



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CAMBIOS INDUCIDOS POR ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO EN LA CORRIENTE
UNITARIA DEL CANAL TRPV1**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
JESÚS ALDAIR CANUL SÁNCHEZ**

**TUTOR PRINCIPAL
DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
[Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM](#)**

**DRA. MYRIAN VELASCO TORRES
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., noviembre, 2018



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.

Este trabajo de investigación fue realizado como parte del proyecto “Caracterización de regiones que sufren cambios conformacionales ante agonistas en el canal TRPV1”, financiado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM (Clave IN2007-17) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número CB-238399. Asimismo, contó con el soporte del proyecto No. 77 “Nuevos paradigmas en el estudio del alosterismo de proteínas de membrana” del Programa de Investigación en Fronteras de la Ciencia (IFC-2015-1/77).

Agradezco a CONACyT por la beca con número de asignación 450733, recibida para la realización de estudios de nivel Maestría.

Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por ofrecerme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en un entorno ideal para el aprendizaje y la adquisición de habilidades. Por poner a disposición de los mexicanos una educación pública gratuita y de calidad.

A la **Dra. Tamara Rosenbaum**, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo durante estos dos años y por impulsar a todos los miembros del laboratorio a hacer ciencia de calidad.

Al Jurado de tesis; **Dr. Diego González Halphen**, **Dr. Alejandro Fernández Velasco**, **Dra. Stéphanie Thebault**, **Dr. Carlos Muñoz Garay** y **Dra. Marcia Hiriart Urdanivia**, por sus aportaciones a este trabajo. Sus comentarios y sugerencias contribuyeron a mejorar cada aspecto de este escrito.

A la **Dra. Myrian Velasco Torres** y a la **Dra. Nina Pastor Colón**, miembros del Comité Tutor, por sus sugerencias y aportaciones a este proyecto, que fueron muy valiosas durante estos dos años.

Al **Dr. León Islas**, por compartir conmigo una parte de sus conocimientos, que fueron de mucha utilidad en este proyecto.

A la **Biól. Alejandra Llorente**, por su apoyo técnico durante la realización de este proyecto. Pero, sobre todo, por su apoyo y consejo durante todo este tiempo.

A la **Dra. Sara Morales**, por sus comentarios y sugerencias. Asimismo, por compartir conmigo muchas de sus experiencias como investigadora.

A **Félix Sierra**, por su apoyo y consejo técnico para la realización de este proyecto.

Dedicatoria

A **mi familia**, por su apoyo para concluir satisfactoriamente esta etapa de mi vida, ya que, a pesar de las dificultades y cambios que enfrentamos durante este tiempo, siempre los sentí cerca de mí. En especial a mis padres, **Sandra y David**, por procurar siempre que nada me hiciera falta.

A **Jessica Torres**, por su apoyo, consejo y acompañamiento. Por estar conmigo los tiempos buenos, pero sobre todo por apoyarme y escucharme durante los momentos difíciles. Unas cuantas líneas no serían suficientes para agradecerte por todo lo que has compartido conmigo a lo largo de nuestro tiempo juntos.

A **mis compañeros de laboratorio**, por todos los momentos que compartimos durante la realización de nuestros proyectos individuales y conjuntos. Sé que todos nos llevamos grandes aprendizajes y confío en que pronto los veré cumpliendo todas sus metas.

A **Ricardo Contreras, Estefania Gallareta y Adriana Hernández**. Durante el tiempo que compartimos juntos en esta nueva aventura pudimos afianzar nuestros lazos y estrechar nuestra amistad. Fueron un apoyo muy importante para seguir adelante y espero haber ayudado en algo a que ustedes también cumplieran parte de sus objetivos.

Índice

Resumen

1. Antecedentes	1
1.1. Superfamilia de canales iónicos TRP	1
1.2. El canal TRPV1	2
1.3. Estructura del canal TRPV1	3
1.4. El canal TRPV1 es un receptor polimodal	4
1.4.1. El canal TRPV1 es activado por la capsaicina	5
1.5. El ácido lisofosfatídico (LPA): un regulador de la actividad del TRPV1	8
2. Hipótesis	12
3. Objetivos	12
4. Métodos	13
4.1. Mantenimiento de la línea celular HEK293 y transfección transitoria	13
4.2. Mutagénesis dirigida	13
4.3. Preparación de soluciones	14
4.4. Electrofisiología	14
4.5. Registros de corrientes macroscópicas	15
4.6. Registros de canales unitarios y análisis cinético	16
5. Resultados y discusión	19
5.1. Activación del canal rTRPV1-WT ante diferentes agonistas	19
5.2. La respuesta obtenida al aplicar LPA a nivel macroscópico es mayor en comparación a la observada con capsaicina	21
5.3. El aumento en la corriente observada al aplicar LPA en corrientes macroscópicas también se observa a nivel microscópico	22
5.4. El aumento en las corrientes unitarias promovidas por LPA se observa tanto a potenciales positivos como negativos	25
5.5. Análisis cinético de las corrientes unitarias del TRPV1 en respuesta a diferentes agonistas	28
5.6. Efectos sobre el potencial local de membrana parecen no ser	32

importantes para el aumento inducido por LPA en las corrientes unitarias

5.7. La sustitución de la lisina en la posición 710 del canal por un aspartato elimina el aumento en la corriente unitaria promovido por LPA	34
6. Conclusiones	37
7. Referencias	38

Abreviaturas

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ARD:** Dominio de repeticiones de anquirina
- ATX:** Autotaxina
- BrP-LPA:** 1-bromo-3-(S)-hidroxi-4-(palmitoiloxi)butil fosfonato
- BSA:** Albúmina sérica bovina
- Cryo-EM:** Criomicroscopía electrónica
- DAG:** Diacilglicerol
- DGK:** Diacilglicerol cinasa
- DkTx:** Toxina doble nudo
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- G:** Conductancia
- G_{max}:** Conductancia máxima
- GFP:** Proteína verde fluorescente
- GPCRs:** Receptores acoplados a proteínas G
- HEK293:** Células embrionarias de riñón humano 293
- HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
- i*:** Corriente unitaria
- I:** Corriente macroscópica
- k:** Constante de Boltzmann
- kDa:** Kilodaltons
- K_d:** Constante de disociación
- LPA:** Ácido lisofosfatídico
- LPC:** Lisofosfatidilcolina
- NMDG:** N-metil-D-glucamina
- PA:** Ácido fosfatídico
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

PLA: Fosfolipasa A

PLD: Fosfolipasa D

Po: Probabilidad de apertura

R: Resistencia

rTRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 de ratón

TPA: tetrapentilamonio

TRP: Receptor de potencial transitorio

TRPV1: Receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1

V: Voltaje

VMD: Visual Molecular Dynamics

VSDs: Dominios sensores de voltaje

WT: proteína silvestre

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1. Estructura del canal TRPV1	4
Figura 2. Estructura química de la capsaicina	5
Figura 3. Acoplamiento molecular entre capsaicina y TRPV1	7
Figura 4. Estructura química del ácido lisofosfatídico	8
Figura 5. Vías de producción de LPA	9
Figura 6. La caja TRP y K710 en el canal TRPV1	11
Figura 7. El poro de TRPV1 en diferentes condiciones	11
Figura 8. Protocolos de voltaje empleados	18
Figura 9. Curva de respuesta a dosis de capsaicina	19
Figura 10. Curva de respuesta a dosis de LPA y BrP-LPA	20
Figura 11. Corrientes macroscópicas a +60 mV con capsaicina y LPA	21
Figura 12. Corrientes unitarias a +60 mV con capsaicina, LPA y BrP-LPA	23
Figura 13. Corrientes unitarias a +60 mV con capsaicina 4 μ M en concomitancia con BSA 1 % y LPC 2.5 μ M	25
Tabla 1. Corrientes unitarias a diferentes voltajes	26
Figura 14. Respuesta a LPA y capsaicina obtenida para canales unitarios a diferentes voltajes	27
Figura 15. Análisis cinético de canales unitarios	30
Tabla 2. Valores empleados para el ajuste de análisis cinético de canales unitarios	31
Figura 16. Curvas G-V en presencia de LPA y capsaicina	33
Figura 17. Corrientes unitarias para la mutante K710D	35

Resumen

La superfamilia de canales iónicos TRP puede encontrarse en una amplia variedad de organismos y tejidos, en los cuales desarrollan funciones de naturaleza diversa. Al ser canales polimodales, estas proteínas pueden responder a diversos estímulos físicos y químicos.

El canal TRPV1 es el miembro más ampliamente estudiado de esta superfamilia de proteínas. Una gran cantidad de información estructural y funcional de este receptor ha surgido en los últimos años y ha puesto de manifiesto su importancia en diversos procesos fisiológicos, así como en la aparición de diferentes enfermedades.

La capsaicina, compuesto presente en los chiles y pimientos, es el agonista por excelencia del canal TRPV1. El mecanismo por medio del cual promueve la activación de esta proteína es objeto de amplio estudio por distintos grupos en todo el mundo.

Asimismo, se ha descrito la activación de este canal por otro tipo de estímulos, entre los que puede encontrarse una gran variedad de compuestos de naturaleza lipídica. Aunque clásicamente se había propuesto que la activación de canales iónicos por este tipo de compuestos ocurría a través de mecanismos indirectos, recientemente se desarrollaron trabajos pioneros que indicaron que ciertos tipos de canales, pertenecientes a la superfamilia TRP, pueden interactuar y ser activados directamente por lisofosfolípidos, como el ácido lisofosfatídico (LPA), en el caso de TRPV1, o la lisofosfatidilcolina (LPC) para el canal TRPV4.

En este trabajo, se estudió la activación del canal TRPV1 por LPA y se describió, por primera vez, que la corriente unitaria promovida por este compuesto es diferente a la evocada en presencia de capsaicina, poniendo de manifiesto que existen estados conformacionales diferentes para ambas condiciones. Se propone que el efecto observado se debe a la interacción electrostática del LPA con un residuo cargado positivamente, ubicado en la región de la caja TRP del canal.

Asimismo, se evaluó la contribución de efectos asociados a la integración del lípido en la membrana plasmática, posiblemente cambiando la forma o rigidez de la misma, o bien, modificando el microambiente electrostático en las cercanías del canal. Los resultados obtenidos en este sentido indicaron que estos efectos no se encuentran presentes en nuestro sistema.

Dada la relevancia fisiológica del canal TRPV1 tanto en condiciones normales como en patológicas, los resultados obtenidos podrían resultar un avance importante en la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas que aprovechen las características biofísicas de este canal.

1. Antecedentes

Es indispensable que los organismos posean la capacidad de detectar los estímulos del medio ambiente y responder a ellos eficientemente para lograr su supervivencia. Con este fin, a través de la evolución, se han desarrollado una serie de adaptaciones que les permiten detectar señales del medio ambiente (Islas, 2008).

Así, los organismos poseen receptores especializados que detectan dichas señales, un caso son los canales iónicos, proteínas de membrana que permiten el flujo de iones a favor de un gradiente electroquímico, generando señales que favorecen la comunicación entre las células eléctricamente excitables. De modo general, los canales iónicos son complejos proteicos constituidos por dominios estructurales que les confieren su función y que regulan las particularidades de la misma. En las últimas décadas, diversos estudios de las relaciones que existen entre la estructura y la función de los canales iónicos han generado conocimiento acerca de las regiones de estas proteínas que responden a cambios en el voltaje, a la unión de ciertos ligandos, así como a otros estímulos químicos y físicos (Clapham, 2003).

1.1. Superfamilia de canales iónicos TRP

Una familia de canales iónicos, descrita hace relativamente poco, es la de los Receptores de Potencial Transitorio (TRP). Estos conforman una superfamilia de proteínas que responden a una gran variedad de estímulos de naturaleza física y química, como el microambiente lipídico, el pH, temperatura o ligandos específicos, entre otros (Ramsey *et al.*, 2006). Su contribución es importante para una gran cantidad de procesos fisiológicos que incluye a la función sensorial (Grazia y Ferrer, 2017).

Estas proteínas son canales iónicos localizados en la membrana plasmática, no selectivos y que principalmente permiten el ingreso de Ca^{2+} a la célula. Tras su activación, los canales de esta superfamilia pueden contribuir a la generación de potenciales de acción en células típicamente excitables, mientras que en otro tipo

de células pueden interactuar con otros canales iónicos e influir en procesos como la transcripción y migración, entre otros (Grazia y Ferrer, 2017).

En términos históricos, la identificación de corrientes asociadas a un canal iónico de esta superfamilia se llevó a cabo en el modelo de *Drosophila* en 1969, mientras que la identificación molecular del primer gen *trp* se realizó en 1975. Actualmente, se reconoce que existen 6 subfamilias de canales TRP que se expresan principalmente en mamíferos, con una familia adicional que se encuentra solamente en invertebrados y otras especies (Rosasco y Gordon, 2017).

A pesar de que algunos miembros de la superfamilia TRP muestran una débil dependencia del voltaje, se considera que estos canales son miembros de la superfamilia de canales acoplados a voltaje, junto con los canales de K^+ , Na^+ y Ca^+ , con los que comparten ciertas características estructurales (Rosasco y Gordon, 2017). En este sentido, cabe destacar que la estructura de los canales TRP fue inicialmente predicha con base en estudios filogenéticos y de predicción de segmentos transmembranales. Más recientemente, se logró la obtención de información estructural con ensayos de cristalografía de rayos X, así como de mutagénesis dirigida combinada con ensayos funcionales y de criomicroscopía electrónica (Grazia y Ferrer, 2017).

1.2. El canal TRPV1

El TRPV1 (vaniloide 1) fue el primer miembro de la superfamilia TRP en ser caracterizado y se considera que es el más ampliamente estudiado. Es un canal catiónico no selectivo y polimodal, que actúa como un integrador de diversos estímulos nocivos en los tejidos en los que se expresa. Se encuentra principalmente en neuronas sensoriales periféricas, aunque también se expresa en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y del hipocampo, músculo liso, queratinocitos en la epidermis, células renales y macrófagos, entre otros (Tominaga *et al.*, 1998; Caterina *et al.*, 1997; Nilius, 2007; Sanchez *et al.*, 2004).

El canal se relaciona con diferentes patologías como el asma, el dolor asociado a diversos tipos de cáncer y artritis, entre otros. Asimismo, por el papel que

desempeña en la nocicepción, el canal TRPV1 resulta un blanco terapéutico idóneo para el control de algunos procesos que involucran dolor (Szallasi *et al.*, 2006).

1.3. Estructura del canal TRPV1

Como los demás canales iónicos, el canal TRPV1 presenta una estrecha relación entre estructura y función. De este modo, el estudio de determinadas regiones de su estructura es especialmente importante para comprender los mecanismos que median su activación en los diferentes tejidos donde el canal se expresa y es funcional.

Estructuralmente, el canal TRPV1 es un homotetrámero de aproximadamente 95 kDa de peso molecular, donde cada subunidad está compuesta de seis segmentos transmembranales (S1-S6), con sus extremos terminales amino y carboxilo situados hacia el lado intracelular (**Figura 1**). Seis repeticiones de anquirina, que muestran una notable conservación estructural entre los diferentes miembros de la superfamilia TRP, conforman el dominio N terminal (Liao *et al.*, 2013; Islas, 2017). Por su parte, los primeros cuatro segmentos transmembranales (S1-S4) se organizan estructuralmente de un modo similar a los segmentos análogos que conforman los dominios sensores de voltaje (VSDs) en los canales ligados a voltaje (Moiseenkova-Bell *et al.*, 2008; Clapham, 2003; Ramsey *et al.*, 2006; Palovcak *et al.*, 2015).

Por su parte, los segmentos S5 y S6 de cada subunidad, así como el asa que los conecta, se encuentran situados hacia el centro del canal y forman la región del poro y el filtro de selectividad (Clapham, 2003; Ramsey *et al.*, 2006).

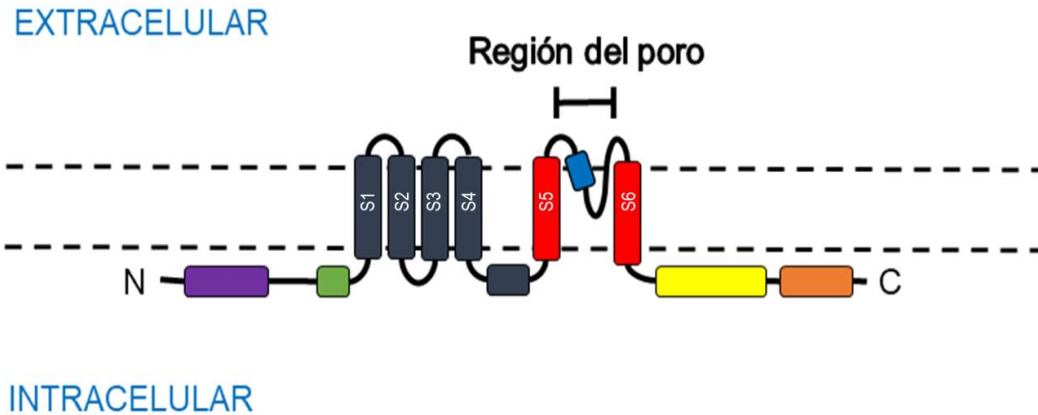


Figura 1. Representación esquemática de una subunidad del canal TRPV1 y de los dominios estructurales que lo conforman. Se observan seis cruces transmembranales y la ubicación intracelular de los extremos amino (púrpura) y carboxilo (naranja). El extremo amino (N, rectángulo púrpura) se conforma de seis repeticiones de anquirina (ARD) y se conecta al primer cruce transmembranal a través de una hélice denominada pre-S1 (verde). La región del poro se conforma por las hélices transmembranales S5 y S6 (rojo) y el asa que los une (azul).

1.4. El canal TRPV1 es un receptor polimodal

La activación de TRPV1 puede ser mediada por diversos estímulos, entre los que se encuentran temperaturas cercanas a los 42 °C, condiciones extracelulares de acidez y la unión de diversos ligandos. Tales agonistas pueden ser de naturaleza exógena, como la resiniferatoxina producida por los cactus del género *Euphorbia*, la capsaicina de los chiles del género *Capsicum* o la alicina del ajo y la cebolla (género *Allium*); o bien, pueden ser compuestos endógenos como el diacilglicerol, la anandamida e incluso otros lípidos bioactivos como el ácido lisofosfatídico (LPA), compuesto que ha sido relacionado con la generación y mantenimiento de procesos de dolor crónico, dolor neuropático, entre otros (Tominaga *et al.*, 1998; Caterina *et al.*, 1997; Szallasi *et al.*, 2006).

En cuanto a los lípidos, se ha propuesto que estos tienen una función importante en la activación de los canales TRP y en la modulación de su actividad, tanto en condiciones fisiológicas como en las patológicas. Se considera que estos efectos pueden llevarse a cabo principalmente por diferentes vías, que incluyen:

interacción directa de alguna región del canal iónico con estos compuestos, modulación de las propiedades fisicoquímicas de la membrana o a través de vías de señalización que regulan la actividad del canal (Grazia y Ferrer, 2017).

1.4.1. El canal TRPV1 es activado por la capsaicina

La capsaicina ((*E*)-*N*-[(4-Hidroxi-3-metoxifenil)metil]-8-metilnon-6-enamida) es el capsaicinoide más abundante en las plantas del género *Capsicum*, familia *Solanaceae*, además, es el compuesto responsable de la sensación de irritación que se tiene al consumir los frutos de éstas. Al mismo tiempo, es uno de los agonistas más ampliamente estudiados del canal TRPV1, pudiendo evocar la activación completa del canal con probabilidades de apertura (P_o) cercanas al máximo, de forma dependiente de la concentración (Yang y Zheng, 2017; Yang, *et al.*, 2015).

De modo similar a otros capsaicinoides, la capsaicina posee una cabeza conformada por un grupo vaniloide, un grupo amida que forma el cuello y una cadena de ácido graso como cola (**Figura 2**; Yang y Zheng, 2017)

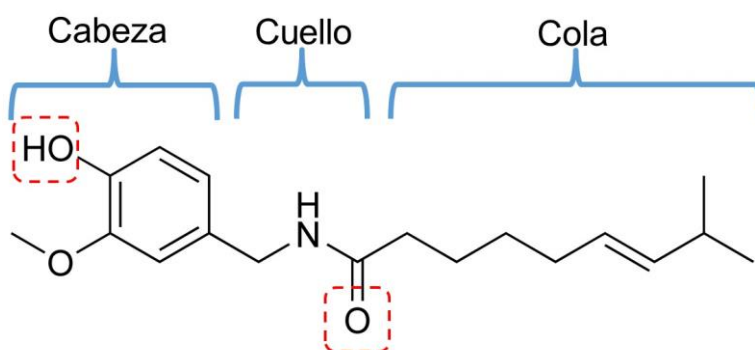


Figura 2. Estructura química de la capsaicina. Se señalan las diferentes partes que la conforman y que son similares a las observadas en otros capsaicinoides: la cabeza vaniloide, el cuello amida y la cola hidrofóbica. Se remarcan con recuadros rojos los átomos que se sugiere interactúan con el canal TRPV1 por medio de puentes de hidrógeno.

Tales características estructurales permiten a la capsaicina interactuar con el canal TRPV1 y activarlo eficientemente. El mecanismo por medio del cual este lípido puede activar al canal se ha estudiado ampliamente mediante diversas aproximaciones experimentales. En primer lugar, la construcción de quimeras que contenían los segmentos transmembranales S2 a S4 del canal TRPV1 de rata sobre un templado del canal de pollo (insensible a capsaicina) confirió a este último la capacidad de responder a este lípido, lo que sugirió que estas regiones son claves en este proceso. Asimismo, estos estudios permitieron sugerir que los residuos Y511 y S512 estaban implicados en el reconocimiento de la capsaicina (Jordt y Julius, 2002).

Posteriormente, ensayos de mutagénesis realizados sobre el canal TRPV1 de conejo permitieron comprobar que los segmentos transmembranales S3 y S4 efectivamente son importantes para la activación del canal por capsaicina. Más aún, pusieron de manifiesto la importancia del residuo T550 en el proceso, junto con los residuos propuestos previamente (Gavva, *et al.*, 2004).

Esta información funcional fue confirmada con la aparición de las estructuras criomicroscópicas del canal, que inequívocamente colocaron a los segmentos transmembranales S3 y S4, así como el asa que une a S4 y S5, como las estructuras que conforman el sitio de unión a capsaicina (Cao, *et al.*, 2013).

Asimismo, en la estructura de TRPV1 unida a capsaicina se identificó una densidad electrónica dentro de este sitio de unión (**Figura 3**), que de hecho correspondería a este compuesto. De modo interesante, tal densidad se observa también en el estado apo (no unido a ligando), lo que sugeriría que la capsaicina compite con un lípido que se encuentra ocupando el sitio de unión durante el proceso de activación del canal (Cao, *et al.*, 2013).

Otra observación importante radica en el hecho de que el asa que une a S4 con S5 sufre un movimiento durante la activación del canal, que involucra que esta parte se aleje de la región del poro. Se sugiere que este movimiento podría llevar a la apertura del poro, como ocurre en canales ligados a voltaje, en los cuales el

movimiento del asa acopla al sensor de voltaje S4 con la activación de la compuerta S6 (Lu, *et al.*, 2002; Yarov-Yarovoy, *et al.* 2012).

Posteriormente, la utilización de técnicas computacionales permitió predecir que la capsaicina adquiere una configuración de “cola arriba, cabeza abajo” en el sitio vaniloide, con la región de la cola mostrando gran flexibilidad y adoptando diferentes conformaciones. Asimismo, puso de manifiesto que la unión de capsaicina a TRPV1 ocurre a través de interacciones de van de Waals y dos puentes de hidrógenos entre átomos de la cabeza y el cuello con T550 y E570, respectivamente. (**Figura 3**, Yang, *et al.*, 2015).

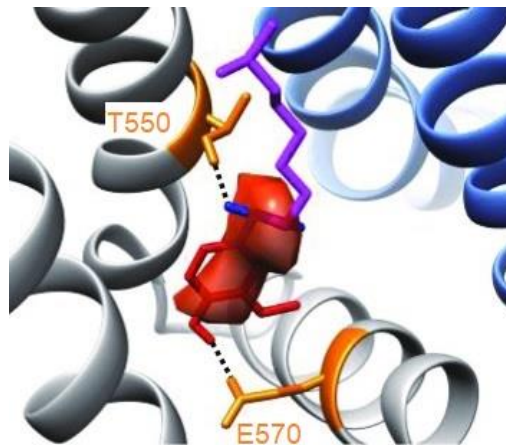


Figura 3. Acoplamiento molecular de la capsaicina y TRPV1. La cabeza, cuello y cola se encuentran coloreadas en rojo, azul y magenta, respectivamente. Se muestran en naranja los dos residuos que interactúan con la capsaicina a través de puentes de hidrógeno. La densidad electrónica encontrada en los experimentos de cryo-EM que corresponde a la capsaicina se muestra en color rojo, superpuesta a su estructura. Se observa que la región de la cola no se encuentra resuelta en este modelo estructural, posiblemente debido a su elevada flexibilidad. Modificado de Yang, *et al.*, 2015.

Mientras que la capsaicina y la resiniferatoxina interactúan con el sitio de unión a vaniloideos en el canal, ya descrito arriba, otros agonistas lo pueden hacer con otros sitios. Lo interesante es que, diferentes agentes que interactúan con regiones distintas en la estructura del canal desembocan en el mismo evento: la

apertura del poro del canal ante su activación. Es importante mencionar que una de las preguntas generales, aún prevalecientes en el campo de estudio de la biofísica de canales iónicos, es: ¿cómo es que se acopla la unión de un ligando a la apertura de los canales iónicos? En particular, esta pregunta busca definir cuáles son los cambios conformacionales que se producen en respuesta al ligando para generar la activación de los canales iónicos.

1.5. El ácido lisofosfatídico (LPA): un regulador de la actividad del TRPV1

El LPA posee una gran diversidad de funciones biológicas y se ha relacionado con diferentes patologías que incluyen algunos tipos de cáncer y dolor neuropático (Schumacher *et al.*, 1979; Liu *et al.*, 2009; Inoue *et al.*, 2004). Este lisofosfolípido contiene un esqueleto de glicerol, un grupo fosfato y una cadena de ácido graso saturada o insaturada (**Figura 4**, van Corven *et al.*, 1989).

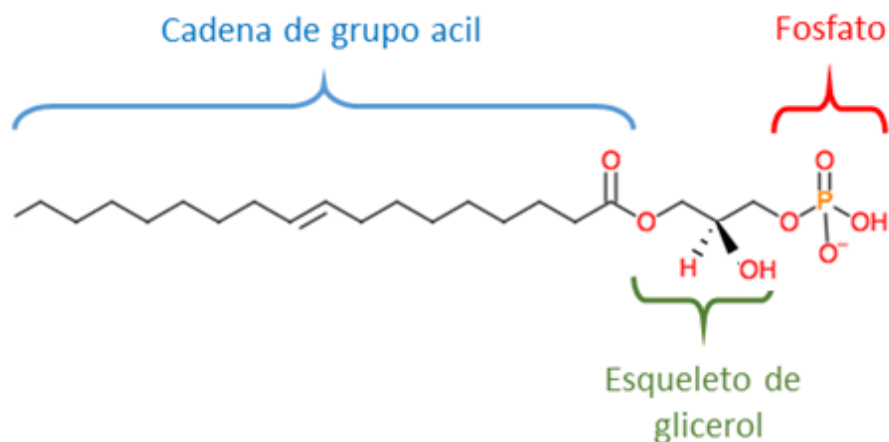


Figura 4. Estructura química del ácido lisofosfatídico (LPA). Se señalan las diferentes partes que la conforman: la cabeza fosfato cargada negativamente, el esqueleto de glicerol y la cadena de grupo acil, que puede ser saturada o insaturada y poseer diferentes longitudes. La estructura mostrada corresponde al LPA 18:1 (1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato).

Existen diversas vías para la síntesis de LPA (**Figura 5**). En la primera de ellas, que ocurre a nivel intracelular, el ácido fosfatídico (PA) pierde una cadena de

ácido graso para producir LPA, en una reacción catalizada por las fosfolipasas A1 o A2 (PLA1 o PLA2, por sus siglas en inglés). El PA usado puede provenir de diversas fuentes, como la ruptura de fosfolípidos de membrana (por ejemplo, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) por la fosfolipasa D, o bien, por acción de la diacilglicerol cinasa sobre un diglicérido (Okudaira *et al.*, 2010; Pagès *et al.*, 2001).

Por su parte, la vía extracelular involucra dos pasos: primero, la desacilación de fosfolípidos por PLA1 o PLA2, y posteriormente la ruptura de los lisofosfolípidos producidos, en una reacción catalizada por la lisofosfolipasa D, también denominada autotaxina o ATX (Hernández-Araiza *et al.*, 2018; Tokumura *et al.*, 2002; Umezu-Goto *et al.*, 2002).

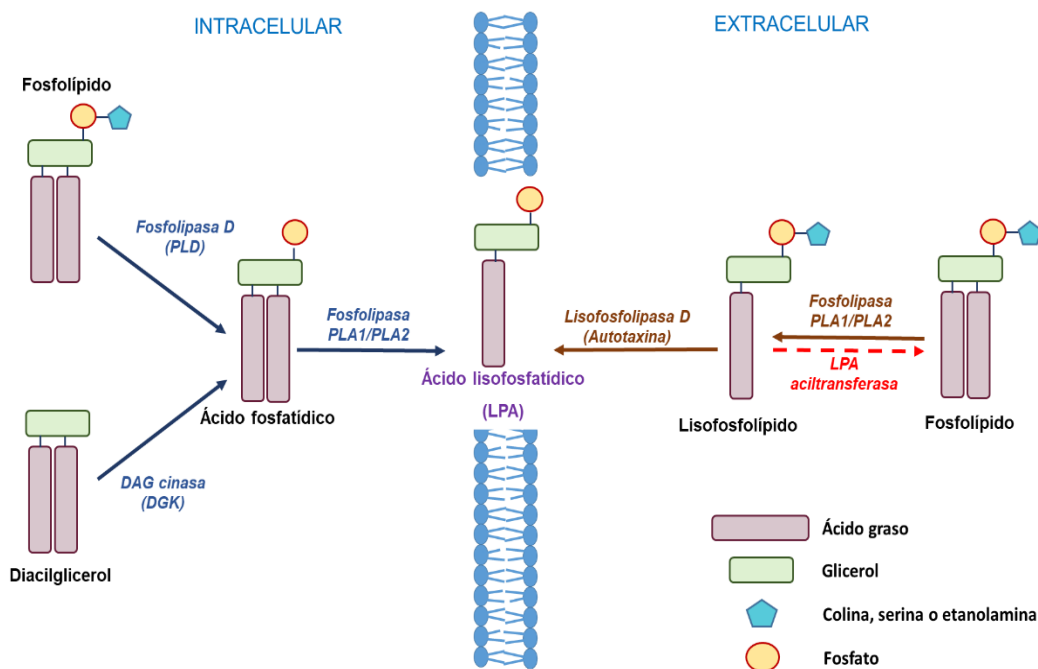


Figura 5. El LPA puede provenir de diversas fuentes intra o extracelulares, que involucran la actividad de diversas enzimas.

Recientemente, el LPA ha emergido como un regulador importante de la actividad de diferentes canales iónicos, que incluyen, a canales activados por voltaje y activados por ligando, entre otros (Stirling *et al.*, 2009; Jans *et al.*, 2013). Tal

regulación puede llevarse a cabo tanto por interacción directa del LPA con estos canales como por mecanismos indirectos, que en algunos casos pueden incluir la actividad de al menos uno de los seis receptores específicos acoplados a proteínas G (GPCRs), denominados LPA₁₋₆ (Yung *et al.*, 2014).

Recientemente en nuestro laboratorio se describió por primera vez la activación directa del canal TRPV1 por el LPA y también se estableció la asociación de este proceso con la aparición de dolor (Nieto-Posadas *et al.*, 2012).

También, se dilucidaron algunas características necesarias para que éste y otros lípidos bioactivos de estructura química similar promuevan la activación del canal TRPV1 y se propuso un mecanismo para que esta se lleve a cabo. Lo que propuso nuestro grupo es que las características estructurales del LPA (longitud específica, ángulo de torsión y presencia de un grupo cargado) permiten que se genere un cambio conformacional en la región de la caja TRP del canal (**Figura 6**), promoviendo su desplazamiento y un giro de modo paralelo a la membrana, lo que, en último término, resulta en la apertura del canal y el flujo de iones. Esta hipótesis se basa también en que en las estructuras de criomicroscopía obtenidas por Cao, *et al.* se observa que la caja TRP se desplaza y gira con respecto a la membrana cuando se comparan las estructuras en ausencia y en presencia de diferentes agonistas (Cao, *et al.* 2013).

La obtención de diversas estructuras criomicroscópicas unidas a diferentes agonistas como la capsaicina o las toxinas doble nudo (DkTx) y resiniferatoxina (RTX) soporta la idea de que podrían existir diferentes estados conformacionales del canal TRPV1 en función del agonista empleado (**Figura 7**, Cao *et al.*, 2013).

Una observación preliminar del estudio realizado en nuestro laboratorio y, que constituye uno de los antecedentes del presente trabajo (Nieto-Posadas *et al.*, 2012; Morales-Lázaro, *et al.*, 2014), es que el LPA parece promover un aumento en la conductancia del canal en comparación con la capsaicina. Así, resulta interesante estudiar si este fenómeno se encuentra relacionado con cambios conformacionales diferentes en la estructura del canal inducidos por diferentes agonistas.

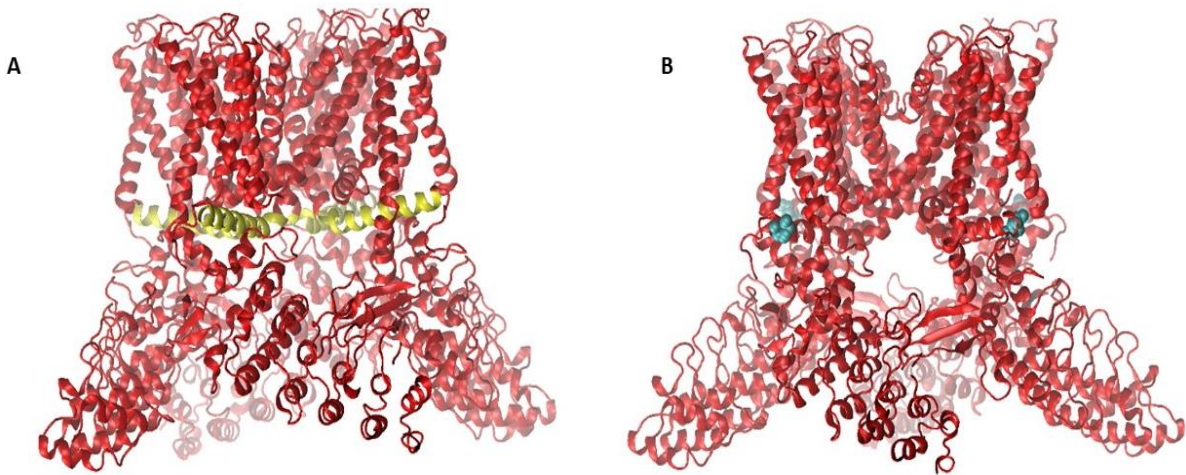


Figura 6. La caja TRP, mostrada en color amarillo (A), es una región importante para la modulación alostérica del canal TRPV1, que se encuentra altamente conservada entre los miembros de la superfamilia de canales iónicos TRP. Esta región también contiene sitios importantes para la activación del canal, como la lisina ubicada en la posición 710 (esferas azules en panel B), sitio de unión para el LPA. Representaciones de PBD ID: 3J5P, (estructura a resolución de 3.4 Å) creadas con el programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (Liao *et al.*, 2013; Humphrey *et al.*, 1996).

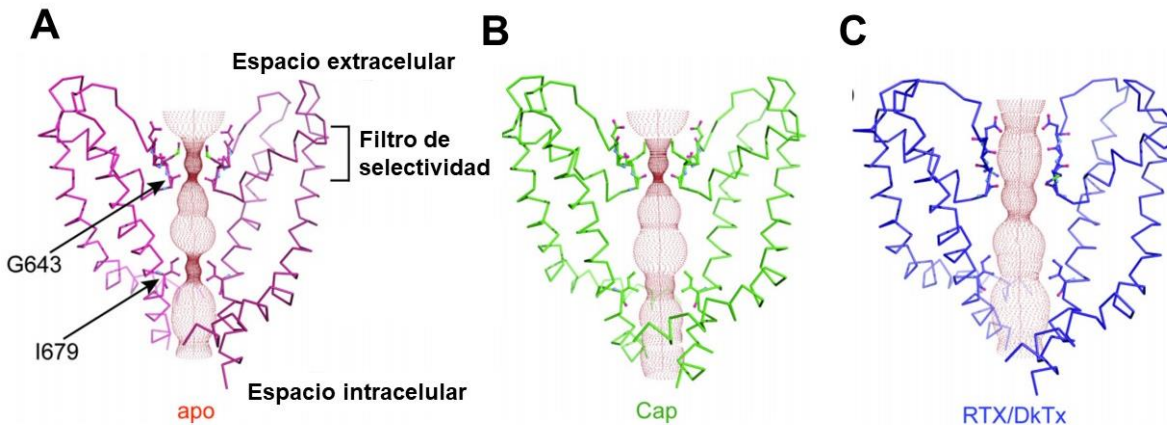


Figura 7. El canal TRPV1 posee diferentes estados conformacionales en ausencia (A) o presencia de diferentes agonistas, como la capsaicina (B) o las toxinas (C) resiniferatoxina (RTX) y doble nudo (DkTx). Modificado de Cao, *et al.*, 2013.

2. Hipótesis

La aplicación de LPA produce un aumento en la magnitud de la corriente unitaria del canal TRPV1, a través de un cambio conformacional distinto al que produce la capsaicina.

3. Objetivos

- 3.1.** Describir el comportamiento a nivel macroscópico de la activación del canal TRPV1 ante capsaicina y LPA.
- 3.2.** Determinar, por medio de experimentos de canal unitario, si existen diferencias entre la activación del canal TRPV1 al aplicar capsaicina o LPA.
- 3.3.** Estudiar cambios en la respuesta del canal TRPV1 en función del voltaje y el agonista a nivel de la corriente unitaria.
- 3.4.** Determinar si en la mutante TRPV1-K710D, que no se activa con LPA; existe un aumento en la corriente unitaria al aplicar LPA.

4. Métodos.

4.1. Mantenimiento de la línea celular HEK293 y transfección transitoria.

Para los ensayos electrofisiológicos se utilizaron células embrionarias de riñón humano (HEK293, American Type Culture Collection), las cuales fueron mantenidas en condiciones estándar de cultivo celular (37 °C, 5 % CO₂) en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (HyClone) y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco).

Las siembras celulares se realizaron cada tres días, utilizando 0.25 % de tripsina-EDTA. Las células se colocaban en vidrios tratados con poli-D-lisina para su adhesión. Un día después, las células fueron cotransfectadas con dos plásmidos, correspondientes al ADN que codifica para el canal rTRPV1-WT o rTRPV1-K710D, y para la proteína verde fluorescente (pIRES-GFP). Esta última proteína funcionó como un control de éxito de la transfección. Se empleó el reactivo JetPei (Polyplus transfection), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, para llevar a cabo la cotransfección.

Para la obtención de las curvas de respuesta a dosis de los diferentes agonistas (capsaicina, BrP-LPA y LPA) se emplearon células transfectadas con 1 µg del ADN del canal rTRPV1-WT.

Por su parte, para los registros electrofisiológicos de canal unitario (“single channels”) se emplearon células transfectadas con 10 ó 25 ng de ADN de rTRPV1-WT o con 500 ng de ADN de rTRPV1-K710D. En todos los casos, la cantidad de ADN del reportero empleado (GFP) fue de 400 ng.

4.2. Mutagénesis dirigida

Se empleó la construcción TRPV1-K710D, mutante en la cual la lisina ubicada en la posición 710 de la secuencia del canal fue cambiada por un aspartato. Tal posición corresponde al sitio de unión del LPA, como se reportó previamente (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). Esta mutación puntual fue generada previamente en el laboratorio sobre el canal rTRPV1 silvestre (rTRPV1-WT). El cDNA correspondiente se introdujo en el plásmido rTRPV1-pCDNA3 utilizando la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dos pasos descrita previamente (Rosenbaum y Gordon, 2002).

4.3. Preparación de soluciones

Se prepararon soluciones madre de los diferentes agonistas a emplear: capsaicina, BrP-LPA y LPA. En el caso de la capsacina (Sigma-Aldrich) se preparó a una concentración de 10 mM en etanol absoluto. Por su parte, se preparó una solución madre de 1-bromo-3-(S)-hidroxi-4-(palmitoiloxi)butil fosfonato (BrP-LPA; Echelon Biosciences) a una concentración de 1 mM en agua desionizada. El ácido lisofosfatídico (LPA, Avanti Polar Lipids) fue preparado a 10 mM en DMEM con 1 % de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés), debido a que este lisofosfolípido no se solubiliza fácilmente en otros disolventes. La solución madre de LPA fue disuelta agitando con un vórtex por 10 minutos, incubando a 37 °C por 1 hora y sometiendo a sonicación durante 15 minutos, previo a ser alicuotado y congelado en nitrógeno líquido a -70 °C para su conservación.

Para los ensayos electrofisiológicos, los reactivos fueron diluidos a la concentración deseada en solución de registro. Las soluciones de BrP-LPA y LPA fueron preparadas el mismo día de su utilización. En el caso del LPA, las alícuotas fueron agitadas en un vórtex e incubadas a 37 °C durante 20 minutos, previo a su disolución.

4.4. Electrofisiología

Se empleó la variante donde la membrana interna ve hacia afuera (“inside out”) de la técnica de fijación de voltaje en micro-áreas de membrana (“patch clamp”). Se emplearon soluciones isométricas en los registros, es decir, con las mismas concentraciones en la pipeta y en el baño (NaCl 130 mM, EDTA 1 mM, HEPES 3 mM), libres de Ca^{2+} y con pH de 7.2 (ajustado con NaOH). Se utilizó un amplificador EPC10 USB (HEKA Electronics). Los datos se obtuvieron con los programas PULSE o Patchmaster (HEKA Electronic) y las curvas de respuesta a dosis, así como el análisis de los experimentos de canales unitarios, fueron

realizados con el programa Igor Pro (Wavemetrics Inc., Portland). Las soluciones en el baño fueron cambiadas empleando un equipo RSC-200 (Biologic).

4.5. Registros de corrientes macroscópicas

Para obtener las curvas de respuesta a dosis de los agonistas del canal rTRPV1-WT se aplicaron protocolos de voltaje consistentes en un pulso de 0 mV durante 10 ms, seguidos de un pulso cuadrado a -120 y +120 mV por 100 ms, para posteriormente regresar a 0 mV durante 10 ms (**Figura 8A**). Para todos los agonistas se midió la corriente de fuga (“leak”) previo a la aplicación del compuesto. Tal corriente fue sustraída de las provocadas por el agonista en cuestión, a menos que se estipule lo contrario.

En el caso de la capsaicina se emplearon concentraciones en un intervalo entre 10 nM y 10 μ M. Todas las concentraciones de este agonista fueron aplicadas al mismo sello. Posteriormente, se normalizaron las corrientes obtenidas respecto a la respuesta evocada ante la concentración más alta de capsaicina (10 μ M).

Mientras tanto, para obtener la curva de respuesta a dosis para el LPA se emplearon concentraciones en un intervalo entre 250 nM y 6 μ M. Por su parte, para la curva de BrP-LPA se utilizaron concentraciones entre 500 nM y 6 μ M. Este último compuesto se empleó debido a que es un activador del canal TRPV1 con efectos similares al LPA (Nieto-Posadas *et al.*, 2012), con la ventaja de que parece no afectar tanto la estabilidad de la membrana en el sello.

Debido a la dificultad para lavar los agonistas lipídicos en cada medición, en ambos casos, los ensayos para cada concentración se realizaron en parches de membrana distintos, después de 3 minutos de exposición al agonista. Las corrientes obtenidas fueron normalizadas respecto a la respuesta obtenida con el mismo sello al aplicar previamente la concentración saturante de capsaicina (4 μ M) y tras realizar un lavado de la misma (hasta lograr que la resistencia del sello fuera similar a la observada durante la medición del “leak”).

Para poder comparar las corrientes macroscópicas evocadas por LPA 5 μ M o capsaicina 4 μ M se aplicaron protocolos de voltaje consistentes en un pulso de 0

mV durante 10 ms, seguidos de un pulso cuadrado a -60 y +60 mV por 100 ms, para posteriormente regresar a 0 mV durante 10 ms (**Figura 8B**).

Por su parte, con la finalidad de determinar cambios en el potencial local de la membrana en las inmediaciones del canal, se construyeron curvas de conductancia contra voltaje (G-V, por sus siglas en inglés). Para estimar cambios en la dependencia de voltaje durante la activación del canal se utilizaron concentraciones saturantes y subsaturantes de capsaicina (50 nM y 4 μ M) y LPA (1 μ M y 5 μ M). Tales concentraciones fueron establecidas tomando como base los valores de K_D obtenidos tras ajustar las curvas de respuesta a dosis a la ecuación de Hill. Se emplearon pulsos de prueba de -120 a +200 mV por 100 ms, con incrementos de 10 mV (**Figura 8C**). Se normalizaron las corrientes contra el valor máximo obtenido a 200 mV en condiciones saturantes del agonista en cuestión. Posteriormente, para obtener el valor de $V_{1/2}$ se realizó un ajuste a la ecuación de Boltzmann:

$$\frac{G}{G_{\max}} = \frac{1}{1 + \exp^{-q_a(V - V_{1/2})/kT}} \quad (1)$$

Donde G_{\max} es la conductancia máxima, q_a es la carga asociada a la activación por voltaje, $V_{1/2}$ es el voltaje al que se alcanza el 50 % de la conductancia máxima, k es el factor de Boltzmann y T es la temperatura.

4.6. Registros de canales unitarios y análisis cinético

Para los experimentos en donde se analizó la actividad de canales unitarios con el fin de medir la amplitud de las corrientes y la probabilidad de apertura para los canales rTRPV1-WT o rTRPV1-K710D se aplicaron pulsos continuos a +60 mV por 1 s en la configuración “inside-out” del “patch clamp” (**Figura 8D**). Se emplearon pipetas con una resistencia entre 6 y 8 $M\Omega$ y los ensayos se realizaron aproximadamente 36 horas después de la transfección de las células. Los sellos

que contenían una sola proteína fueron identificados exponiéndolos a capsaicina 4 μM .

Posteriormente, se aplicó solución de registro hasta que se observó la ausencia de eventos de apertura y luego se aplicó LPA o BrP-LPA a concentraciones de 5 μM . La probabilidad de apertura (P_o) en presencia de los diferentes agonistas fue calculada para cada pulso como la suma de la duración de los eventos de apertura dividida entre la duración total del pulso. Asimismo, se obtuvieron histogramas de todos los puntos que fueron ajustados a una función gaussiana para el cálculo de las amplitudes de las corrientes unitarias (Oseguera *et al.*, 2007).

Por su parte, para la obtención de las curvas corriente-voltaje (I-V) para los canales unitarios se emplearon pulsos con una duración de 500 ms y con voltajes de -100 mV a +100 mV en pasos de 40 mV, el voltaje fue mantenido a 0 mV durante 5 ms antes y después de cada pulso (**Figura 8E**). Estos ensayos fueron realizados sobre sellos que expresaban rTRPV1-WT.

Para el análisis cinético de canales unitarios fue necesario realizar la idealización de los registros obtenidos en presencia de concentraciones saturantes y subsaturantes de capsaicina (4 μM y 50 nM, respectivamente) y LPA (5 μM y 1 μM , respectivamente), utilizando como umbral el valor del 50 % de la amplitud promedio obtenida en cada caso (Colquhoun y Sigworth, 1995). Los tiempos de estadía en los estados cerrado o abierto (“dwell times”) son presentados como histogramas de acuerdo a la transformada de Sine-Sigworth (Sigworth y Sine, 1987). Fueron descartados aquellos eventos con una duración menor de 100 μs . Los histogramas fueron ajustados a funciones multiexponenciales para obtener los valores de las constantes de tiempo en cada distribución.

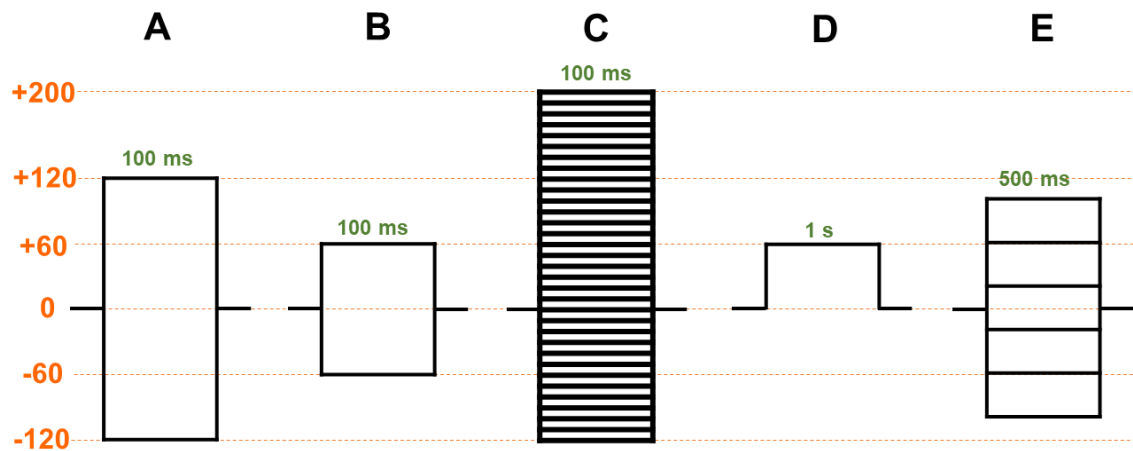


Figura 8. Resumen de los protocolos de voltaje empleados para la obtención de los registros. A la izquierda se muestran algunos valores de voltaje como referencia. El tiempo de los trazos no se encuentra a escala y se muestra para cada uno de los esquemas. (A) Protocolo utilizado para la obtención de curvas de respuesta a dosis. (B) Protocolo de voltaje empleado para la medición de corrientes macroscópicas evocadas ante los agonistas. (C) Voltajes utilizados para la obtención de curvas G-V. (D) Protocolo empleado para la medición de corrientes unitarias. (E) Voltajes empleados para la obtención de curvas I-V en canal unitario.

5. Resultados y discusión

5.1. Activación del canal rTRPV1-WT ante diferentes agonistas

Se inició por estandarizar las curvas de respuesta a dosis del canal rTRPV1-WT ante los diferentes agonistas a estudiar. En el caso de la capsaicina, la curva se presenta en la **Figura 9**. Los valores del número de Hill (1.44 ± 0.05) y de la K_D (177 ± 23 nM) se encuentran dentro de los rangos esperados para el canal TRPV1, ya que se ha reportado previamente que la K_D de esta proteína para la capsaicina se encuentra en el rango sub-micromolar, entre 100 y 250 nM (Caterina, *et al.*, 1997; Kim, *et al.*, 2006). Por su parte, el valor del coeficiente o número de Hill es de utilidad en la estimación de la estequiometría de la interacción saturable y no lineal entre una proteína y su agonista, ya que permite sugerir el número aparente de moléculas de ligando que deben unirse a un receptor para producir un efecto observable (Weiss, 1977; Goutelle, *et al.*, 2008).

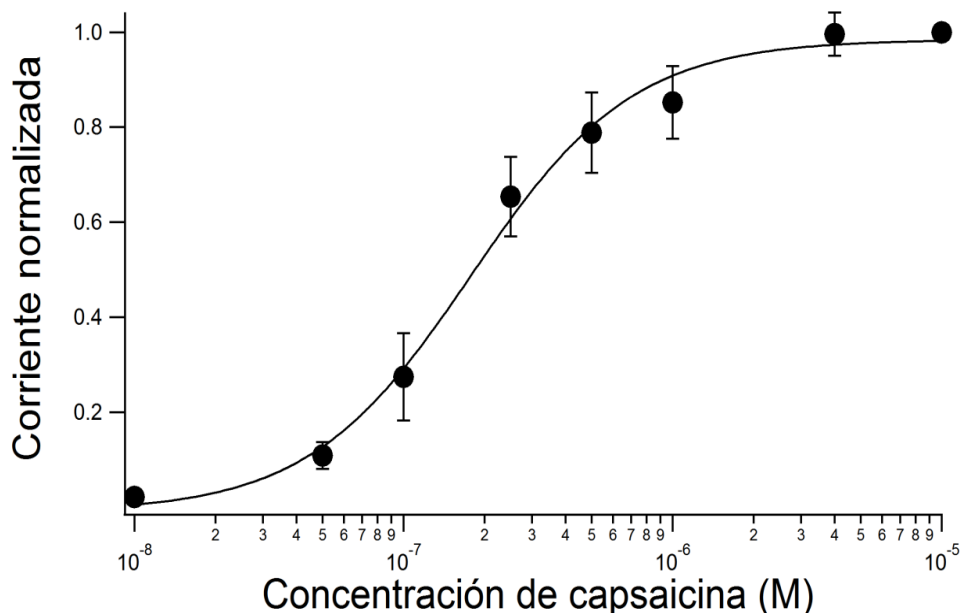


Figura 9. Curva de respuesta a dosis del canal rTRPV1-WT ante capsaicina (n=9). Puede observarse que a concentraciones cercanas a 4 μ M se alcanza un estado de saturación del canal, donde se obtiene un valor máximo de activación. Los datos se presentan como promedio \pm S.E.M.

Por su parte, en la **Figura 10** se muestran las curvas de respuesta a dosis obtenidas para el canal rTRPV1-WT ante BrP-LPA (cuadros azules) y LPA (triángulos rojos). Se ajustaron los datos con la ecuación de Hill. En el caso del BrP-LPA se obtuvo una K_D de $3.79 \pm 0.61 \mu\text{M}$ y número de Hill de 3.0789 ± 1.45 . Mientras tanto, para el LPA se obtuvo una K_D de $3.77 \pm 0.7 \mu\text{M}$ y número de Hill de 3.52 ± 1.88 .

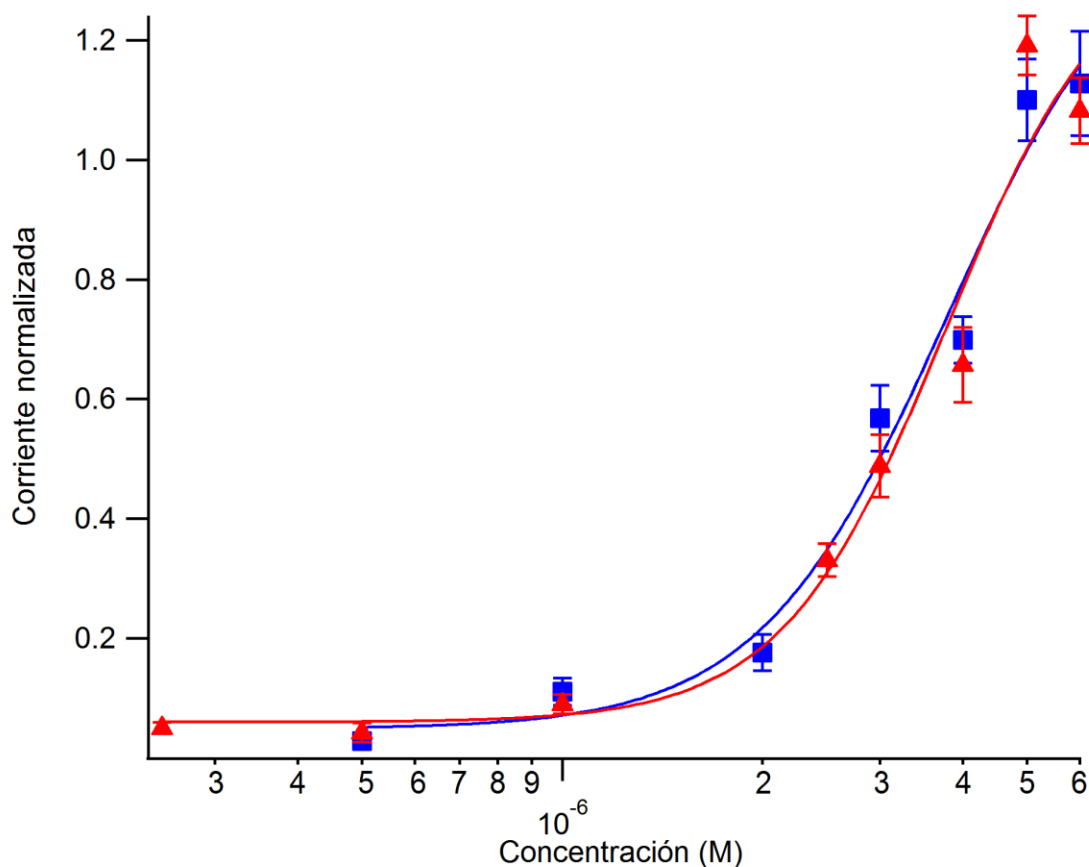


Figura 10. Curvas de respuesta a dosis del canal rTRPV1-WT en presencia de BrP-LPA (cuadros azules, $n=5$) o ante LPA (triángulos rojos, $n=5$). En el caso del BrP-LPA se obtuvo una K_D de $3.79 \pm 0.61 \mu\text{M}$ y número de Hill de 3.0789 ± 1.45 . Por su parte, para el LPA se obtuvo una K_D de $3.77 \pm 0.7 \mu\text{M}$ y número de Hill de 3.5291 ± 1.88 . Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M.

En conjunto, estas curvas indican que las propiedades farmacológicas del canal rTRPV1-WT ante los diferentes agonistas a emplear son adecuadas y que el sistema responde de modo idóneo para el estudio de las características biofísicas inherentes al proceso de activación, ya que esta proteína tiene una respuesta dependiente de la dosis aplicada, como se demostró previamente (Hazan, *et al.*, 2015). También, permiten establecer una diferencia entre las propiedades de activación a concentraciones saturantes y subsaturantes que resulta útil para el análisis de experimentos en los que se emplean ambas condiciones.

5.2. La respuesta obtenida al aplicar LPA a nivel macroscópico es mayor en comparación a la observada con capsaicina

A continuación, se determinaron los efectos de una concentración saturante de LPA sobre las corrientes mediadas por el TRPV1 y se compararon contra las corrientes activadas por capsaicina a una concentración saturante. Al aplicar pulsos cuadrados de voltaje de -60 y +60 mV se observó que las corrientes obtenidas al aplicar LPA 5 μM en el canal rTRPV1-WT fueron aproximadamente 42.34 ± 0.04 % más grandes que las evocadas ante capsaicina 4 μM (**Figura 11**).

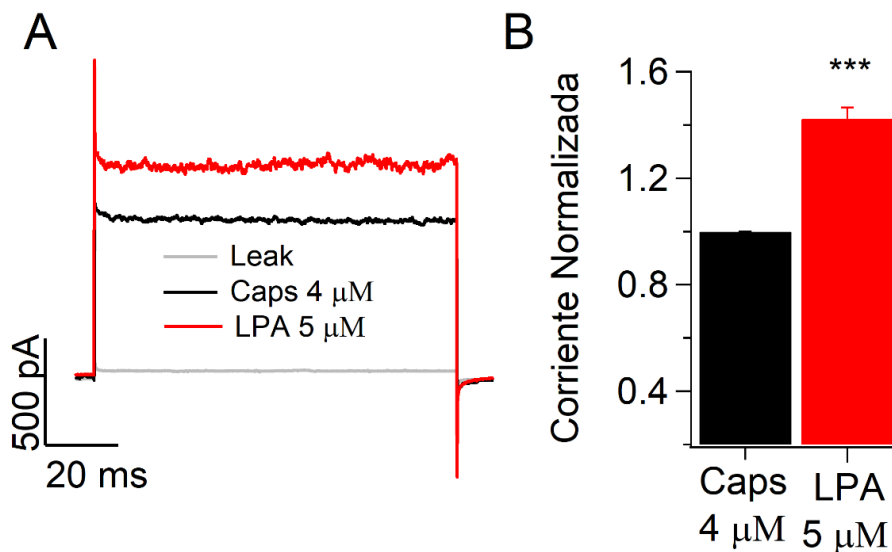


Figura 11. Trazos representativos a +60 mV (A) donde puede observarse que la corriente obtenida al aplicar LPA 5 μM es mayor que la obtenida al aplicar capsaicina 4 μM en el mismo sello para el canal rTRPV1-WT (n=5). Este aumento es de aproximadamente el 42.34 \pm 0.04 % (B) y es estadísticamente significativo (***, p=0.0005). Los datos se muestran como el promedio \pm S.E.M.

La corriente macroscópica (I) depende del número de canales (N) en la membrana, la probabilidad de apertura del canal (P_o) y la corriente unitaria de cada canal (i). Debido a que el primer parámetro no parece cambiar sustancialmente en los sellos durante los registros, el aumento observado en la corriente podría deberse a alguno de los otros dos factores, que en conjunto podrían sugerir que este lisofosfolípido ocasiona un cambio conformacional diferente en el canal respecto a la activación evocada ante el agonista por excelencia, la capsaicina.

5.3.El aumento en la corriente observada al aplicar LPA en corrientes macroscópicas también se observa a nivel microscópico

Una vez que se determinó que las corrientes macroscópicas producidas por el canal rTRPV1-WT en presencia de LPA fueron mayores a las producidas por capsaicina, se realizaron ensayos de canal unitario para definir si el mismo comportamiento se observa a nivel microscópico y para determinar si existen cambios que sugieran un cambio conformacional diferente.

Como puede observarse en las **Figuras 12A y 12C**, la aplicación de LPA provoca eventos de apertura cuya amplitud de corriente es de 9.66 ± 0.03 pA ($n=10$), con una probabilidad de apertura (P_o) de 0.78 ± 0.04 . Por su parte, la aplicación de capsaicina promueve amplitudes de corriente de 6.84 ± 0.02 pA ($P_o = 0.81 \pm 0.02$, $n=24$). Es decir, a nivel de corriente iónica unitaria, se observa un aumento de amplitud de corriente de aproximadamente 41 % al aplicar LPA respecto a capsaicina (**Figura 12E**). Este incremento es muy similar al observado a nivel de corrientes macroscópicas (42.34 %). Por su parte, la probabilidad de apertura a 60 mV en ambas condiciones se mantiene en valores similares.

Resulta interesante que el BrP-LPA, un análogo estructural del LPA que se une al mismo sitio en TRPV1 (Nieto-Posadas *et al.*, 2012), también promueve un aumento en las corrientes unitarias del canal rTRPV1-WT (**Figura 12B y 12D**). Para este compuesto, la amplitud de corriente unitaria corresponde a 8.97 ± 0.03 pA, con una P_o de 0.81 ± 0.02 a 60 mV. De modo que el incremento respecto a capsaicina es de 24 % aproximadamente (**Figura 12E**).

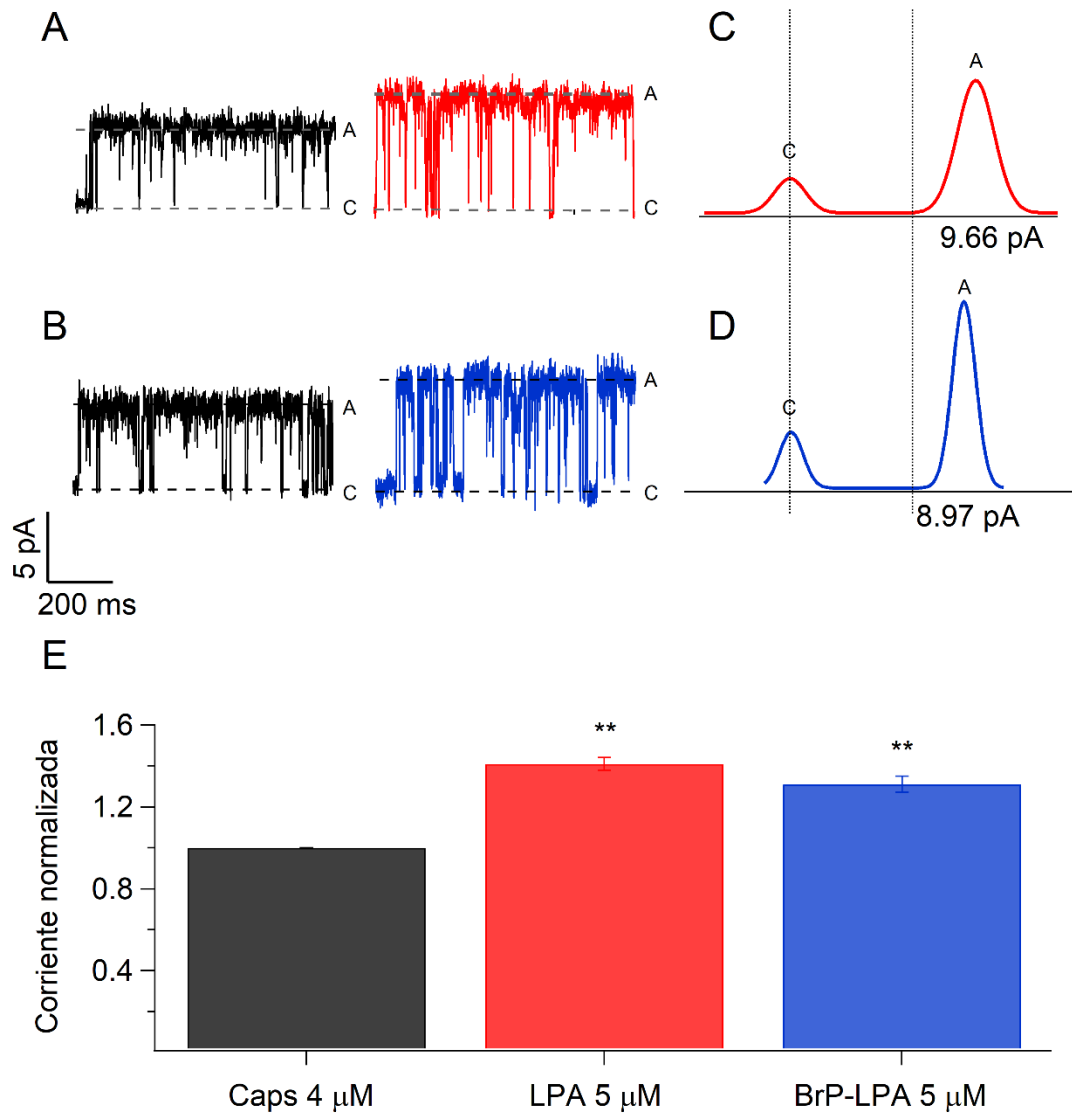


Figura 12. Trazos representativos de corrientes unitarias del canal rTRPV1-WT a + 60 mV en configuración “inside-out”, en presencia de capsaicina 4 μM (A y B, trazos negros), LPA 5 μM (A, trazo rojo) y BrP-LPA 5 μM (B, trazo azul). Las letras C y A representan el estado cerrado y abierto del canal, respectivamente. Histograma de todos los puntos para las corrientes unitarias evocadas ante LPA (C) y BrP-LPA (D). Las líneas punteadas verticales representan el estado cerrado y abierto en presencia de capsaicina (amplitud de corriente unitaria promedio de 6.84 ± 0.02 pA; $n = 24$). La amplitud unitaria de la corriente ante LPA (C) es de 9.66 ± 0.03 pA ($n=10$). Por su parte, la amplitud unitaria de la corriente ante BrP-LPA (D) es de 8.97 ± 0.03 pA ($n=6$). (E) Gráfica de barras donde se muestra el aumento de 41 % en las corrientes unitarias al aplicar LPA y de 24 % en presencia de BrP-LPA, en comparación de las producidas por capsaicina. (**, $p < 0.001$). Los datos se presentan como promedio \pm S.E.M.

Adicionalmente, experimentos realizados previamente a modo de control indican que el vehículo (BSA 1 %) empleado para la preparación del LPA no produce aumento en la corriente unitaria del canal rTRPV1-WT tras su aplicación concomitante con capsaicina (**Figuras 13A, 13C y 13E**).

Los lisofosfolípidos pueden afectar la función de los canales iónicos a través de modificaciones físicas en la membrana (van der Brink-van der Laan, 2004). Por ejemplo, la LPC no activa al canal TRPV1, como se demostró previamente (Morales-Lázaro *et al.*, 2014), pero potencialmente puede provocar cambios en la curvatura de la membrana (Lundbaek y Andersen, 1994), que podrían presentarse también tras la aplicación de LPA y BrP-LPA.

La aplicación de lisofosfatidilcolina (LPC) tiene un efecto sobre la función de canales de gramicidina, en los cuales este lípido produce un incremento en la actividad del canal al aumentar la tasa de aparición del mismo y su tiempo de vida, aunque también provoca una disminución de la corriente unitaria (Lundbaek y Andersen, 1994).

En el caso del canal TRPV1, la aplicación de LPC junto con capsaicina, no produce un cambio significativo en la corriente unitaria respecto a capsaicina (**Figuras 13B, 13D y 13E**). Estos datos sugieren que, en este diseño experimental, cambios en la curvatura o forma de la membrana mediados por este lípido parecen no estar jugando un papel importante en el aumento de la corriente unitaria del canal.

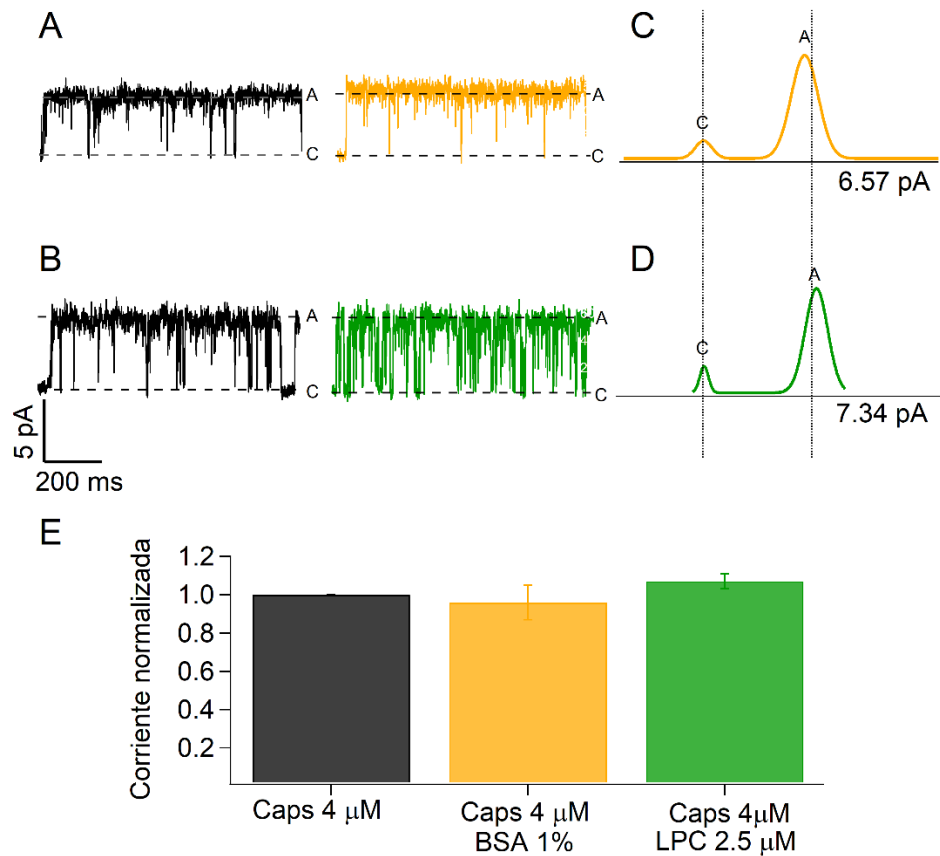


Figura 13. Trazos representativos de corrientes unitarias evocadas a 60 mV en presencia de capsaicina 4 μM (A y B, trazos negros), capsaicina 4 μM + BSA 1 % (A, trazo amarillo) y capsaicina 4 μM + LPC 2.5 μM (B, trazo verde). Las letras C y A representan el estado cerrado y abierto del canal, respectivamente. Histograma de todos los puntos para las corrientes unitarias evocadas ante capsaicina 4 μM + BSA 1 % (C, 6.574 ± 1 pA, $n = 4$) y capsaicina 4 μM + LPC 2.5 μM (D, 7.34 ± 0.03 pA, $n = 4$). Las líneas punteadas verticales representan el estado cerrado y abierto en presencia de capsaicina (6.84 ± 0.02 pA; $n = 24$). (E) Gráfica de barras donde se muestra que no existen diferencias entre las corrientes evocadas ante los tratamientos descritos respecto a capsaicina. Los datos se presentan como promedio \pm S.E.M.

5.4.El aumento en las corrientes unitarias promovidas por LPA se observa tanto a potenciales positivos como negativos

Se aplicaron pulsos a 6 diferentes voltajes (de -100 a +100 mV, con incrementos de 40 mV y duraciones de 500 ms) con la finalidad de determinar si el comportamiento observado a +60 mV se presenta también a otros potenciales.

Los resultados obtenidos indican que el LPA promueve amplitudes de corriente mayores que las evocadas ante capsaicina tanto a voltajes positivos como negativos (**Tabla 1, Figura 14**).

De igual manera, estos datos apoyan la noción de que los efectos promovidos por la aplicación intracelular de LPA sobre las corrientes unitarias no ocurren a través de un cambio en la superficie de carga, ya que, si este fuera el caso, se esperaría que solamente las corrientes salientes sufrieran cambios.

Tabla 1. Amplitud de corrientes unitarias producidas en el canal rTRPV1-WT ante capsaicina y LPA a diferentes voltajes.

Voltaje (mV)	Capsaicina 4 μM (pA)	LPA 5 μM (pA)	Aumento en la corriente (%)
-100	-3.96 \pm 0.56	-6.8 \pm 1.6	71 \pm 0.32
-60	-2.66 \pm 0.36	-5.2 \pm 0.96	95 \pm 0.12
-20	-0.61 \pm 0.26	-1.94 \pm 0.31	218 \pm 0.04
+20	2.1 \pm 0.38	3.05 \pm 0.29	45 \pm 0.35
+60	5.78 \pm 0.72	8.62 \pm 0.79	49 \pm 0.21
+100	9.56 \pm 1.09	15 \pm 0.69	56 \pm 0.17

En la **Tabla 1** puede observarse que, aunque el incremento de la corriente unitaria en presencia de LPA ocurre a todos los voltajes, el porcentaje de aumento a voltajes negativos sufre mayores variaciones en comparación a los voltajes positivos, donde se observa un aumento entre 45 y 56 %. Tal comportamiento puede estar relacionado con el hecho de que TRPV1 es un canal rectificador saliente, débilmente dependiente de voltaje (Pingle, *et al.*, 2007).

Dado el comportamiento de las corrientes unitarias a voltajes positivos, se realizó un ajuste lineal (**Figura 14C**) con estos datos, empleando la ecuación de la ley de Ohm.

$$I = \frac{V}{R} \quad (2)$$

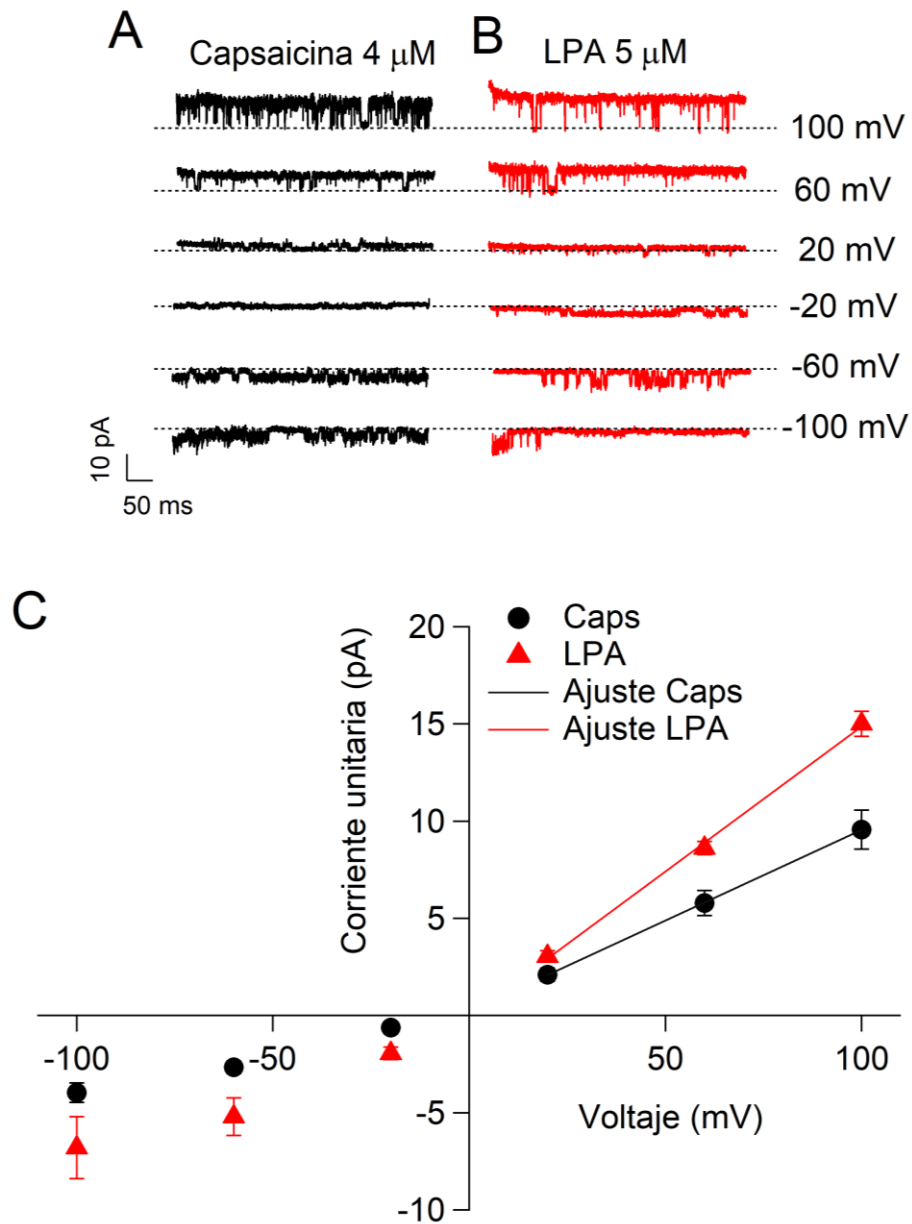


Figura 14. Trazos representativos de las corrientes unitarias del canal rTRPV1-WT ante capsaicina 4 μM (A) o LPA 5 μM (B) a diferentes potenciales. (C) Curva de corriente contra voltaje para las corrientes evocadas ante capsaicina (círculos negros) o LPA (triángulos rojos). Los valores obtenidos a voltajes positivos se ajustaron linealmente a la ecuación de la ley de Ohm, donde la pendiente de la recta obtenida corresponde a la conductancia en S. En el caso de la capsaicina (color negro, $R^2=0.999$) se obtuvo la ecuación $I = (9.325 \times 10^{-11}) V + 2.183 \times 10^{-13}$. Por su parte, para el LPA (color rojo, $R^2=0.998$) se obtuvo la ecuación $I = (1.493 \times 10^{-10}) V - 7.25 \times 10^{-14}$. Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M., $n=5$.

Donde I es la corriente, V el voltaje y R es la resistencia. De este modo, la pendiente de la recta obtenida corresponde al inverso de la resistencia, o bien, a la conductancia del canal.

En el caso de la aplicación de capsaicina, se obtuvo una conductancia de 93.25 ± 0.001 pS, similar a la reportada previamente para el canal TRPV1, que se encuentra entre 90 y 100 pS (Pingle, *et al.*, 2007). Por su parte, en el caso del LPA, como era de esperarse, la conductancia aumentó, teniendo un valor de 149.38 ± 0.005 pS.

5.5. Análisis cinético de las corrientes unitarias del TRPV1 en respuesta a diferentes agonistas

Se realizaron registros de canal unitario y el análisis cinético de los mismos, obtenidos con concentraciones saturantes y subsaturantes de capsaicina y LPA. Esto, para determinar si el aumento observado en las corrientes unitarias guarda alguna relación con cambios en los parámetros asociados a la cinética del canal, como los tiempos de permanencia en estado abierto y cerrado, entre otros.

Asimismo, a través del análisis cinético de registros de este tipo es posible develar a detalle eventos involucrados en la activación de los canales iónicos y que se encuentran relacionados con el proceso de apertura de la compuerta (Qin, 2014). Sin embargo, es importante considerar que, dependiendo de determinadas condiciones, es posible que no todos los estados conformacionales individuales puedan ser resueltos y analizados con este tipo de aproximaciones (Yang, *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos indican que cuando se emplean concentraciones saturantes (capsaicina $4 \mu\text{M}$ o LPA $5 \mu\text{M}$), el proceso de compuerta del canal rTRPV1-WT ocurre de modo similar entre ambos agonistas (**Figuras 15A y 15C**). Se observa una P_o elevada en estas condiciones, reflejada en la alta duración de los estados abiertos, cuya distribución muestra una constante de tiempo de ~ 50 ms (**Figuras 15B y 15D**, paneles inferiores). Por su parte, la distribución de

tiempos de permanencia en el estado cerrado puede ser ajustada a una exponencial cuádruple, siendo más comunes los estados cerrados de corta duración (**Figuras 15B y 15D**, paneles superiores). El análisis de la cinética de los canales unitarios en presencia de concentraciones saturantes de agonistas presenta el problema de que, dado que la respuesta está saturada, es posible que se pierda el detalle de efectos de los agonistas en la misma. Por tal motivo, se procedió a determinar los efectos de concentraciones subsaturantes de capsaicina y LPA sobre la cinética de activación de los canales unitarios, como se describe a continuación.

Al aplicar concentraciones subsaturantes de ambos agonistas (capsaicina 50 nM y LPA 1 μ M) se obtuvo que el proceso de compuerta también se mantiene con un comportamiento similar entre ambos compuestos en donde se determinó que disminuyó la duración de ráfagas o “bursts” de apertura (**Figuras 15E y 15G**). De nuevo, la distribución de tiempos en estado cerrado se ajusta a una exponencial cuádruple, aunque en este caso, son más comunes los tiempos largos de cierre (**Figuras 15F y 15H**, paneles superiores). Por su parte, los histogramas correspondientes al estado abierto se ajustan a una exponencial triple (**Figuras 15F y 15H**, paneles inferiores). Todos los valores de los ajustes realizados se resumen en la **Tabla 2**.

El hecho de que los histogramas de distribución de tiempos se ajusten en todos los casos a una función multiexponencial sugeriría la presencia de múltiples estados abiertos y cerrados del canal, como se ha caracterizado en algunos procesos alostéricos en proteínas modulares (Baez *et al.*, 2014; Latorre *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2003; Hui *et al.*, 2003). En este sentido, diferentes estudios enfocados al acoplamiento alostérico de los canales TRP han ofrecido importantes observaciones referentes a los mecanismos de activación de estas proteínas ante diferentes estímulos (Zheng y Ma, 2014).

Sin embargo, los datos aquí presentados indican en general que tanto la capsaicina como el LPA no producen diferencias apreciables en la cinética del canal TRPV1.

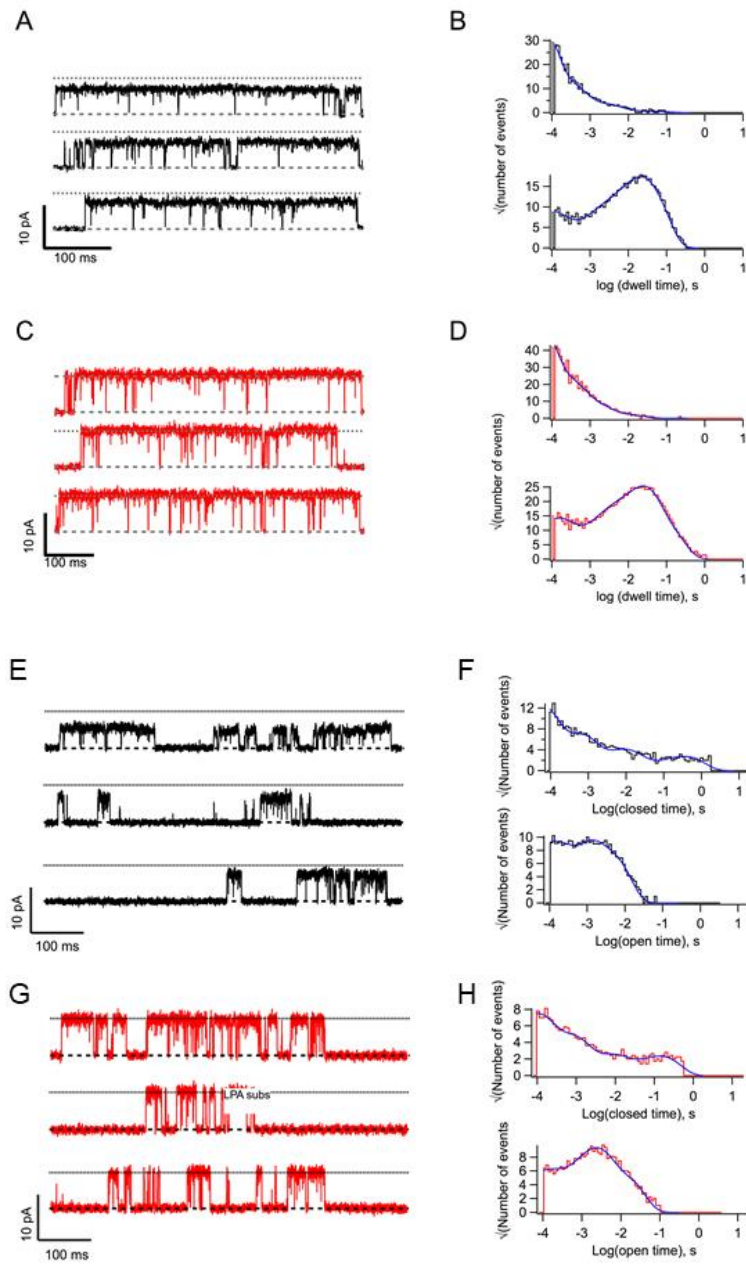


Figura 15. Trazos representativos de las corrientes unitarias obtenidas a 60 mV en presencia de capsaicina 4 μM (A), LPA 5 μM (C), capsaicina 50 nM (E) y LPA 1 μM (G), Las líneas punteadas indican los estados cerrado y abierto en presencia de concentraciones saturantes de LPA. Distribución de tiempos de permanencia en estado cerrado (paneles superiores) y abierto (paneles inferiores) para capsaicina 4 μM (B), LPA 5 μM (D), capsaicina 50 nM (F) y LPA 1 μM (H). Las líneas azules continuas sobre los histogramas son los ajustes a las funciones multiexponenciales descritas.

Tabla 2. Valores utilizados para el ajuste de estudios cinéticos de canales unitarios.

	Parámetro	Condiciones saturantes		Condiciones subsaturantes	
		Capsaicina 4 μM	LPA 5 μM	Capsaicina 50 Nm	LPA 1 μM
Estado abierto	A₁	10.5 \pm 1.15	15.4 \pm 0.947	8.2 \pm 0.67	4.8 \pm 0.34
	Tau₁	6.37x10 ⁻⁵ \pm 8.85x10 ⁻⁶	9.47x10 ⁻⁵ \pm 9.59x10 ⁻⁶	7.01x10 ⁻⁵ \pm 8.55x10 ⁻⁶	6.55x10 ⁻⁵ \pm 5.35x10 ⁻⁶
	A₂	3.1 \pm 0.655	7.2 \pm 0.75	7 \pm 0.53	10 \pm 0.824
	Tau₂	0.0010 \pm 0.0003	0.0016 \pm 0.0003	0.0006 \pm 0.0001	0.0016 \pm 0.0002
	A₃	23 \pm 2.66	27.7 \pm 1.79	12 \pm 1.2	8.5 \pm 0.82
	Tau₃	0.032 \pm 0.002	0.017 \pm 0.001	0.004 \pm 0.0003	0.011 \pm 0.0019
	A₄	8 \pm 2.32	19 \pm 2.04	-	-
	Tau₄	0.0094 \pm 0.002	0.0807 \pm 0.007	-	-
Estado cerrado	A₁	52.7 \pm 6.91	73.5 \pm 15.4	15.7 \pm 2.1	7.9 \pm 1.78
	Tau₁	3.52x10 ⁻⁵ \pm 4.77x10 ⁻⁶	3.24x10 ⁻⁵ \pm 6.71x10 ⁻⁶	4.01x10 ⁻⁵ \pm 9.13x10 ⁻⁶	6.5x10 ⁻⁵ \pm 5.71x10 ⁻⁶
	A₂	16.9 \pm 1.93	27.6 \pm 4.1	9 \pm 0.92	6.1 \pm 0.87
	Tau₂	0.00021 \pm 3.48x10 ⁻⁵	0.00019 \pm 5.7x10 ⁻⁵	0.0004 \pm 0.0001	0.0005 \pm 0.0002
	A₃	5.7 \pm 0.884	12.8 \pm 4.38	4.5 \pm 0.56	3.8 \pm 0.12
	Tau₃	0.0018 \pm 0.0005	0.001 \pm 0.0004	0.345 \pm 0.072	0.136 \pm 0.056
	A₄	0.9 \pm 0.543	3.9 \pm 0.24	5.6 \pm 0.97	2.9 \pm 0.34
	Tau₄	0.027 \pm 0.0261	0.006 \pm 0.003	0.007 \pm 0.001	0.005 \pm 0.0003

5.6. Efectos sobre el potencial local de membrana parecen no ser importantes para el aumento inducido por LPA en las corrientes unitarias

Debido a que la estructura del LPA posee una cabeza con un grupo fosfato cargado negativamente (**Figura 4**), potencialmente esta podría insertarse en la membrana y generar un cambio en el potencial local de la cara intracelular, como predice la teoría de Gouy-Chapmann-Stern (Oldham, 2008).

Estos cambios podrían tener un papel importante en el aumento de la conductancia del canal TRPV1, ya que, por ejemplo, podrían estar relacionados con el incremento en la disponibilidad de iones en regiones cercanas al poro. Por tal motivo, resulta necesario determinar si este efecto se encuentra presente en el sistema o si, efectivamente, el aumento en la conductancia se debe solamente a un cambio conformacional en el canal.

Por tal motivo, se realizaron ensayos con concentraciones saturantes y subsaturantes de capsaicina (50 nM y 4 μ M, respectivamente) y LPA (1 y 5 μ M, respectivamente) para obtener curvas conductancia-voltaje (G-V) que ofrecieran información sobre la presencia o ausencia de cambios en el potencial local de la membrana que pudieran influir en la voltaje-dependencia de activación del canal. De este modo, puede obtenerse información relevante sobre los perfiles energéticos del canal en los diferentes estados (Eisenman, *et al.*, 1980). La aplicación de concentraciones saturantes de los diferentes agonistas (**Figura 16A**) arrojó valores similares para $V_{1/2}$ al ajustar a la ecuación de Boltzmann (Ec. 1; -62.9 \pm 1.11 mV para capsaicina 4 μ M, -64.4 \pm 1.74 mV para LPA 5 μ M).

Mientras tanto, cuando se aplicaron concentraciones subsaturantes de los agonistas (**Figura 16B**), las curvas sufrieron, como se esperaba, un desplazamiento hacia la derecha en comparación a las condiciones de saturación. Sin embargo, los valores de $V_{1/2}$ para ambos agonistas se mantuvieron similares (68.53 \pm 1.64 mV para capsaicina 50 nM y 72.09 \pm 5.62 mV para LPA 1 μ M).

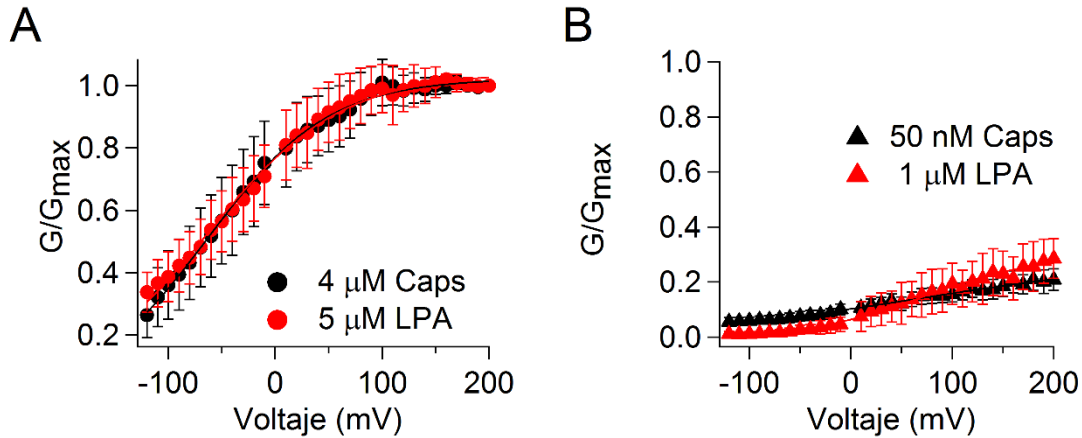


Figura 16. (A) Curvas de conductancia contra voltaje (G-V) obtenidas en presencia de capsaicina 4 μM (círculos negros) o LPA 5 μM (círculos rojos). (B) Curvas G-V obtenidas tras la aplicación de capsaicina 50 nM (triángulos negros) o LPA 1 μM (triángulos rojos). Ajustes a la ecuación de Boltzmann arrojaron valores de $V_{1/2}$ de -62.9 ± 1.11 mV para capsaicina 4 μM , -64.4 ± 1.74 mV para LPA 5 μM , 68.53 ± 1.64 mV para capsaicina 50 nM y 72.09 ± 5.62 mV para LPA 1 μM . Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M., $n=5$.

Adicionalmente, otros datos (aún no publicados) que apoyan esta observación son los obtenidos utilizando tetrapentilamonio (TPA), un amonio cuaternario que puede bloquear al canal TRPV1 (Jara-Oseguera *et al.*, 2008). Si el LPA produjera un cambio en el potencial local de membrana, esto provocaría a su vez una variación en la dependencia de voltaje durante el bloqueo del canal, que se reflejaría en cambios de la constante de bloqueo entre uno y otro agonista (Jara-Oseguera *et al.*, 2008; Oseguera *et al.*, 2007; Thompson y Begenisich, 2000). Sin embargo, al aplicar este bloqueador en conjunto con capsaicina o con LPA, no se observan diferencias significativas en este parámetro, lo que indica que el LPA no produce un cambio en el potencial de la membrana en las cercanías al canal TRPV1.

Otra observación importante radica en el hecho de que, en nuestro diseño experimental, no existen indicios de la presencia del fenómeno de dilatación del poro, que consiste en un ensanchamiento de esta región del canal tras exposiciones prolongadas al agonista. Los experimentos donde se describió originalmente este comportamiento fueron realizados en configuración de célula

completa o “whole cell” (Chung *et al.*, 2008). Por su parte, en nuestro laboratorio se describió, por medio de experimentos en configuración de parche escindido “inside-out” (datos aún no publicados), que el incremento de la corriente unitaria promovido por LPA ocurre de modo instantáneo y no está acompañado por cambios en la selectividad ante cationes de mayor tamaño, como la N-metil-D-glucamina (NMDG, $\sim 4.54 \text{ \AA}$).

5.7. La sustitución de la lisina en la posición 710 del canal por un aspartato elimina el aumento en la corriente unitaria promovido por LPA

Como se demostró previamente, la lisina ubicada en la posición 710 del canal es el principal sitio de interacción directa con el LPA (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). Una vez que se descartó la contribución de ciertos procesos inespecíficos (por ejemplo, alteraciones en la superficie de carga) se analizó si la sustitución de este sitio por un aminoácido de carga opuesta tiene un efecto importante en el aumento de la corriente unitaria observada para el canal rTRPV1-WT.

Por tal motivo, se realizaron ensayos de canal unitario con la mutante rTRPV1-K710D, donde un aminoácido cargado positivamente se sustituyó por otro de carga negativa. Como se observa en la **Figura 17** ($n = 5$), se elimina casi totalmente el aumento observado en las corrientes unitarias para el canal silvestre, ya que el LPA promueve eventos de apertura de este canal con una amplitud media de $6.84 \pm 0.59 \text{ pA}$, mientras que la capsaicina lo hace con una amplitud media de $6.25 \pm 0.4 \text{ pA}$, esto es, un aumento del 8.39 %.

Es importante notar que se observa la existencia de algunas aperturas en los ensayos de canales unitarios a pesar de la eliminación del sitio de interacción con LPA; estos eventos estarían mediados por vías de activación que no dependen de la interacción directa con este residuo. De hecho, la probabilidad de apertura del canal rTRPV1-K710D con LPA disminuye a 0.25 ± 0.03 , valor menor al observado para el canal rTRPV1-WT (0.78 ± 0.04). Sin embargo, la P_o para capsaicina (0.82 ± 0.03) se mantiene en valores cercanos a la observada para el canal rTRPV1-WT (0.81 ± 0.02).

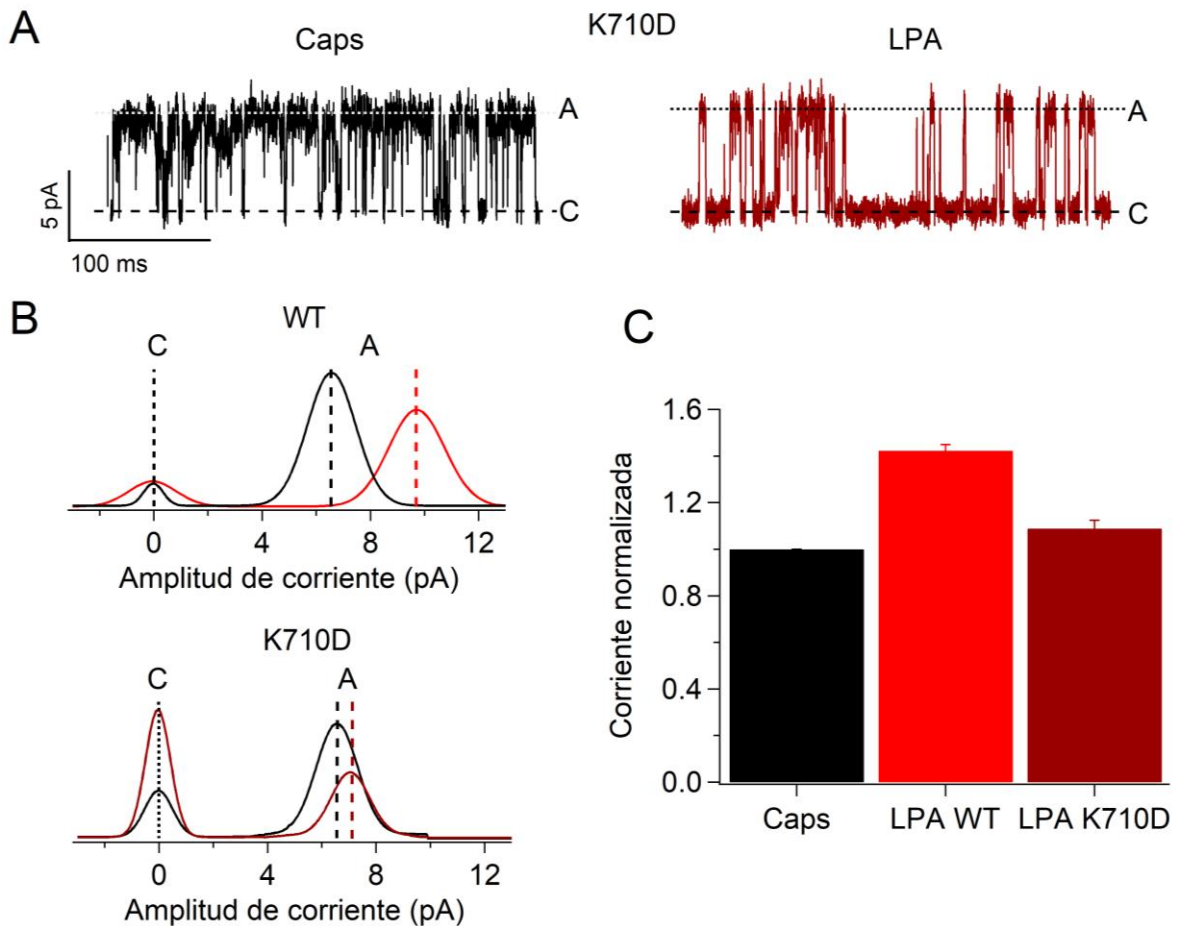


Figura 17. (A) Trazos representativos de las corrientes unitarias promovidas por capsaicina 4 μ M (izquierda) o LPA 5 μ M (derecha) en el canal rTRPV1-K710D. (B) Histogramas de todos los puntos en presencia de capsaicina 4 μ M (negro) o LPA 5 μ M (rojo) para el canal rTRPV1-WT (panel superior) y para el canal rTRPV1-K710D (panel inferior). Las líneas punteadas denotan los estados cerrado y abierto de ambos canales en presencia de cada agonista. El valor de la amplitud de corriente unitaria para el estado abierto del canal rTRPV1-WT en presencia de capsaicina fue de 6.84 ± 0.02 pA ($n=24$), y en el caso de LPA fue de 9.66 ± 0.03 pA, ($n=10$). Mientras tanto, para el canal rTRPV1-K710D, el valor de la amplitud de corriente unitaria en presencia de capsaicina fue de 6.25 ± 0.4 pA ($n=5$) y en presencia de LPA de 6.84 ± 0.59 pA ($n=5$). (C) Gráfica de barras donde se muestra que, mientras que el LPA promueve un aumento en la corriente unitaria del canal rTRPV1-WT de aproximadamente 41 % respecto a capsaicina (centro), este aumento es solo de 8 % en el canal rTRPV1-K710D (derecha). Los datos se presentan como el promedio \pm S.E.M.

De modo similar, el canal TRPV4, en la posición 746 de su secuencia, posee un aminoácido cargado positivamente, correspondiente a una arginina. Una aproximación experimental similar a la de este trabajo permitió describir que este residuo es importante para que este canal se active en presencia de LPC, en un proceso que al igual que la activación de TRPV1 por LPA, parece no estar mediado por procesos de modificación en la forma y rigidez de la membrana celular (Medina, 2018).

Esto apoya la idea de que los canales TRP pueden ser activados por interacción directa con estímulos de naturaleza lipídica, a diferencia de otros canales iónicos para los cuales se requiere de la actividad de vías de señalización río arriba que lleven a la apertura de los mismos. Sin embargo, dado que estas observaciones son novedosas, aún hace falta elucidar a detalle los mecanismos que median estas interacciones entre lípidos y proteínas. Sin duda, esta información podría ser de amplia utilidad para el entendimiento completo de la relevancia fisiológica de estos canales, así como de su papel en diversos procesos patológicos relacionados, como el dolor neuropático (Ueda, *et al.*, 2013).

6. Conclusiones

El LPA produce un aumento en la magnitud de las corrientes macroscópicas del canal rTRPV1-WT en comparación con las producidas por capsaicina.

El comportamiento observado a nivel macroscópico también se presenta a nivel de las corrientes de canal unitario y no se encuentra acompañado por cambios significativos en la probabilidad de apertura del canal.

Asimismo, las características biofísicas inherentes al proceso de activación del canal son similares en presencia de ambos agonistas, como se demuestra a partir del análisis de la cinética de canal unitario.

El aumento de la corriente unitaria por LPA se presenta tanto a voltajes positivos como negativos y no se encuentra relacionado con otros efectos diferentes a un cambio conformacional del canal, como cambios en la curvatura de la membrana plasmática, en el voltaje local o la carga de superficie. Tampoco se observan indicios del fenómeno de dilatación del poro, reportado previamente para el canal TRPV1.

Por último, el aumento de la corriente unitaria observado al aplicar LPA es dependiente de la presencia de la lisina en la posición 710 de la secuencia de aminoácidos del canal. La sustitución de este aminoácido por uno de carga opuesta elimina el efecto observado.

7. Referencias

- Baez, D.**, Raddatz, N., Ferreira, G., Gonzalez, C., Latorre, R., Gating of thermally activated channels. *Curr Top Membr*, **2014**. 74: p. 51-87.
- Cao, E.**, Liao, M., Cheng, Y., Julius, D., TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, **2013**. 504(7478): p. 113-118.
- Caterina, M.J.**, Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **1997**. 389(6653): p. 816-824.
- Chung, M.K.**, Guler, A.D., Caterina, M.J., TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci*, **2008**. 11(5): p. 555-564.
- Clapham, D.E.**, TRP channels as cellular sensors. *Nature*, **2003**. 426(6966): p. 517-524.
- Colquhoun, D.**, Sigworth, F.J., *Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records*. **1995**: p. 483-587.
- Eisenman, G.**, Hägglund, J., Sandblom, J., Enos, B., The current-voltage behavior of ion channels: important features of the energy profile of the gramicidin channel deduced from the conductance-voltage characteristic in the limit of low ion concentration. *Upsala Journal of Medical Sciences*, **1980**. 85(3): p. 247-257.
- Grazia, M.**; Ferrer, A. Lipids as central modulators of sensory TRP channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2017**. 1859: p.1615-1628.
- Goutelle, S.**, Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., Maire, P., The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental and clinical pharmacology*, **2008**. 22(6): p. 633-648.
- Hazan, A.**, Kumar, R., Matzner, H., Priel, A., The pain receptor TRPV1 displays agonist-dependent activation stoichiometry. *Sci Rep*, **2015**. 5: 12278.
- Hernández-Araiza, I.R.**, Morales-Lázaro, S.L., Canul-Sánchez, J.A., Islas, L.D., Rosenbaum, T., The role of lysophosphatidic acid on ion channel function and disease. *Journal of Neurophysiology*, **2018**. 120(3): p. 1198-1211.

- Hui, K.**, B. Liu, and F. Qin, Capsaicin activation of the pain receptor, VR1: multiple open states from both partial and full binding. *Biophys J*, **2003**. 84(5): p. 2957-68.
- Humphrey, W.**, Dalke, A., Schulten, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, **1996**. 14(1): p. 33-38.
- Inoue, M.**, Rashid, M.H., Fujita, R., Contos, J.J., Chun, J., Ueda, H., Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med*, **2004**. 10(7): p. 712-718.
- Islas, L.** Excitabilidad celular. En *Biología funcional de los animales*. Vol. 2. Una neurofisiología comparada. Editado por Fanjul M., Hiriart, M., Siglo XXI, **2008**, p. 11.
- Islas, L.** Molecular Mechanisms of Temperature Gating in TRP Channels. En *Neurobiology of TRP Channels*. Editado por Rosenbaum, T. Taylor & Francis Group, **2017**. p. 11-22.
- Jans, R.**, Mottram, L., Johnson, D.L., Brown, A.M., Sikkink, S., Ross, K., Reynolds, N.J., Lysophosphatidic acid promotes cell migration through STIM1- and Orai1-mediated Ca²⁺(i) mobilization and NFAT2 activation. *J Invest Dermatol*, **2013**. 133(3): p. 793-802.
- Jara-Oseguera, A.**, Llorente, I., Rosenbaum, T., Islas, L.D., Properties of the inner pore region of TRPV1 channels revealed by block with quaternary ammoniums. *J Gen Physiol*, **2008**. 132(5): p. 547-562.
- Jordt, S. E.**, Julius. D., Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*, **2002**. 108(3): p. 421-430.
- Kim, S.**, Kang, C., Shin, C.Y., Hwang, S.W., Yang, Y.D., Shim, W.S., Park, M.Y., Kim, E., Kim, M., Kim, B.M., Cho, H., Shin, Y., Oh, U., TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1. *J Neurosci*, **2006**. 26(9): p. 2403-24012
- Latorre, R.**, Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C., Vargas, G., ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium*, **2007**. 42(4-5): p. 427-438.

- Liao, M.**, Cao, E., Julius, D., Cheng, Y., Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryomicroscopy. *Nature*, **2013**. 504(7478): p. 107-112.
- Liu, B.**, K. Hui, and F. Qin, Thermodynamics of heat activation of single capsaicin ion channels VR1. *Biophys J*, **2003**. 85(5): p. 2988-3006.
- Liu, S.**, Umezū-Goto, M., Murph, M., Lu, Y., Liu, W., Zhang, F., Yu, S., Stephens, L.C., Cui, X., Murrow, G., Coombes, K., Muller, W., Hung, M.C., Perou, C.M., Lee, A.V., Fang, X., Mills, G.B., Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell*, **2009**. 15(6): p. 539-550.
- Lu, Z.**, Klem, A.M., Ramu, Y., Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J Gen Physiol*, **2002**. 120(5): p. 663-676.
- Lundbaek, J.A.**, Andersen, O.S., Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *The Journal of General Physiology*, **1994**. 104(4): p. 645-673.
- Medina, A.**, Rosenbaum, T. Interacciones lípido-proteína en el canal TRPV4 (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, **2018**. Ciudad de México, México.
- Moiseenkova-Bell, V.Y.**, Stanciu, L.A., Serysheva, I.I., Tobe, B.J., Wensel, T.G., Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Acad. Sci. USA*, **2008**. 105(21): p. 7451-7455.
- Morales-Lazaro, S.L.**, Serrano-Flores, B., Llorente, I., Hernández-García, E., González-Ramírez, R., Banerjee, S., Miller, D., Gududuru, V., Fells, J., Norman, D., Tigyi, G., Escalante-Alcalde, D., Rosenbaum, T., Structural determinants of the transient receptor potential 1 (TRPV1) channel activation by phospholipid analogs. *J Biol Chem*, **2014**. 289(35): p. 24079-24090
- Nieto-Posadas, A.**, Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L.D., Rosenbaum, T., Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat Chem Biol*, **2012**. 8(1): p. 78-85.

- Nilius, B.** TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta*. **2007**. 1772: p. 805-812.
- Okudaira S,** Yukiura, H., Aoki, J., Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie*. **2010**. 92: p. 698-706.
- Oldham, K.B.**, A Gouy–Chapman–Stern model of the double layer at a (metal) / (ionic liquid) interface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2008**. 613(2): p. 131-138.
- Oseguera, A.J.**, Islas, L.D., García-Villegas, R., Rosenbaum, T., On the mechanism of TBA block of the TRPV1 channel. *Biophys J*, **2007**. 92(11): p. 3901-14.
- Pagès, C.**, Simon, M.F., Valet, P., Saulnier-Blache, J.S., Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, **2001**. 64: p. 1-10.
- Palovcak, E.**, Delemotte, L., Klein, M., Carnevale, V., Comparative sequence analysis suggests a conserved gating mechanism for TRP channels. *J Gen Physiol*. **2015**. 146(1): p. 37-50.
- Pingle, S.C.**, Matta, J.A., Ahern, G.P., Capsaicin Receptor: TRPV1 A Promiscuous TRP Channel. En *Transient Receptor Potential (TRP) Channels. Handbook of Experimental Pharmacology*. Editado por Flockerzi, V., Nilius, B., Springer, **2008**, p. 155.
- Qin, F.**, Temperature Sensing by Thermal TRP Channels: Thermodynamic Basis and Molecular Insights. *Curr Top Membr*, **2014**. 74: p. 20-50
- Ramsey, I.S.**, Delling, M., Clapham, D.E., An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, **2006**. 68: p. 619-647.
- Rosasco, M.**; Gordon, S. TRP Channels: What Do They Look Like? En *Neurobiology of TRP Channels*. Editado por Rosenbaum, T. Taylor & Francis Group, **2017**. p. 1-7.
- Rosenbaum, T.**, Gordon, S.E., Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron*, **2002**. 33(5): p. 703-713.

- Sanchez, J.F.**, Krause, J.E., Cortright, D.N. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience*. **2004**. 107: p. 373-381.
- Schumacher, K.A.**, Classen H. G., Spath, M., Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with 483 substances in aged serum (DAS). *Thromb Haemost*, **1979**. 42(2): p. 631-640.
- Sigworth, F.J.**, Sine, S.M., Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophysical Journal*, **1987**. 52(6): p. 1047-1054.
- Stirling, L.**, Williams, M.R., Morielli, A.D., Dual roles for RHOA/RHO-kinase in the regulated trafficking of a voltage-sensitive potassium channel. *Mol Biol Cell*, **2009**. 20(12): p. 2991-3002.
- Szallasi, A.**, Cruz F., Geppetti, P., TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends in Molecular Medicine*, **2006**. 12(11): p. 545-554.
- Thompson, J.**, Begenisich, T. Interaction between quaternary ammonium ions in the pore of potassium channels. Evidence against an electrostatic repulsion mechanism. *J Gen Physiol*, **2000**. 115(6): p. 769-782.
- Tominaga, M.**, Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D., The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, **1998**. 21(3): p. 531-543.
- Tokumura, A.**, Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K., Fukuzawa, K., Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry*. **2002**. 277: p. 39436-39442.
- Ueda, H.**, Matsunaga, H., Olaposi, O.I., Nagai, J., Lysophosphatidic acid: chemical signature of neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta*, **2013**. 1831(1): p. 61-73.
- Umezu-Goto, M.**, Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G.B., Inoue, K., Aoki, J., Arai, H., Autotaxin has lysophospholipase D

- activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *The Journal of cell biology*. **2002**. 158: p. 227-233.
- van Corven, E.J.**, Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T., Moolenaar, W.H., Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, **1989**. 59(1): p. 45-54.
- van der Brink-van der Laan, E.**, Killian, J. A., de Kruijff, B. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica e Biophysica Acta- Biomembranes*, **2004**. 432(1): p. 35-35.
- Weiss, J.N.**, The Hill equation revised; uses and misuses. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, **1977**. 11(11): 835-841
- Yang, F.**, Xiao, X., Cheng, W., Yang, W., Yu, P., Song, Z., Yarov-Yarovoy, V., Zheng, J., Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nature Chemical Biology*, **2015**. 11(7): p. 518-524.
- Yang, F.**, Zheng, J. Understad spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein Cell*, **2017**. 8(3): p. 169-177.
- Yang, F.**, Xiao, X., Lee, B.H., Vu, S., Yang, W., Yarov-Yarovoy, V., Zheng, J., The conformational wave in capsaicin activation of transient receptor potential vanilloid 1 ion channel. *Nature Communications*, **2018**. 9: p. 1-9.
- Yarov-Yarovoy, V.**, DeCaen, P., Westenbroek, R.E., Pan, C.H., Scheuer, T., Baker, D., Catterall, W., Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *PNAS*, **2012**. 109(2): p. E93-102.
- Yung, Y.C.**, Stoddard N.C., Chun, J., LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res*, **2014**. 55(7): p. 1192-1214.
- Zheng, J.**, Ma, L., Structure and Function of the ThermoTRP Channel Pore. *Curr Top Membr*, **2014**. 74: p. 20-50