 1 g (10%) de SDS
- 0.93 g (0.6 M) de Ditioneitol (Life Technologies, USA)
- 1.2 mg de Azul de Bromofenol (Sigma, USA)

### **Buffer para lavados TBS-T 10x**

- 0.1 M de Tris Base
- 1.5 M de NaCl
- 0.05% de Tween 20 (Sigma, USA)
- Usar al 1x

### **Soluciones para IF**

#### **Paraformaldehído al 4%**

- 4% de Paraformaldehído (Bio Rad, USA) disuelto en PBS 1x

#### **Triton X-100 al 0.05%**

- 0.05% de Triton X-100 (Sigma, USA), disuelto en PBS 1x

#### **Tween 20 al 0.05%**

- 0.05% de Tween 20 disuelto en PBS 1x

### **Solución de Bloqueo**

- 10% de leche en polvo baja en grasa disuelta en TBS-T 1x

### **Solución de Stripping**

- 1% de Ditioneitol de Sodio disuelto en TBS-T 1x

### **Azul de Coomasie**

- 50% de ddH<sub>2</sub>O
- 40% de metanol
- 10% de ácido acético (Research Organics, USA)
- 0.25% de Coomasie Brilliant Blue G-250 (Bio Rad, USA)
- Para desteñir geles se utiliza la misma solución pero sin azul de Coomasie