



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Efectos alostéricos del canal TRPV4”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Emmanuel Juárez González

Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dra. Adela Rodríguez Romero  
[Facultad de química](#)

Dra. Myrian Velasco Torres  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. enero, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo fue financiado por el consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) por el proyecto con numero A1-S-08760, por el programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con clave IN200720 y por la secretaria de educación, tecnología e innovación (SECTEI) con la clave de proyecto SECTEI/208/2019 otorgados a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir.

Este trabajo no habría sido posible de no ser por contar con una beca CONACyT con numero 902482 para mis estudios de maestría.

“Cualquier conocimiento que no genera nuevas dudas muere rápidamente, falla en mantener la temperatura necesaria para continuar viviendo”

-Wisława Szymborska

## **Agradecimientos**

A la Dra. Tamara Rosenbaum por permitirme formar parte de su excelente grupo de trabajo y ayudar a mi continua formación como científico e investigador con sus enseñanzas y apoyo.

A la Biol. Itzel Alejandra Llorente Gil por su invaluable ayuda técnica para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Sara Luz Morales por sus consejos que disiparon varias dudas y ayudaron a mejorar este proyecto.

A Félix Sierra por su ayuda y sus enseñanzas en el manejo adecuado de los equipos.

A la Dra. Myrian Velasco y a la Dra. Adela Rodríguez Romero por formar parte de mi comité tutor y por sus consejos y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda, apoyo y compañía durante estos años.

A los miembros del jurado de mi examen profesional por ayudarme a mejorar mi escrito y por sus preguntas enriquecedoras.

A mi familia por su constante apoyo y cariño.

## Índice

ABSTRACT	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
CANALES IÓNICOS	5
CANALES TRP	6
EL CANAL IÓNICO TRPV4	9
TRPV4 EN PULMÓN	12
ASMA	13
TRPV4 Y AGONISTAS DEL RECEPTOR B <sub>2</sub> -ADRENÉRGICO	14
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MÉTODOS	18
CULTIVO CELULAR	18
TRANSFECCIÓN	19
PATCH CLAMP	19
CURVA DE RESPUESTA EN FUNCIÓN DE LA DOSIS	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
RESULTADOS	23
LAS CÉLULAS HEK293 EXPRESAN TRPV4	23
EL SALBUTAMOL INHIBE LA CORRIENTE DE TRPV4 PERO NO DE TRPV1	26
EL EFECTO DEL SALBUTAMOL SOBRE EL CANAL ES INDEPENDIENTE DEL RECEPTOR B <sub>2</sub> -ADRENÉRGICO	31
EL SALBUTAMOL Y EL ICI 118,551 SE UNEN AL MIMO SITIO EN EL CANAL	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIÓN	40
BIBLIOGRAFÍA	41

## Abreviaturas

<b>4<math>\alpha</math>PDD</b>	4- $\alpha$ forbol didecanoato
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ANK</b>	Anquirina
<b>ARD</b>	Dominio de repeticiones de anquirina
<b>BSA</b>	Suero fetal bovino
<b>CTD</b>	Dominio carboxilo terminal
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DRG</b>	Ganglio de la raíz dorsal
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GPCR</b>	Receptor asociado a proteína G
<b>HEK293</b>	Células embrionarias de riñón humano
<b>HTH</b>	Dominio hélice-giro-hélice
<b>LABA</b>	Agonista beta-adrenérgico de larga duración
<b>LPA</b>	Ácido lipofosfatídico
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PLA</b>	Fosfolipasa A
<b>SABA</b>	Agonista beta-adrenérgico de corta duración
<b>TRP</b>	Receptor de potencial transitorio

## **Abstract**

The Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) is a nonselective cation channel that is permeable to  $\text{Ca}^{2+}$  and responds to moderate heat and to hypoosmotic and chemical stimuli. This channel is expressed in several organs and cells including: adipocytes, keratinocytes, liver, brain, kidneys, lungs, and skeletal muscle. TRPV4 participates in osmotic processes, regulation of cellular volume, changes in temperature, mechanosensation, synapse, nociception, bone formation and bone remodeling.

In the lungs, TRPV4 is expressed in the smooth muscle, endothelial vascular and alveolar epithelial cells as well as in immune cells such as macrophages and neutrophils, where it functions as a critical regulator of the pulmonary endothelial barrier integrity. The activation of TRPV4 in the endothelia induces an acute increment in vascular permeability and leads to the damage of the alveolar barrier and pulmonary edema, phenomena that are less frequent in mice lacking TRPV4 expression.

TRPV4 participates in the generation of asthma, a chronic pulmonary disease that is treated with different agonists of  $\beta$ 2-adrenergic receptors that serve as bronchodilators and control bronchospasms.

Regardless of the important role of TRPV4 in various organs, few agonists and antagonists have been identified for this channel and the molecular details of the relationships between its structure and its function are not fully understood. Hence, in this study we have focused on establishing if salbutamol and others agonists (and antagonists) of  $\beta$ 2-adrenergic receptors promote changes in the activity of TRPV4.

The findings show that salbutamol and other structurally and functionally similar molecules inhibit TRPV4-mediated currents, through a mechanism that does not seem to involve the activation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptors signaling pathways.

## Resumen

El receptor del potencial transitorio vaniloide 4 (TRPV4) es un canal catiónico no selectivo permeable a iones  $\text{Ca}^{2+}$  que es activado por estímulos que van desde hinchamiento de la célula, calor moderado hasta estímulos químicos. Este canal se expresa en varios órganos y células que incluyen: adipocitos, queratinocitos, hígado, cerebro, riñones, pulmones y músculo esquelético por lo que su actividad se ha relacionado con procesos como osmosis y regulación del volumen celular, sensibilidad a cambios en la temperatura, mecanosensación, transmisión sináptica, nocicepción y formación y remodelación ósea.

En el pulmón, el TRPV4 se encuentra expresado en músculo liso, células vasculares endoteliales, células epiteliales alveolares, y células inmunes como macrófagos y neutrófilos, donde funciona como un regulador crítico en la integridad de la barrera endotelial pulmonar. La activación de TRPV4 en el endotelio provoca un incremento agudo en la permeabilidad vascular, ruptura de la barrera alveolar y edema pulmonar, procesos que son menos prevalentes en ratones mutantes carentes de este receptor.

El asma es una enfermedad pulmonar crónica en la que se ha encontrado que el TRPV4 participa. Para el tratamiento del asma y de otros padecimientos similares se utilizan agonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico que funcionan como broncodilatadores y controlan los broncoespasmos.

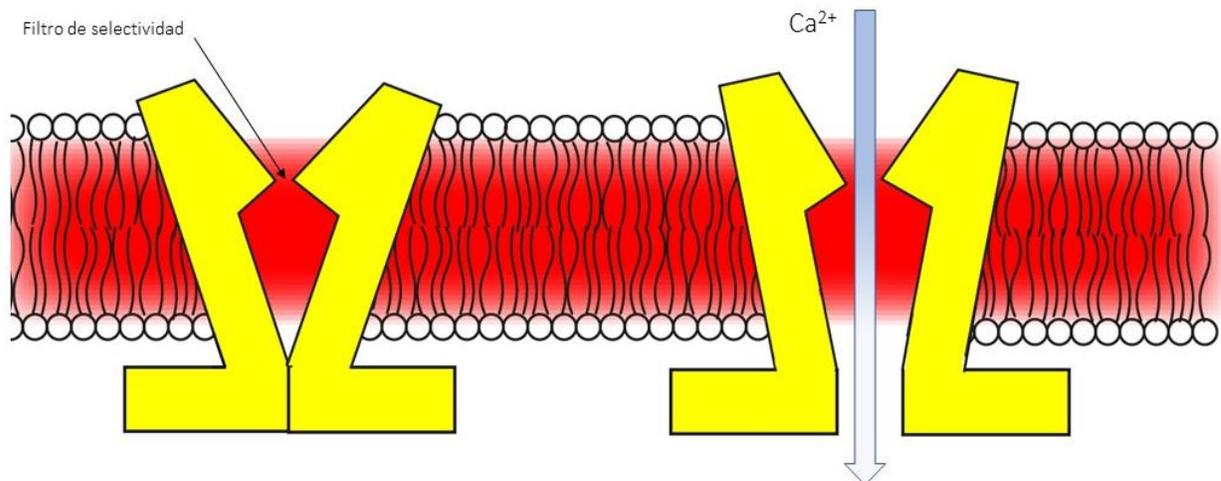
Pese a que el TRPV4 juega importantes funciones en diversos órganos, se han identificado pocos agonistas y antagonistas de este canal y tampoco se entienden los detalles moleculares de las relaciones que existen entre su estructura y su función. De lo anterior se deriva que, en este trabajo, nos enfocamos en determinar si el salbutamol y otros agonistas de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos promueven cambios en la actividad del canal TRPV4 y en determinar los mecanismos moleculares involucrados en estos efectos.

Los resultados muestran que el salbutamol al igual que otros agonistas y un antagonista del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico inhiben la corriente del canal TRPV4 significativamente, también los registros electrofisiológicos demuestran que hay una interacción directa entre estos compuestos y el canal TRPV4 y que esta interacción se lleva a cabo de manera extracelular no necesitando del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico para modificar la conductancia del canal.

## Introducción

### Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que forman poros que permiten la regulación del flujo de aniones y cationes a través de la membrana. Estas estructuras se encuentran formadas por diferentes subunidades que rodean a un poro central hidrofílico, permitiendo que los iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Cl}^-$ ) fluyan a través de ellos a favor del gradiente electroquímico, atravesando la membrana de un lado al otro (Figura 1) (Fermini, 2008; Gadsby, 2009).



**Figura 1.** Los canales iónicos funcionan como poros que regulan el flujo de iones a favor de su gradiente electroquímico.

Estas proteínas poseen un *filtro de selectividad*, lo que permite que solo determinados iones inorgánicos de carga y tamaño apropiado pasen a través de ellos. Para esto, ciertos aminoácidos en el poro del canal deben eliminar a la mayoría de las moléculas de agua asociadas a ellos y así pasar a través de la porción más estrecha del canal. En estas proteínas, el transporte de iones es de carácter pasivo, logrando tasas de conducción iónica altas (alrededor de 100 millones de iones por segundo) cuando el canal se encuentra abierto (Fermini, 2008; Gouaux & Mackinnon, 2005).

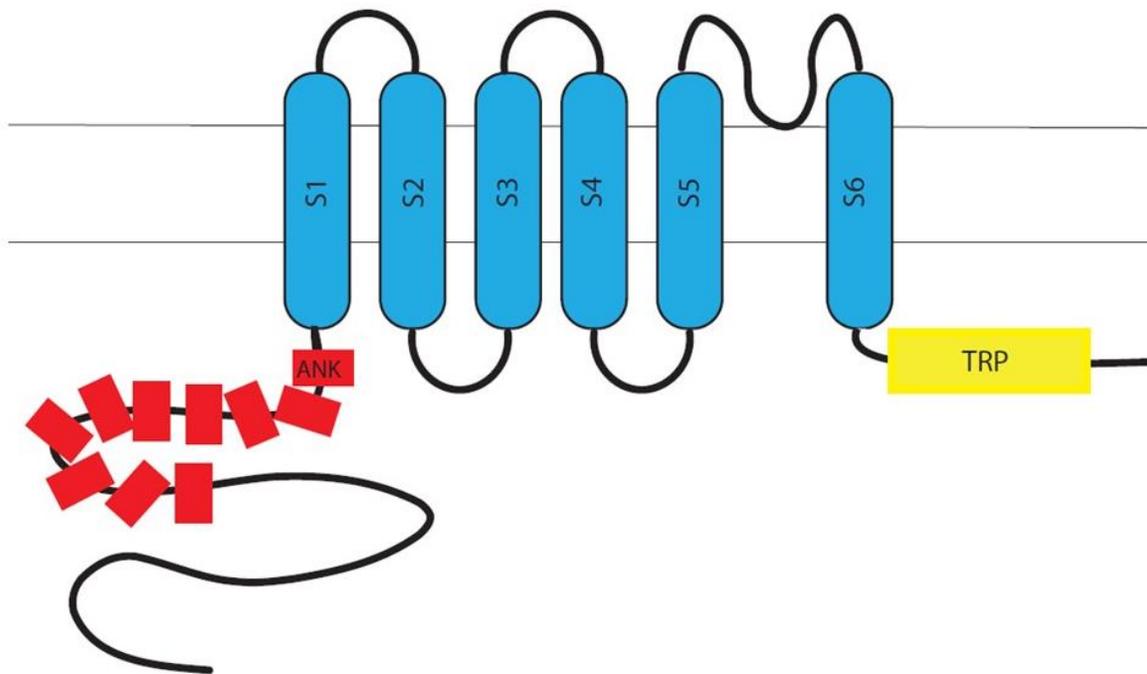
En el genoma humano, se han identificado 404 genes que codifican para canales iónicos. Entre estos, cerca de 170 codifican para canales de potasio, 58 codifican para canales de cloruro, 38 codifican para canales de calcio, 29 codifican para canales de sodio y de 27 a 32 codifican para receptores del potencial transitorio (TRP). En este trabajo nos hemos enfocado en el estudio de uno de los miembros de la familia de canales TRP y a continuación se describen las características de estos (Emir, 2017; Venter et al., 2001).

## **Canales TRP**

Los canales iónicos TRP reciben su nombre a partir de una proteína identificada por Cosens y Manning (Cosens & Manning, 1969) en una mosca *Drosophila* mutante, en la cual las células fotorreceptoras exhibían una respuesta transitoria a la luz en lugar de una sostenida. Dos décadas después, al gen mutado causante de este fenotipo se le llamó *trp* y su producto se identificó como un canal permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  (Emir, 2017; Montell & Rubin, 1989).

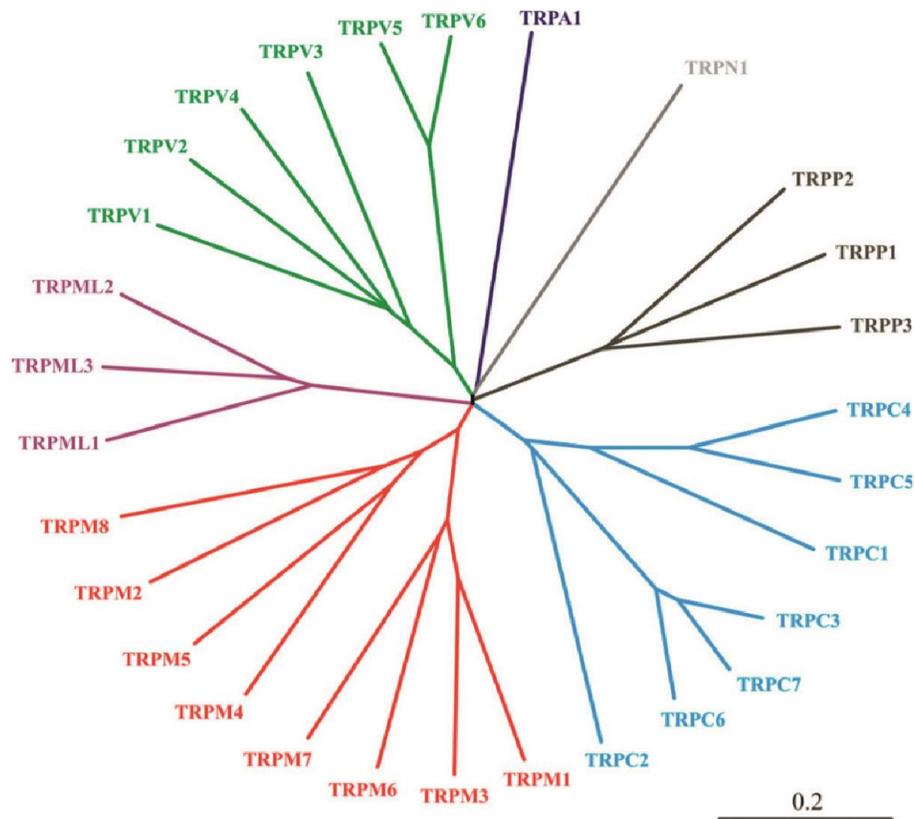
La búsqueda de genes relacionados al gen *trp* dio como resultado la identificación y caracterización de más de 50 genes en levaduras, gusanos, insectos, peces y mamíferos, donde los miembros de la familia de canales TRP destacan por desempeñarse como “sensores” celulares que participan en funciones fisiológicas como: la regulación de las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , la termosensación, tacto, nocicepción, control osmótico, audición, y la generación de potenciales de acción en células excitables (Emir, 2017; Montell & Rubin, 1989; Ramsey et al., 2006).

Los miembros de esta familia son canales permeables a cationes, con una configuración estructural característica de 6 dominios transmembranales (nombrados S1-S6), similares a los de los canales de potasio activados por voltaje. Cada canal se ensambla en forma de homotetrámeros o heterotetrámeros y se inserta en las membranas celulares, formando un poro hidrofílico que, al estar abierto, es capaz de permitir la entrada de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , dando lugar a la generación de corrientes eléctricas a través de las membranas de las células. En los canales TRP, los dominios N (amino)- y C (carboxilo)-terminales están localizados siempre de forma intracelular (figura 2) (Clapham et al., 2005; Emir, 2017; Montell & Rubin, 1989; Ramsey et al., 2006).



**Figura 2.** Estructura general de una subunidad de canal TRP con las 6 hélices intermembranales en azul donde el dominio del poro se encuentra entre S5 y S6, los dominios de anquirina (cuyo número varía entre miembros) en rojo y la caja TRP mostrada en amarillo

Actualmente, la clasificación de los canales TRP se basa en la homología entre sus secuencias de aminoácidos, de tal forma que los 28 miembros TRP se dividen en 7 subfamilias (Figura 3). La subfamilia TRPC recibe su nombre de “clásica o canónica”, por ser la primera que se describió y por estar estrechamente relacionada con el primer canal TRP identificado en *Drosophila*, mientras que las siguientes están basadas en la designación original que se dio al primer miembro de cada subfamilia: TRPV (“vaniloide”), TRPM (“melastatina”), TRPA (“anquirina”), TRPN (“NOMP-C”), TRPP (“policistina”) y TRPML (“mucolipina”) (Nilius & Owsianik, 2011; Ramsey et al., 2006). De ellos, la familia TRPN no se expresa en mamíferos sino en algunos invertebrados como gusanos y el TRPC2 en humanos es un pseudogén. Las últimas dos subfamilias, TRPP y TRPML, son las proteínas relacionadas más lejanamente con los otros TRP, y en especial se considera que la subfamilia TRPP podría ser la más antigua debido a que sus miembros se encuentran presentes desde las levaduras hasta los mamíferos (Clapham, 2003; Emir, 2017).



**Figura 3.** Árbol filogenético de la familia de canales TRP. Debido a su homología, los canales TRP se separan en siete subfamilias con distintas propiedades. La frecuencia corresponde a una de 0.2 mutaciones por cada 100 aminoácidos como distancia evolutiva de cladación (Nilius & Szallasi, 2014).

Otras características estructurales de estos canales son la presencia de los dominios repetidos de anquirina (ARD, *ankyrin repeat domains*) en el extremo amino terminal de los canales y del dominio TRP en el extremo carboxilo terminal. Este último es una secuencia de 25 aminoácidos que se encuentra inmediatamente después del dominio transmembranal S6 de la proteína y que está conservada en todas las familias de TRPs de mamíferos excepto en TRPA y TRPP (Emir, 2017; Ramsey et al., 2006; Wu et al., 2010). La caja TRP es una secuencia rica en prolinas que puede, bajo ciertas condiciones, servir para producir cambios en las propiedades de compuerta (cierre y apertura del canal) (Canul-Sánchez et al., 2018; Gaudet, 2006)

El TRP de *Drosophila*, no está directamente involucrado en la detección de la luz, sino que se activa mediante la señalización de la fosfolipasa C (PLC) que sigue a la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), por lo que no es extraño que los primeros estudios sobre la activación y modulación de los canales TRP se hayan centrado en las cascadas de señalización de los GPCRs. Dentro de la familia TRP, lo más sorprendente es que un único canal TRP se puede activar a través de la acción de múltiples señales, esta sensibilidad a la activación polimodal sugiere que el estímulo fisiológicamente relevante para algún TRP dado será de acuerdo a su contexto celular específico (Dhaka et al., 2006; Ramsey et al., 2006; Voets et al., 2002).

En los mamíferos, los canales TRP se expresan en la membrana plasmática, aunque también se encuentran en las membranas de algunos organelos de las células de una gran diversidad de órganos y tejidos como: riñón, páncreas, hígado, sistema esquelético, corazón, pulmones, testículos y sistema nervioso (Clapham, 2003; Emir, 2017; Nilius & Owsianik, 2011).

En definitiva, el canal iónico TRPV1 es el miembro mejor estudiado de la familia de canales TRP (Ramsey et al., 2006). En comparación con el TRPV1, el canal TRPV4, miembro de la misma subfamilia, ha recibido menos atención en el campo de estudio de estas proteínas y hay pocos estudios sobre la biofísica de la activación de este canal. Más aún, se han descrito pocos activadores e inhibidores endógenos y exógenos para esta proteína que claramente tiene funciones fundamentales en la fisiología de los organismos. A continuación, se describirán brevemente las características biofísicas, estructurales y funcionales de este canal TRP.

#### **El canal iónico TRPV4**

El canal TRPV4, junto con los canales TRPV1-V3, pertenece al grupo de los llamados termo-TRPs, que se activan en respuesta a diferentes temperaturas, contribuyendo así a la sensación térmica. En específico, el canal TRPV4 se activa a temperaturas entre 25 y 35°C en los sistemas de expresión heteróloga (Liedtke et al., 2000; Nilius & Owsianik, 2011; Ramsey et al., 2006; Watanabe et al., 2002).

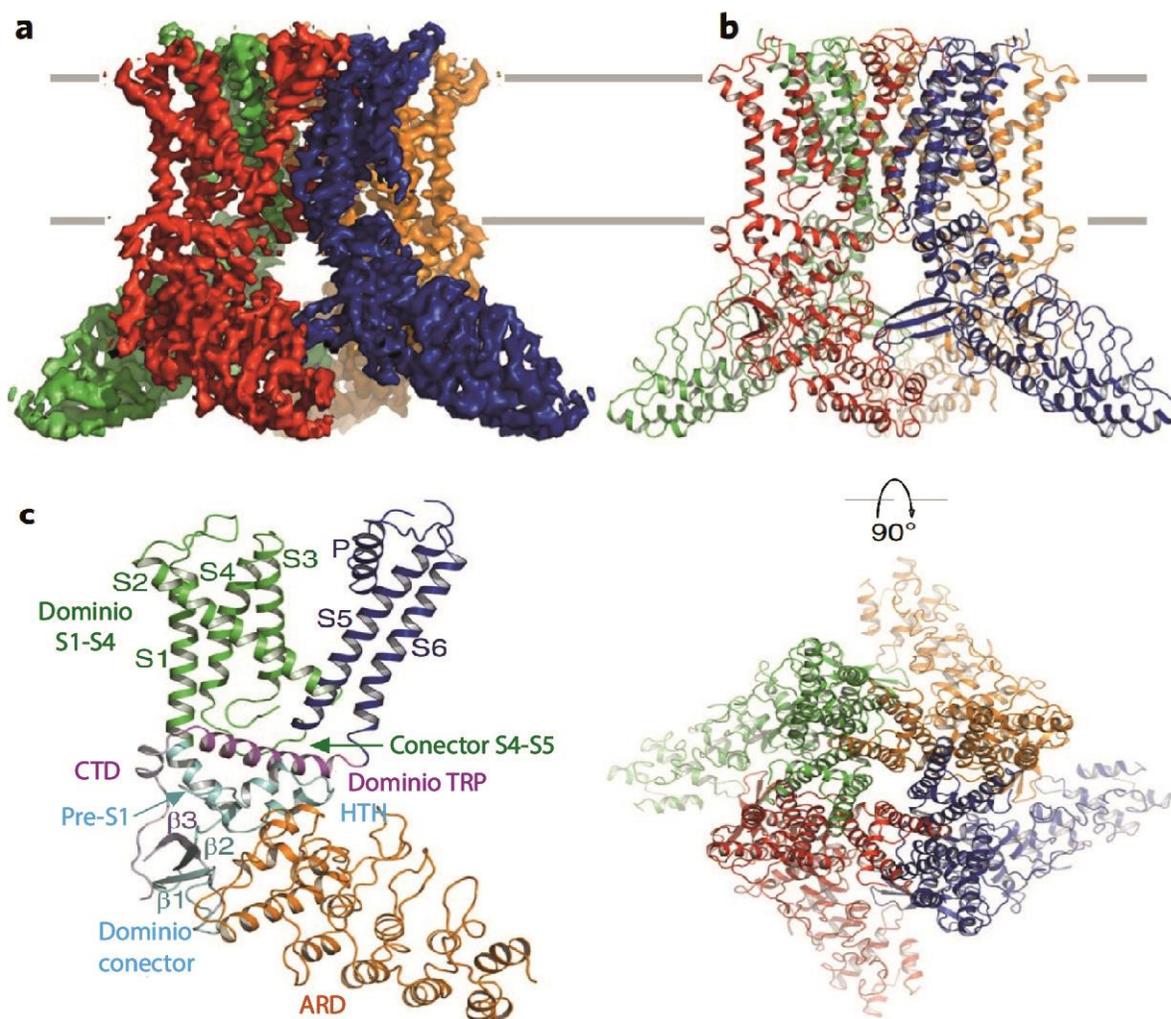
Otros agonistas no térmicos del canal incluyen: estímulos hiposmóticos y ésteres de forbol

como el 4- $\alpha$  forbol didecanoato (4 $\alpha$ PDD). El canal TRPV4 también se puede activar con compuestos como el bisandrografoloide A extraído de la planta *Andrographis paniculata* y agonistas sintéticos como el compuesto GSK1016790A (Smith et al., 2006; Thorneloe et al., 2008; Watanabe et al., 2002).

Al igual que el canal TRPV1, la actividad del canal TRPV4 está sujeta a modulaciones por otras moléculas, que pueden sensibilizar o desensibilizar al canal. La concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular es una de ellas. El calcio actúa a través de una proteína llamada calmodulina (CaM) cuya unión al dominio C- terminal del canal potencia las corrientes del TRPV4, para después desensibilizarlo (Jo et al., 2016; Ryskamp et al., 2016). Además, una gran cantidad de proteínas cinasas como los miembros de la familia Src de tirosinas cinasas (SFKs) o las proteínas cinasas A y C (PKA y PKC) son capaces de modular la actividad del TRPV4 (Ryskamp et al., 2016).

En cuanto a los inhibidores para este canal se han descrito: el rojo de rutenio, el gadolinio y moléculas sintéticas como el HC-067047, el RN1734, el GSK205 y el GSK2193874 (Jo et al., 2016; Ryskamp et al., 2016)

Recientemente se ha resuelto la estructura del canal TRPV4 de *Xenopus tropicalis* por medio de criomicroscopía electrónica (Cryo-EM). Esta estructura demuestra una disposición tetramérica con regiones N- y C-terminales intracelulares y un poro central formado por los dominios transmembranales S5-S6 (Figura 4) (Deng et al., 2018).



**Figura 4.** Estructura del canal TRPV4 obtenida por Cryo-EM. a) Reconstrucción del canal tetramérico. Cada subunidad se muestra con un color diferente y la membrana está indicada en líneas grises. b) Vista ortogonal de la estructura del canal. c) Estructura de una sola subunidad con cada dominio de diferente color. ARD: Dominio de repeticiones de anquirina, CTD: Dominio carboxilo terminal, HTH: dominio hélice-giro-hélice. (Deng et al., 2018).

El TRPV4 tiene una mayor afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  en comparación con otros cationes monovalentes como  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , cuyo orden de selectividad es:  $\text{Ca}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ . A diferencia de los canales altamente selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  como lo son TRPV5 y TRPV6, la selectividad del TRPV4 por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  con una relación de  $\text{PCa}^{2+}/\text{PNa}^+$ : 6-10

(Ryskamp et al., 2016; Venkatachalam & Montell, 2007; Voets et al., 2002).

En cuanto a la relación corriente a voltaje (I/V) de este canal, se le ha descrito un comportamiento rectificador saliente (en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) en respuesta a su activación. Dependiendo del tipo celular y del estímulo que haya promovido su apertura, la conductancia de un solo canal de TRPV4 varía generalmente entre 50 a 70 pS (Ramsey et al., 2006; Ryskamp et al., 2016).

Este canal se aisló por primera vez en células de riñón de rata (Liedtke et al., 2000), y se ha descrito su expresión en las células del hígado, células de Merkel, células gliales, músculo liso, vasos sanguíneos, vejiga, queratinocitos, testículos, endotelios, colangiocitos, corazón, cóclea y el sistema nervioso, principalmente en el núcleo supraóptico y en las fibras simpáticas y parasimpáticas que inervan el intestino, glándulas sudoríparas, glándula mamaria, riñones e hígado, así como en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) (Clapham et al., 2001; Jo et al., 2016; Liedtke, 2005; Nilius & Owsianik, 2011).

Dentro de las funciones fisiológicas que se le han asociado al TRPV4 se incluyen: termosensación (calor moderado), mecanosensación, nocicepción, modulación de la migración celular, control endotelial vasomotor, osteogénesis y función osteoclástica, participación en el control de uniones adherentes en la piel y osmorregulación (Liedtke, 2005; Nilius & Owsianik, 2011).

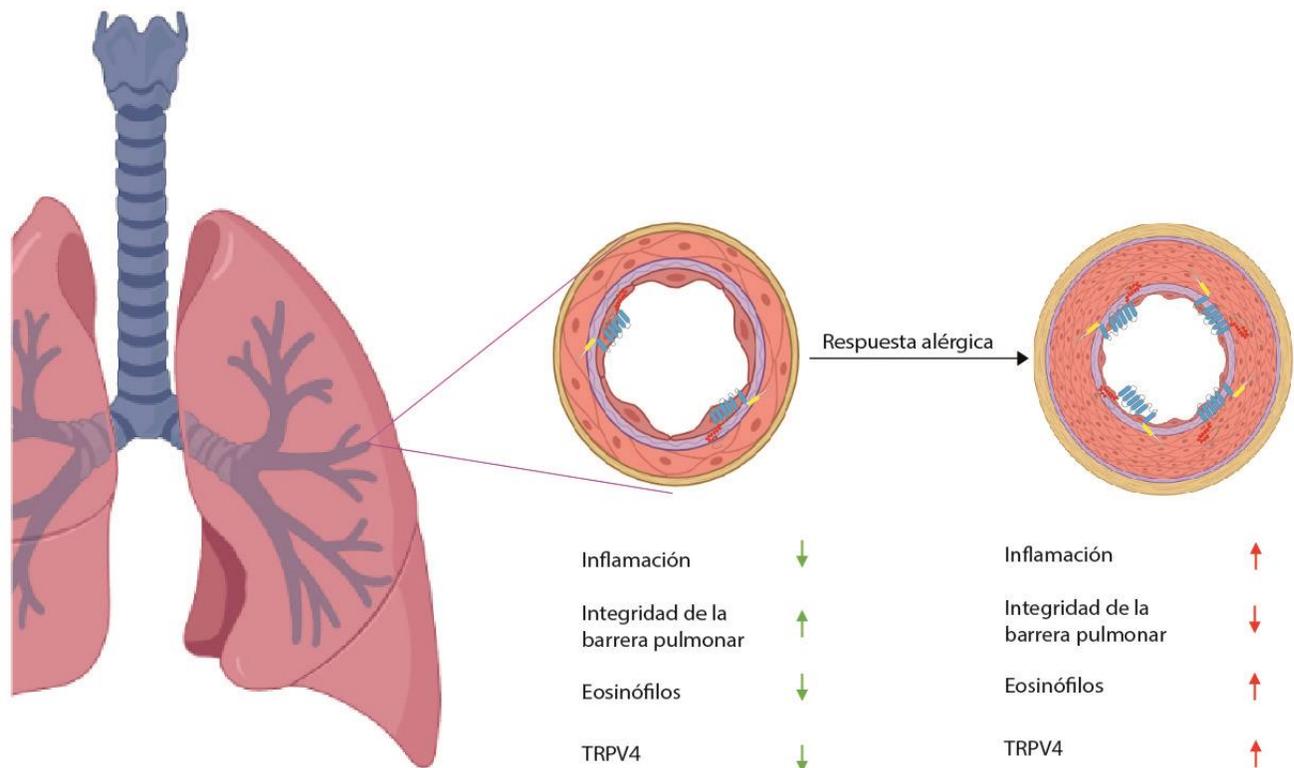
### **TRPV4 en pulmón**

Entre otros órganos, se ha detectado la expresión de TRPV4 en células epiteliales de pulmón, en el endotelio vascular y en macrófagos, contribuyendo a la ruptura de la barrera pulmonar y promoviendo al edema pulmonar cuando es activado por fármacos que fungen como agonistas directos del canal o por aumento en la turgencia de la célula (Alvarez et al., 2006; Hamanaka et al., 2007). El canal TRPV4 se ha identificado como un mediador importante de la actividad pulmonar en modelos animales, se ha visto involucrado de manera importante en condiciones asociadas a un aumento dramático en la presión pulmonar (Balakrishna et al., 2014; Hamanaka et al., 2007). Se ha detectado la expresión de TRPV4 en células epiteliales del sistema respiratorio en humano, especialmente en los bronquios donde parece

participan en la osmorregulación de estas células (Jia et al., 2004).

Estos efectos se deben al flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de las células endoteliales y vasculares que es mediado, en parte, por el TRPV4 y resultando en la contracción de las células epiteliales, incrementando así la permeabilidad endotelial y promoviendo la dificultad para respirar. Además, hay estudios que muestran que la actividad de TRPV4 en los macrófagos pulmonares juega un papel importante en el desarrollo de lesiones pulmonares inducidas por hiperventilación (Hamanaka et al., 2010).

Ratones carentes del canal TRPV4 muestran un menor desarrollo de síndrome agudo de distrés respiratorio inducido, en lesión pulmonar aguda, edema pulmonar, asma e infiltración de neutrófilos por inflamación pulmonar (Balakrishna et al., 2014; Gombedza et al., 2017a, 2017b; Hamanaka et al., 2010; Jian et al., 2008; Xia et al., 2013a, 2013b; Yin et al., 2008, 2016b).



**Figura 5.** Papel del canal TRPV4 en la respuesta inmune en endotelio de pulmón. Al haber una respuesta alérgica en el pulmón se inicia un proceso de inflamación que conlleva al desarrollo de fibrosis pulmonar y la ruptura de la barrera alvéolo capilar, esto provoca un

incremento en la filtración de neutrófilos y un incremento en la expresión de TRPV4.

## **Asma**

El asma es la enfermedad inflamatoria más común en los pulmones y se caracteriza por una combinación de inflamación y remodelación estructural de las vías respiratorias. El 80% de los pacientes con asma presentan inflamación tipo T2 causada por una respuesta alérgica, mientras que el resto está presente en pacientes de edad avanzada y se asocia a obesidad e infiltración neutrofílica (Holgate et al., 2015). Las vías respiratorias presentan un incremento en músculo liso, engrosamiento de la lámina subepitelial reticular, angiogénesis, proliferación neuronal y metaplasia del epitelio de la mucosa. El daño epitelial resulta por la separación de las células columnares de las células basales; a través del continuo ciclo de daño y reparo epitelial, se genera la inflamación crónica característica del asma (Holgate et al., 2015; Ledford & Lockey, 2013).

Las causas de esta enfermedad pueden ser: una reacción alérgica, una infección viral, sobreexposición a contaminación ambiental, exposición a humo de cigarro y obesidad aunque en la mayoría de los casos una predisposición hereditaria es necesaria para el desarrollo de la inflamación crónica (Holgate et al., 2015).

## **TRPV4 y agonistas del receptor $\beta_2$ -adrenérgico**

Los agonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico conforman la terapia de primera línea para el tratamiento del asma y de otras enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Estos compuestos actúan sobre los receptores  $\beta_2$ -adrenérgico que se encuentran en el endotelio del músculo liso de las vías respiratorias. La activación de este receptor conlleva la relajación de las vías respiratorias a través de un mecanismo de acción que resulta en la disminución de  $Ca^{2+}$  libre en la célula (Figura 7). Este receptor no solo se encuentra en las células de músculo liso de las vías respiratorias, también se puede encontrar en otras células del pulmón incluyendo células epiteliales, células de la mucosa, endotelio vascular y en algunos tipos de células que intervienen en la inflamación como monocitos, macrófagos y neutrófilos (Barnes,

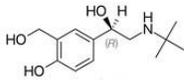
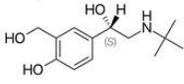
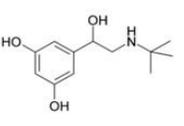
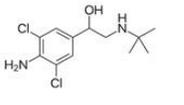
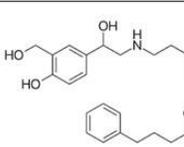
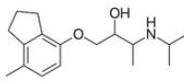
2004; Billington et al., 2016).

El receptor  $\beta_2$ -adrenérgico forma parte de los receptores asociados a proteínas G (GPCR) y fue de hecho el primer GPCR que se clonó. Al igual que los otros GPCRs, el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico está conformado por siete dominios transmembranales, un dominio N- terminal extracelular y un dominio C- terminal intracelular. Los agonistas se unen de forma no covalente al sitio activo de unión a epinefrina del receptor y estabilizan al receptor en su conformación activa. El receptor pasa más tiempo en su forma activa y desencadena la síntesis de AMP cíclico (cAMP) por medio de la adenilato ciclasa. A su vez, el cAMP desencadena una cascada de señalización dentro de la célula que termina en la liberación de  $K^+$  y disminuye el  $Ca^{2+}$  intracelular libre, impidiendo que el músculo se contraiga (Ullmann et al., 2015).

Un efecto secundario de la activación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico es que, al aumentar el cAMP en la célula, aumenta los niveles de la proteína cinasa A (PKA) la cual depende de cAMP para su activación, que es responsable de la sobreexpresión y fosforilación del canal TRPV4. Se ha visto que modelos animales carentes de la proteína PKA tienen una disminución de sensación al calor, dolor e inflamación mediada por la actividad de TRPV4 (figura 7) (Burnett et al., 2009; Jeske et al., 2008).

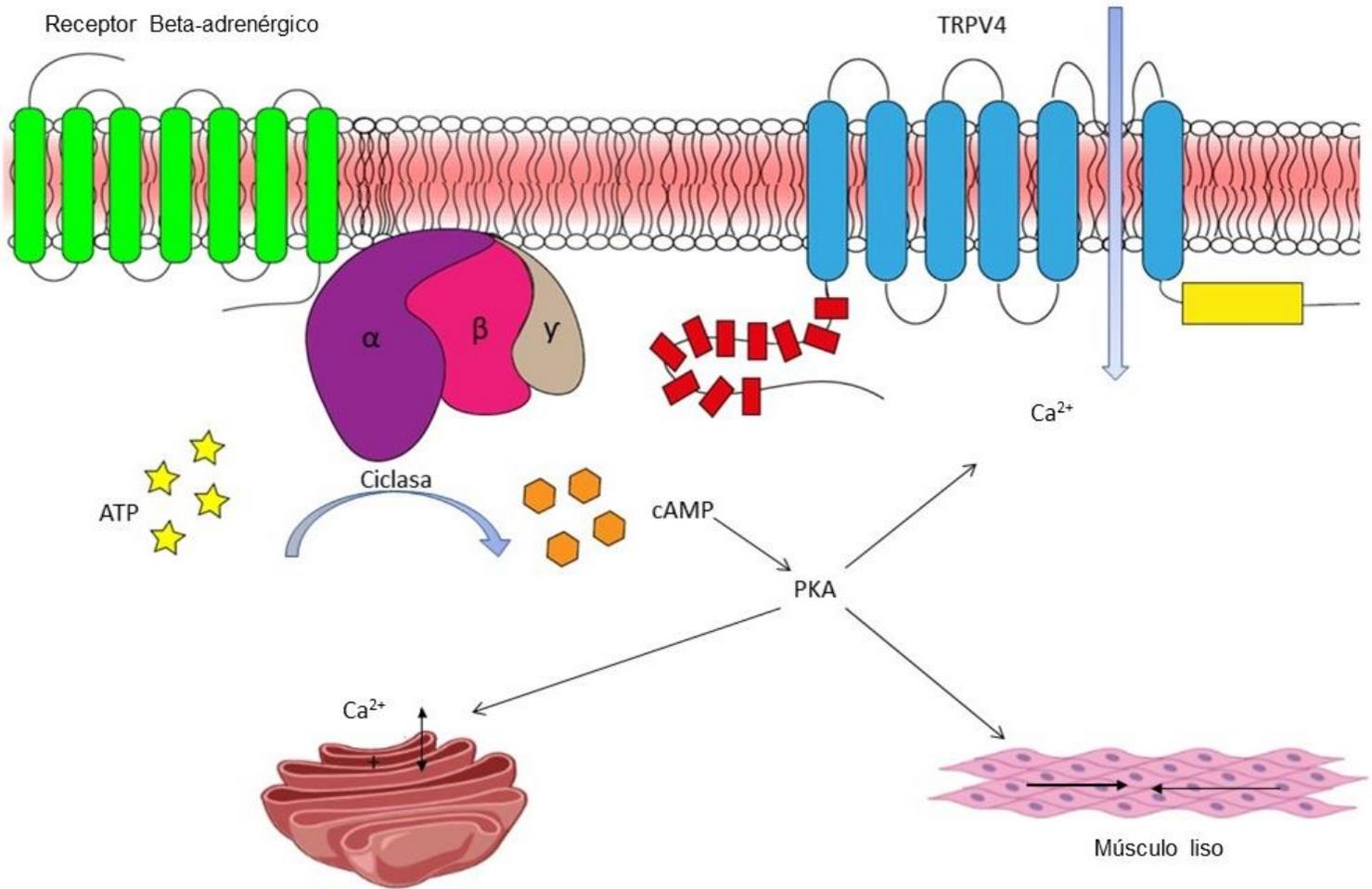
Los agonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico se dividen en tres categorías: beta-agonistas de corta duración (SABAs), beta-agonistas de larga duración (LABAs) y beta-agonistas de ultra larga duración (ultra-LABAs). Como su nombre lo indica, SABAs tienen una vida media corta y se usan como medicamentos de alivio rápido, mientras que los LABAs y ultra-LABAs provocan un alivio sintomático prolongado debido a su larga duración. Esta clasificación es importante a nivel clínico debido a que los LABAs y ultra-LABAs pueden causar efectos opuestos debido a su acción sostenida. El efecto prolongado de los LABAs no se debe a una diferencia en la afinidad por el receptor, sino en el hecho de que la molécula pasa más tiempo unida al receptor debido a su prolongada vida media (Billington et al., 2016). Los SABAs como la terbutalina, el salbutamol y su versión levógira el albuterol son los más usados para el tratamiento contra el asma agudo mientras los LABAs y ultra-LABAs como el clenbuterol, el salmeterol y el formoterol son solamente usados para prevenir la obstrucción crónica (EPOC) con ayuda de corticoesteroides debido a los riesgos de acción sostenida

anteriormente mencionados (Figura 6) (Ortega et al., 2007).

SABAs	Salbutamol	
	Albuterol	
	Terbutalina	
LABAs	Clembuterol	
	Salmeterol	
Antagonista	ICI 118,551	

**Figura 6.** Estructura de los agonistas y el antagonista más usados para el tratamiento de desordenes respiratorios. Se le llama salbutamol a la mezcla racémica de las versiones R y S mientras que el albuterol es solo el enantiómero S.

Los antagonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico por su parte compiten por el sitio de unión e impiden la activación del receptor por un agonista. Se ha visto que estos antagonistas pueden aumentar la resistencia alveolar en pacientes sin enfermedades pulmonares y en algunos que padecen asma pero que son asintomáticos. También son ampliamente usados en pacientes con problemas cardiacos (aquellos agonistas no selectivos para un solo tipo de receptor) o para tratar problemas relacionados con drogas simpaticomiméticas (Dulohery et al., 2016).



**Figura 7.** Mecanismo de acción del receptor beta-adrenérgico en la activación de PKA por cAMP y el efecto en TRPV4

A partir de su relación en enfermedades pulmonares, en este trabajo nos planteamos probar si el salbutamol, el cual es el SABA mayormente usado como tratamiento contra el asma, afecta la actividad del canal TRPV4 y determinar los mecanismos biofísicos que subyacen a dichos efectos.

### Hipótesis

El salbutamol modula la actividad del canal TRPV4 a través de una interacción directa con el canal.

## **Objetivo general**

- Estudiar si la actividad del canal TRPV4 es modulada por diferentes agonistas y antagonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y determinar los detalles moleculares de dichos efectos.

## **Objetivos particulares**

- Determinar si los agonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico activan o inhiben el canal TRPV4
- Estudiar si los antagonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico activan o inhiben el canal TRPV4
- Describir los efectos de los agonistas y antagonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico sobre las propiedades biofísicas del canal TRPV4

## **Métodos**

### **Cultivo celular**

Se utilizaron células HEK293 (Human Embryonic Kidney-293) como modelo de expresión heteróloga debido a que carece de corrientes iónicas endógenas asociadas a la actividad del canal TRPV4 y funciona como un modelo adecuado para el estudio de este canal y sus propiedades funcionales particulares.

Las células fueron cultivadas en cajas de Petri de plástico de 100 mm de diámetro (Corning) bajo las siguientes condiciones: atmósfera saturada de agua y compuesta por 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (BSA), 0.5% de penicilina-estreptomomicina y 1%

de aminoácidos no esenciales (L-glutamina).

Cada tercer día, cuando la caja Petri la monocapa que formaban se encontraba entre el 85 y 95% de confluencia, las células se resembraron de la siguiente manera: se despegaron las células de las cajas agregándoles 1 ml de una solución al 0.05% de tripsina-EDTA (GIBCO) y posteriormente 1 ml de DMEM suplementado, disociando mecánicamente. El volumen obtenido se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos y medio. El botón se resuspendió en medio de cultivo y se resembró a las células en una caja de Petri nueva. Esta misma suspensión celular permitió sembrar las células en cajas de Petri de plástico de 35 mm de diámetro sobre pequeños cuadros de vidrio estériles pretratados con poli-D-lisina. Las células sembradas se mantuvieron bajo las condiciones antes mencionadas y se transfectaron después de 24 horas.

### **Transfección**

Las células HEK293 se transfectaron con 1.5 µg de ADN que codifica para el canal TRPV4 de humano (hTRPV4) y con 500 ng de la proteína verde fluorescente (GFP) en el plásmido pEGFP-N3. Para todas las transfecciones se usó el agente de transfección JetPEI (Polypus Transfection).

Los complejos de transfección para cada ADN se formaron mezclando, por separado, al ADN del TRPV4 y del GFP con NaCl 150 mM hasta un volumen de 100 µl en un tubo, y en otro tubo JetPEI (3 µl) con NaCl 150 mM hasta el mismo volumen (100 µl). La mezcla que contiene el JetPEI se agregó a la mezcla con los ADN y el complejo final de 200 µl fue incubado por >30 minutos, agregándose gota a gota a las células en la caja Petri de 35 mm. Las células transfectadas expresaron al canal aproximadamente 48 horas después de la transfección. La eficiencia de la transfección se determinó al observar la fluorescencia de la GFP para los experimentos de electrofisiología.

### **Registro de corrientes con la técnica de Patch clamp**

La técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o “patch clamp” permite el registro en alta resolución y en tiempo real de corrientes iónicas que fluyen a través de la membrana plasmática de la célula. En distintas configuraciones, esta técnica ha permitido

observar qué pasa con las corrientes iónicas ya sea, a través de un solo canal o en toda la célula a través de varios canales. Esta técnica desarrollada por Neher y Sakmann en 1976 (Hamill et al., 1981) permite mediciones con un bajo grado de ruido de las corrientes pasando a través de los canales de baja conductancia, aislando un pequeño parche de membrana, el cual puede contener un solo canal.

Esta técnica se puede utilizar en las configuraciones: parche adherido (*on cell, cell attached*), célula completa (*whole-cell*) y parche escindido (*excised patch*), ya sea *inside-out*, en donde la cara intracelular del canal se expone a la solución del baño, u *outside-out* donde la cara extracelular del canal es expuesta ante la solución de baño

Las corrientes macroscópicas del TRPV4 se registraron usando las configuraciones de *outside-out* de la técnica de patch clamp, ya que el aislar al pedazo de membrana que contiene a los canales iónicos podemos separar el complejo contexto intracelular de los fenómenos que se desean estudiar. Para evaluar la respuesta del canal, se registró la corriente de fuga o inicial antes de exponer al canal a los compuestos. Los valores de las corrientes se obtuvieron usando un protocolo de voltaje en donde el potencial de mantenimiento o holding potential se fijó en 0 mV para posteriormente aplicar un pulso a -120 mV y +120 mV durante 100 ms para finalmente regresar a 0 mV. Las relaciones corriente-voltaje (I/V) se obtuvieron aplicando un protocolo de voltaje de -120 mV a +120 mV con incrementos de 10 mV durante 100 ms.

También se realizaron cursos temporales para poder observar el efecto del salbutamol con relación al tiempo, para esto se utilizó un pulso continuo de 5 minutos de duración a -60 mV al parche en configuración *outside-out* en presencia del agonista GSK1016790A, después agregando salbutamol y posteriormente GSK1016790A de nuevo para poder observar la recuperación del canal. Se ajustaron los datos a una exponencial simple y se reportó el promedio de las mediciones.

Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti-S) con lámpara de epifluorescencia (Nikon Intensilight C-HGFI), micromanipulador motorizado MP-225 (Sutter Instrument) y un sistema de recambio rápido de soluciones RSC-200 (BioLogic, Science Instruments). Las corrientes se filtraron a 2 kHz y muestrearon a 10 kHz con un amplificador EPC 10 (HEKA Elektronik). En todos los experimentos se usaron micropipetas de borosilicato con una resistencia de entre 5-8 M $\Omega$  y

fueron realizados a temperatura ambiente (22°C). Todos los registros se obtuvieron con el programa Patchmaster (HEKA Instruments).

### **Curva de respuesta en función de la dosis**

Se realizaron curvas de corriente del canal iónico TRPV4 activadas en respuesta a diferentes concentraciones de GSK1016790A. Las concentraciones empleadas para la curva fueron 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 175 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM y 4 µM preparados en la solución de registro a partir del stock a 15.25 mM de GSK1016790A. Los registros se obtuvieron en soluciones isotónicas (130 mM NaCl, 3 mM HEPES y 1 mM EDTA en baño y pipeta). Las curvas finales se obtuvieron al promediar los resultados de varias células distintas para cada concentración de GSK1016790A, donde el valor de corriente obtenido con la concentración más baja del agonista se normalizó contra el valor de corriente que se obtuvo con 1 µM de GSK1016790A en el mismo parche de membrana.

Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill:

$$\frac{I}{I_{max}} = \left[ \frac{1}{1 + \frac{[GSK1016790A]}{K_d}} \right]^n$$

En donde  $n$  es el coeficiente o número de Hill que representa el número estimado de moléculas que interaccionan con el canal,  $[GSK1016790A]$  es la concentración del ligando y  $K_D$  es la constante de disociación aparente.

A partir de este ajuste se determinaron la constante de disociación  $K_D$  y el coeficiente de Hill ( $n_{Hill}$ ) de GSK1016790A en el canal TRPV4 en la configuración outside-out de la técnica de patch clamp.

La curva de respuesta en función de la dosis de salbutamol se obtuvo en configuración cerrada, esto es, midiendo la corriente de fuga inicial del canal, aplicando GSK1016790A para observar la respuesta completa del canal con su agonista, después se retiró el

GSK1016790A lavando con solución de registro hasta que la corriente disminuyera a los valores cercanos de la corriente fuga (leak) y a continuación aplicando el salbutamol por 5 minutos para después observar la diferencia de corriente al aplicar el GSK1016790A nuevamente. Se compararon las corrientes obtenidas antes y después de la aplicación del salbutamol para obtener la fracción de corriente recuperada. Para los experimentos en los cuales se observó el efecto del salbutamol en el canal en configuración abierta no se retiró el GSK1016790A aplicando el salbutamol en presencia del agonista.

Para las curvas de inhibición se utilizaron los agonistas específicos del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico salbutamol hemisulfato (Sigma-Aldrich), albuterol hemisulfato (Sigma-Aldrich), clenbuterol hidrocloreuro (Sigma-Aldrich), terbutulina hemisulfato (Sigma-Aldrich) y el antagonista específico para el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ICI 118,551 (Sigma-Aldrich). Fueron almacenados según las instrucciones de uso y fueron disueltos en agua desionizada.

### **Análisis estadístico**

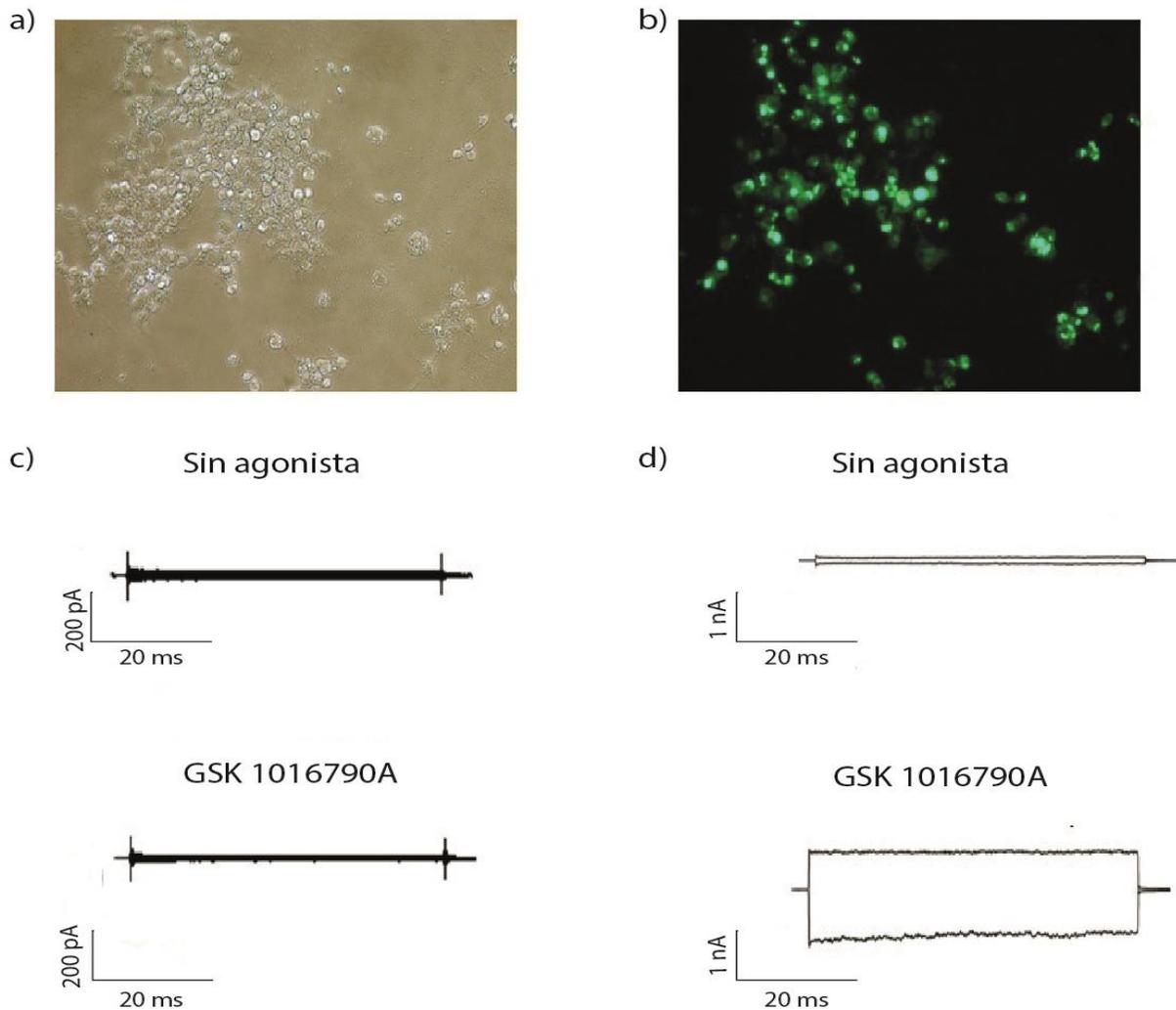
Los datos se graficaron con el promedio y el error estándar. Se verificó que los datos se ajustaran a una distribución normal y se utilizó una prueba de T de Student para la comparación tomándose un valor de  $p < 0.05$  como máximo para determinar la significancia. La fracción inhibida se calculó usando la corriente resultante de dividir la corriente después del tratamiento entre la corriente inicial obtenida con la mayor concentración del agonista en ausencia de tratamiento.

## Resultados

### *Las células HEK293 expresan TRPV4*

Para comprobar la correcta transfección de las células HEK293, éstas se observaron en un microscopio de fluorescencia y se comprobó la expresión de la proteína GFP. Se obtuvo una expresión satisfactoria del plásmido al observar que las células fluorecían con una intensidad aceptable (Figuras 8A y B).

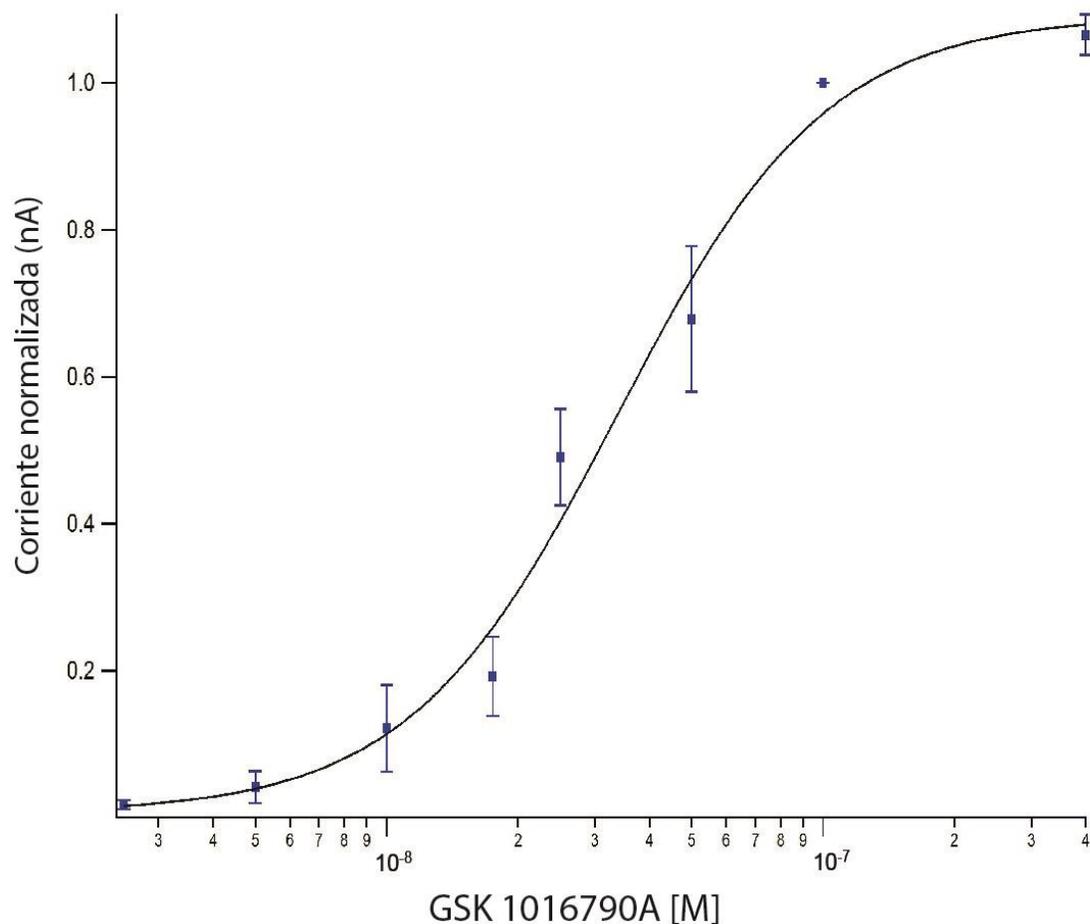
La especificidad del compuesto GSK1016790A se comprobó evaluando las corrientes en parches de membrana outside-out de células HEK293 no transfectadas y comparándolas contra células HEK293 transfectadas con 1.5 µg del ADN que codifica para el canal TRPV4. Los parches de membrana de células que no expresaron el canal no presentaron activación de corrientes iónicas, mientras que las células que expresaron el canal mostraron una robusta activación en respuesta al compuesto GSK1016790A (Figuras 8C y D).



**Figura 8.** Activación del canal TRPV4 en las células HEK293. En a) se muestran células sin transfectar y en b) se muestra la fluorescencia de la proteína GFP en las células ya transfectadas, lo que es prueba de que la transfección fue correcta. En c) y d) se observan las corrientes representativas obtenidas en parches de membrana en la configuración outside-out a 120 y -120 mV antes y después de la aplicación del agonista en células no transfectadas y transfectadas respectivamente.

A continuación, se realizó una curva de dosis respuesta con GSK1016790A para obtener la concentración a la cual se activan la mitad de los canales. Se utilizaron concentraciones desde 10 nM hasta 4  $\mu$ M y se normalizaron al valor máximo de la corriente a una concentración saturante.

Se encontró que la activación del canal TRPV4 aumenta al incrementar la concentración de GSK1016790A hasta alcanzar un máximo de activación. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill para obtener una constante de disociación aparente ( $K_D$ ) de 377  $\mu\text{M}$  (Figura 9). La  $K_D$  nos dice la concentración de GSK1016790A a la cual la mitad de los sitios posibles de unión al canal están ocupados.



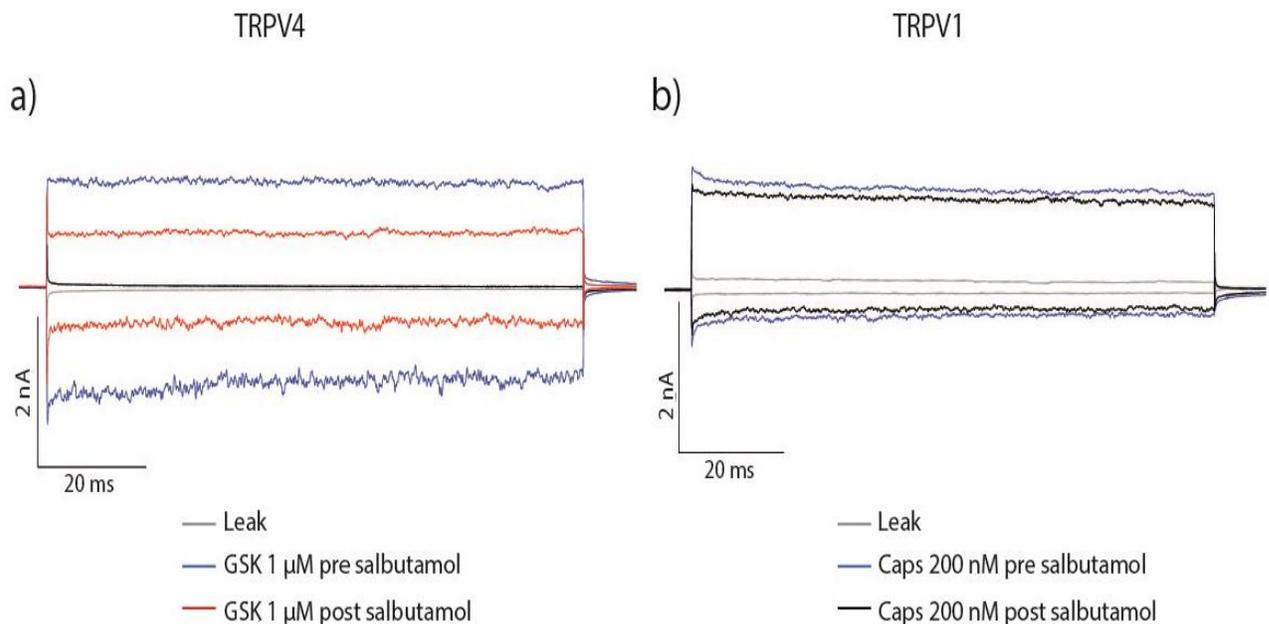
**Figura 9.** Curva de respuesta del canal TRPV4 a diferentes concentraciones de GSK1016790A. Cada punto representa el promedio de 5 experimentos con esa concentración y se muestran sus respectivos errores estándar, la línea muestra el ajuste a la ecuación de Hill

que arrojó un valor de  $K_D = 377 \text{ nM}$  y una  $n_{\text{Hill}}=2$ . Se normalizaron las corrientes con la activación de la máxima corriente a concentración saturante.

*El salbutamol inhibe la corriente de TRPV4 pero no de TRPV1*

Una vez determinada la IE50 para el agonista, se utilizó esta misma concentración para probar los efectos del hemisulfato de salbutamol (Sigma) a una concentración de  $500 \mu\text{M}$ . Se observó una disminución de casi el cincuenta por ciento en la corriente recuperada por el canal después de la aplicación del salbutamol en parches outside-out en configuración cerrada (Figura 10a).

Para comprobar el efecto específico del salbutamol sobre el canal TRPV4 se realizaron registros de corriente con el canal TRPV1 utilizando capsaicina a una concentración de  $200 \text{ nM}$  como agonista y aplicando la misma concentración de salbutamol en parches escindidos outside-out. A diferencia del canal TRPV4 el salbutamol no afectó la actividad del canal TRPV1 (Figura 10b).

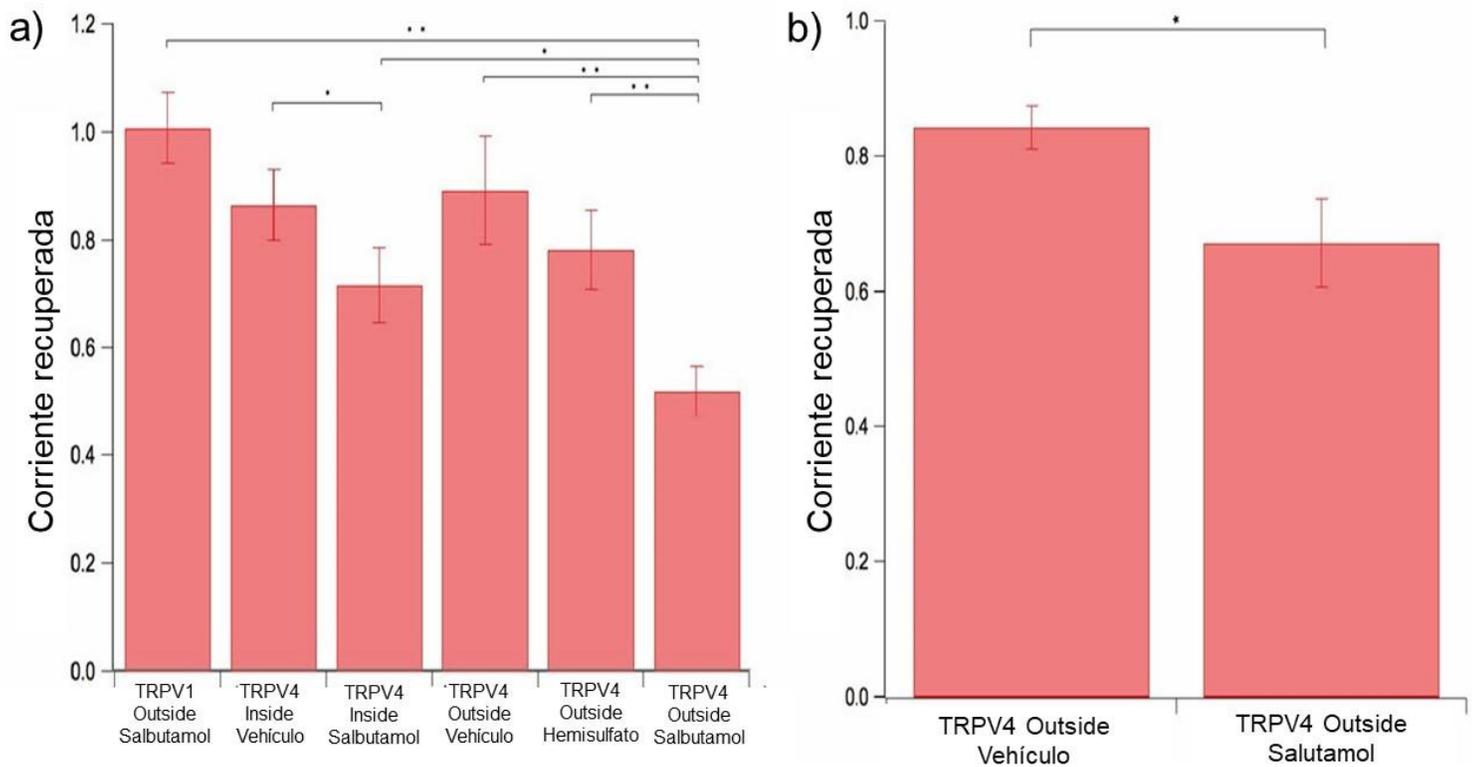


**Figura 10.** Inhibición de la corriente del canal TRPV4 por salbutamol. a) Corrientes activadas por GSK1016790A antes (trazo azul) y después (trazo rojo) de la aplicación de

salbutamol en la parte extracelular del canal TRPV4 durante 5 minutos. b) Corrientes activadas por capsaicina antes (trazo azul) y después (trazo negro) de la aplicación de salbutamol por la parte extracelular del canal TRPV1. Las corrientes fueron obtenidas aplicando voltajes de -120 y +120 mV.

Para descartar cualquier posible efecto sobre la activación del canal que no estuviera dado por el salbutamol se evaluó el efecto que pudiera tener el vehículo (agua) y el hemisulfato (excipiente) por si solo sobre la activación del canal, se trataron los parches con el mismo volumen de agua en el que se disolvió el salbutamol y concentraciones equivalentes de hemisulfato. El canal recuperó la mayoría de su corriente después de ser tratados con el vehículo y con el hemisulfato mostrando diferencias significativas en comparación con el salbutamol e indicando que el hemisulfato no es el responsable de los efectos que observamos con el salbutamol (Figura 11a).

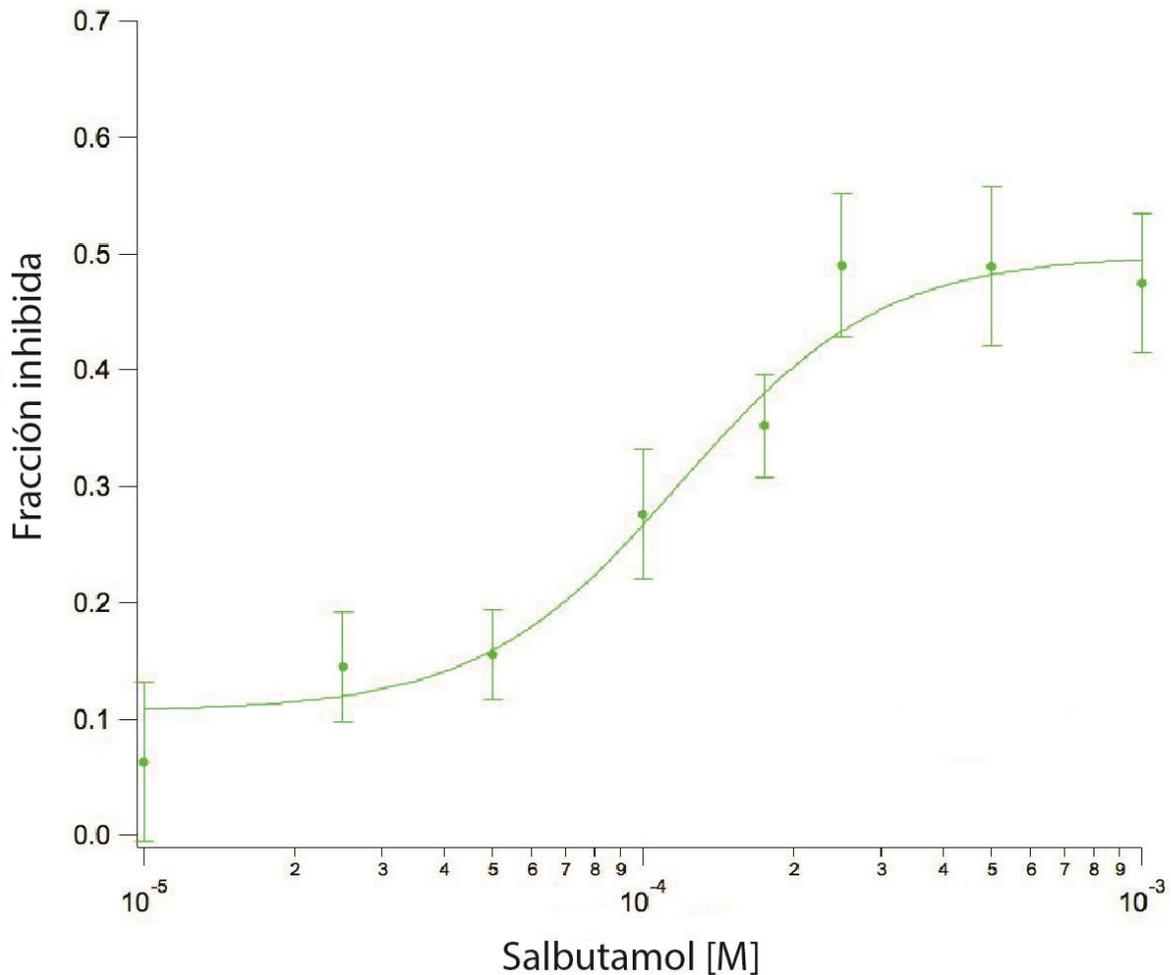
A continuación, se determinó la efectividad del salbutamol sobre el canal en parches inside-out, esto es, aplicando el GSK1016790A y el salbutamol por la parte intracelular del canal. Se observaron diferencias significativas entre el efecto que ejerce el salbutamol en parches inside-out y su efecto observado en los parches outside-out habiendo menos inhibición al ser aplicado en la parte intracelular del canal (Figura 11a). También se comparó el efecto que tiene el vehículo contra el efecto del salbutamol en parches inside-out y no encontramos diferencias significativas entre los dos tratamientos (Figura 11a). De igual forma se midió el efecto del salbutamol al aplicarlo al canal en estado abierto y se observó que el efecto inhibitorio persiste aunque en menor grado (Figura 11b).



**Figura 11.** El efecto inhibitorio del salbutamol es mayor al aplicarse a la parte extracelular del canal en configuración cerrada. Promedios de la fracción de corriente recuperada al activar el canal con 300 nM de GSK1016790A después de aplicar salbutamol en comparación con el vehículo y el excipiente por ambos lados del canal en configuración cerrada (a); TRPV1 Outside salbutamol= $1 \pm 0.07$  (n=12), TRPV4 Inside vehículo= $0.86 \pm 0.06$  (n=22), TRPV4 Inside salbutamol= $0.72 \pm 0.07$  (n=29), TRPV4 Outside vehículo= $0.89 \pm 0.1$  (n=18), TRPV4 Outside hemisulfato= $0.78 \pm 0.07$  (n=22), TRPV4 Outside salbutamol= $0.51 \pm 0.04$  (n=17). Y configuración abierta (b); TRPV4 Outside vehículo= $0.84 \pm 0.031$  (n=17), TRPV4 Outside salbutamol= $0.67 \pm 0.06$  (n=23). \* =  $p \leq 0.05$  y \*\* =  $p \leq 0.01$ .

Una vez que se comprobó la respuesta del canal TRPV4 al salbutamol, se procedió a realizar una curva dosis respuesta en parches outside-out. Se observó que el efecto del salbutamol es dependiente de la concentración, se ajustaron los datos a la ecuación de Hill y se obtuvo una constante de inhibición ( $K_I$ ) que representa la concentración a la cual el salbutamol ejerce la mitad de su actividad inhibitoria total. Se encontró que a 500  $\mu\text{M}$  se alcanzaba una inhibición

de casi el 50% de la corriente total dando una  $K_D$  de 118  $\mu\text{M}$  (Figura 12).

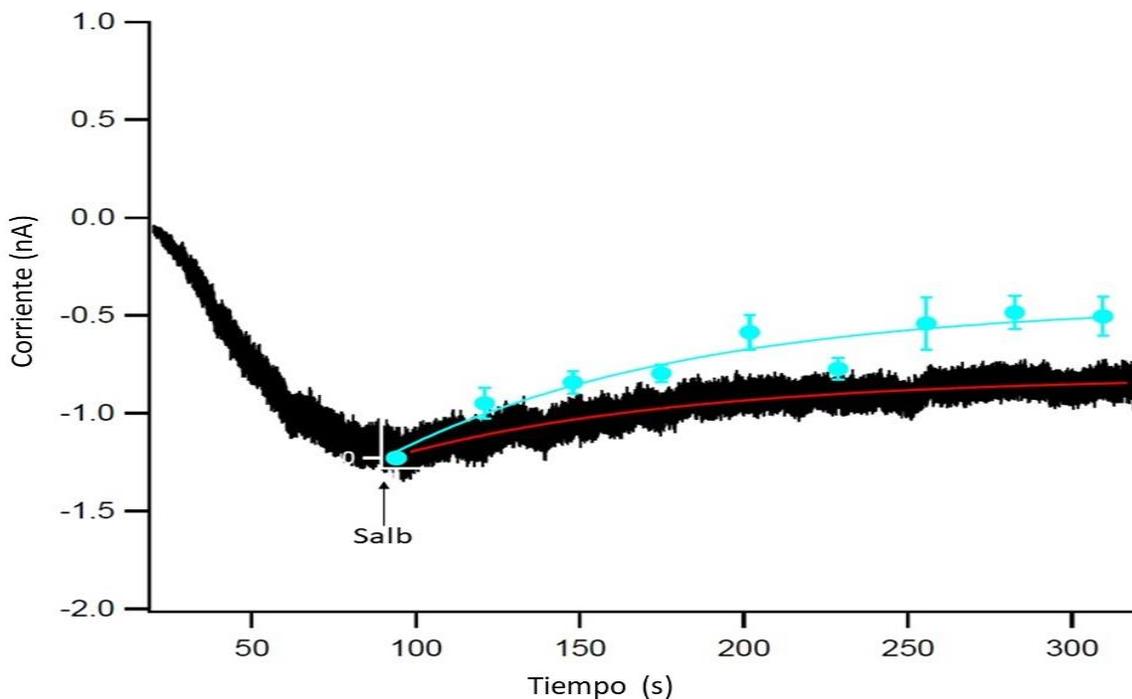


**Figura 12.** Curva de inhibición del salbutamol. Corriente inhibida por el salbutamol a diferentes concentraciones normalizando con la máxima corriente activada en ausencia de salbutamol. Cada punto representa el promedio de 10 experimentos, la línea muestra el ajuste a la ecuación de Hill la cual arrojó una  $K_D = 118 \mu\text{M}$  y una  $n_{\text{Hill}}=2$ . Se utilizó la corriente observada en ausencia del salbutamol para normalizar.

Se realizaron experimentos para determinar la velocidad de inhibición del salbutamol sobre el canal en estado abierto observando el decaimiento de la corriente inducida con GSK1016790A después de tratar con salbutamol en parches outside-out. Se aplicó un pulso

continuo de voltaje de -60 mV en presencia de 500  $\mu$ M de GSK1016790A hasta alcanzar el máximo de activación del canal, después se aplicó el salbutamol (en estado abierto) para determinar el decaimiento de la corriente en función del tiempo y, cuando se mantuvo estable, se volvió a aplicar el GSK1016790A para poder ver la recuperación de la corriente (Figura 13. línea roja). Se ajustó la curva de tiempo de inhibición a una exponencial simple y se obtuvo una velocidad de  $\tau=101$  s.

También se determinó la velocidad de inhibición que tiene el salbutamol en estado cerrado al medir la inhibición de la corriente después de tratar el parche con salbutamol a distintos tiempos (Figura 13. línea azul). Se observó que el salbutamol en estado cerrado tiene una velocidad de inhibición de  $\tau=88$  s, demostrando esto que la inhibición es más rápida en estado cerrado que en estado abierto.

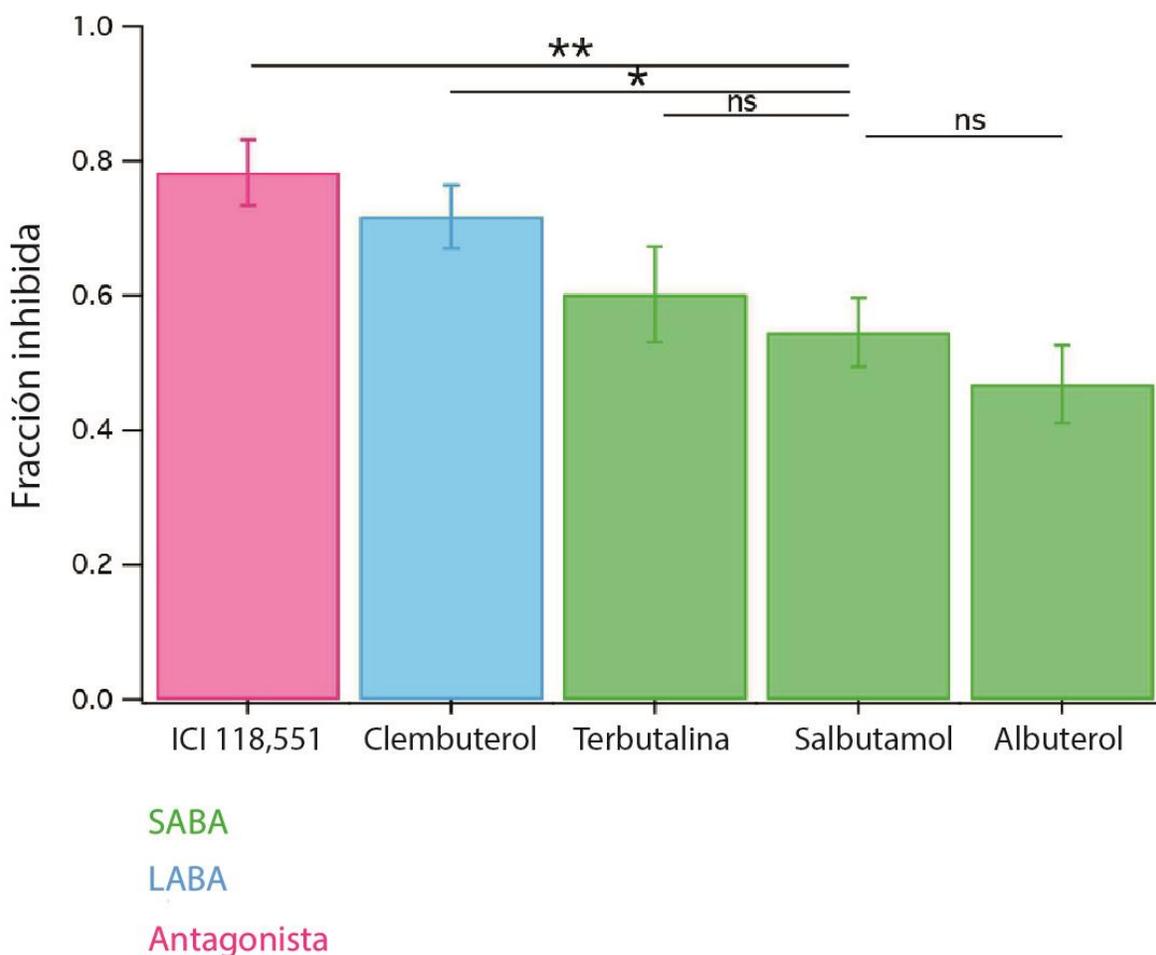


**Figura 13.** Velocidad de inhibición del salbutamol sobre la activación del canal TRPV4 con GSK1016790A. La línea roja es un trazo representativo de la corriente del canal TRPV4 en parche outside-out a -60 mV durante 6 minutos en estado abierto. Los parches fueron expuestos a solución de registro sin agonista durante 20 s, después se le agregó GSK1016790A a la parte extracelular hasta alcanzar la corriente máxima casi un minuto después y cuando la corriente se mantuvo estable se le agregó salbutamol hasta observar la

inhibición máxima de la corriente para después ponerle GSK1016790A de nuevo y observar la recuperación de la corriente. La línea azul muestra los promedios con su error estándar de inhibición de la corriente de 5 parches después de tratarlos con salbutamol a diferentes tiempos. Los parches se expusieron a GSK1016790A durante 90 s y después fueron lavados con solución de registro antes de tratarlos con salbutamol para después medir la corriente a -60mV.

*El efecto del salbutamol sobre el canal es independiente del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico*

Para poder establecer cualquier determinante estructural de la molécula de salbutamol que pudiera estar interactuando con el canal se probaron igualmente otros compuestos con estructuras parecidas que también interactuaran con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico. Se eligieron 4 compuestos; la terbutalina y el albuterol (SABAs), el clenbuterol (LABA) y el antagonista específico del  $\beta_2$ -adrenérgico ICI 118,551. Se utilizaron concentraciones de 500  $\mu$ M para los 4 compuestos y se estudió la inhibición de la corriente en parches outside-out bajo las mismas condiciones que se usaron para el salbutamol y se compararon entre sí. Se observó una disminución de la corriente recuperada en todos los compuestos; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los otros dos SABAs y el salbutamol, pero sí con el clenbuterol y con el ICI 118,551 (Figura 14).

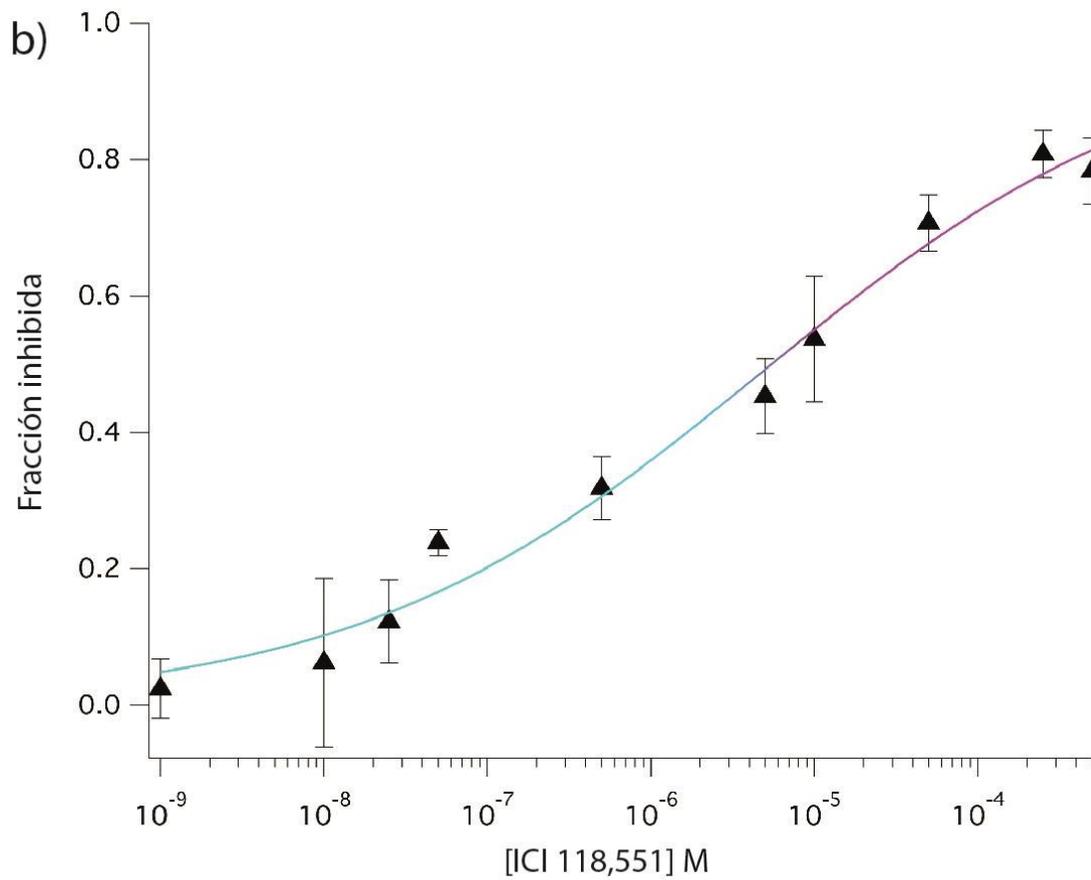
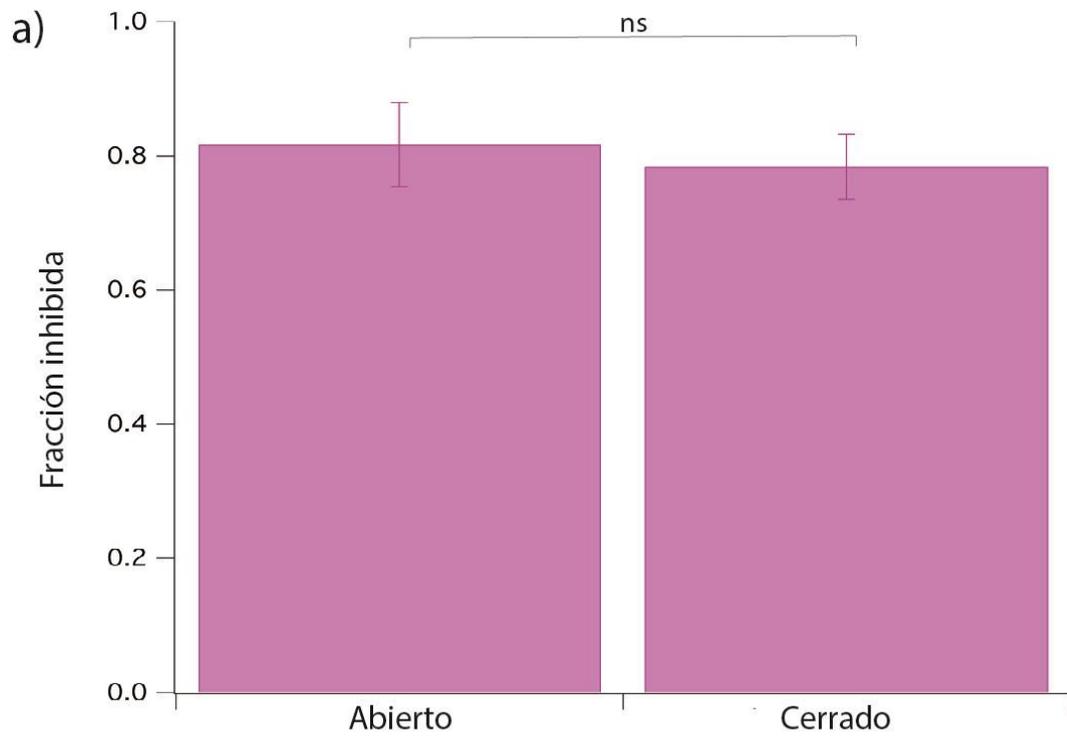


**Figura 14.** Efecto de los agonistas y el antagonista del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico sobre el canal TRPV4 en estado cerrado. Se activó la corriente con 300  $\mu$ M de GSK1016790A a 120 mV, después se lavó con solución de registro, se trataron los parches con 500  $\mu$ M del compuesto por 5 minutos y se volvió a activar con el agonista. Se graficó el promedio de la corriente recuperada después de agregar el tratamiento, normalizada a la máxima corriente obtenida por el GSK 1016790A. ICI 118,551=0.78  $\pm$  0.07 (n=15), Clembuterol=0.68  $\pm$  0.067 (n=10), Terbutalina= 0.62  $\pm$  0.078 (n=10), Salbutamol=0.52  $\pm$  0.04 (n=20) y Albuterol=0.44  $\pm$  0.05 (n=10). \* =  $p \leq 0.05$  y \*\* =  $p \leq 0.01$ .

Debido a que se observó que el compuesto con mayor inhibición resultó ser el ICI 118,551 se procedió a determinar si este efecto se mantenía al aplicar el compuesto al canal en estado

abierto, esto es, sin lavar el GSK1016790A. No se encontraron diferencias significativas sobre la corriente inhibida al aplicar el compuesto de manera intra o extracelular (Figura 15a).

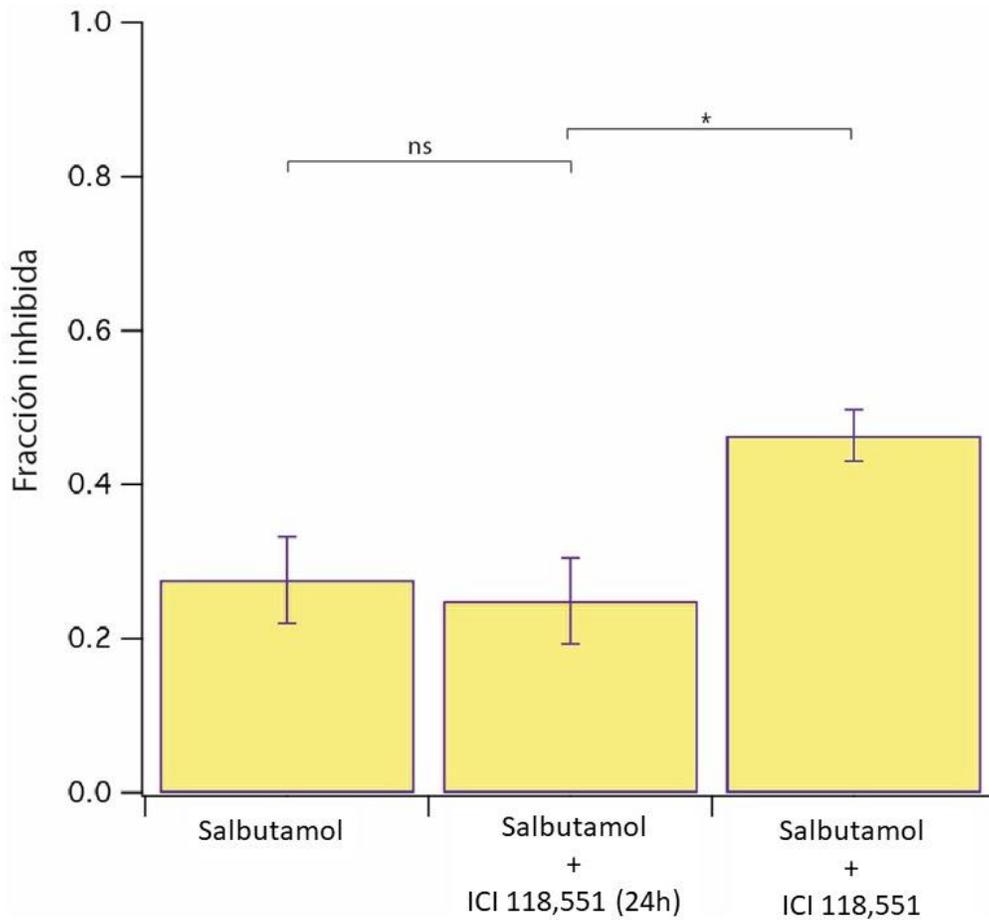
Después se procedió a realizar una curva dosis respuesta de ICI 118,551 en configuración outside-out en el estado cerrado del canal y se observó una disminución en la corriente recuperada en respuesta al aumento de la concentración del compuesto, se ajustaron los datos a la ecuación de Hill y se obtuvo la  $K_i$ . Se encontró que a 100  $\mu\text{M}$  se alcanzaba la máxima inhibición de casi el 50% de la corriente total dando una  $K_D$  de 100 nM (Figura 15b).



**Figura 15.** Efecto del ICI 118,551 sobre el canal TRPV4. a) comparación entre los promedios de la corriente inhibida por el ICI 118,551 a 500  $\mu\text{M}$  en 10 parches de membrana en estado abierto y cerrado. b) curva de la corriente inhibida por el ICI 118,551 a diferentes concentraciones, cada punto es el promedio de la corriente obtenida normalizada con la corriente máxima obtenida por el agonista en ausencia del compuesto. Cada punto representa el promedio de 10 experimentos, la línea muestra el ajuste a la ecuación de Hill la cual arroja una  $K_D = 100 \text{ nM}$  y una  $n_{\text{Hill}}=2$ .

*El salbutamol y el ICI 118,551 se unen al mismo sitio en el canal*

Para poder determinar si el ICI 118,551 y el salbutamol están interaccionando en el mismo lugar se procedió a tratar con la IC50 de ambos compuestos el parche y observar si hay una inhibición mayor en la corriente que en el caso de agregarlos por separado. También se midió el efecto del ICI 118,551 sobre las células al ser agregado 24 horas antes de hacer los sellos, esto debido a que en trabajos anteriores han utilizado esta metodología para observar el efecto que tiene este compuesto sobre su receptor (Coelho et al., 2015; Zhang et al., 2000). Los resultados indican que no hay diferencias significativas entre las corrientes de las células que habían sido tratadas por 24 horas con ICI 118,551 y las que no. De igual manera no se observó un efecto mayor en la inhibición de la corriente al ser agregados los dos compuestos al mismo tiempo (Figura 16) lo que puede significar que tanto el salbutamol como el ICI 118,551 actúan en sobre el mismo sitio.



**Figura 16.** Efecto combinado del salbutamol y el ICI 118,551. Comparación entre los promedios de las corrientes inhibidas aplicando 100 nM de ICI 118,551 y 100  $\mu$ M de Salbutamol. Salbutamol=0.28  $\pm$  0.086 (n=15), Salbutamol + ICI 118,551= 0.27  $\pm$  0.07 (n=10), Salbutamol  $\pm$  ICI 118,551 (24h)= 0.51  $\pm$  0.039 (n=10). \* = p $\leq$ 0.05

## Discusión

Estudios previos han demostrado el papel de TRPV4 en la contracción del músculo liso en pulmón y la importancia que tiene en el desarrollo de enfermedades crónicas pulmonares (Alvarez et al., 2006; Balakrishna et al., 2014; Becq et al., 2017; Gombedza et al., 2017b; Hamanaka et al., 2007; Jia et al., 2004); sin embargo, hay poca literatura sobre como los fármacos que se utilizan para tratar estas enfermedades puedan estar interaccionando con el canal a nivel molecular y, aún menos a nivel electrofisiológico.

Se ha observado que la presencia de TRPV4 en el endotelio pulmonar incrementa la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ , promoviendo la disrupción de la barrera alveolar. Esta alteración estructural es similar a la que presentan pacientes con síndrome respiratorio agudo (ARDS), también se ha demostrado que la activación de TRPV4 y la subsecuente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula incrementan los niveles de metaloproteasas presentes en la matriz extracelular, particularmente MMP2 y 9 e igualmente reduce los niveles de expresión del inhibidor de metaloproteasas TIMP2. Interesantemente también se ha demostrado que el salbutamol ayuda a aumentar la expresión de MMP9 y disminuir los niveles de TIMP1 y 2, por lo que puede ser posible que el salbutamol este afectando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de TRPV4 (O’Kane et al., 2009; Villalta et al., 2014).

Más aún, se ha observado el papel en enfermedades respiratorias de otros miembros de la familia TRPV involucrados como en el caso de TRPV1. Para este último se ha visto que, al estar presente en las terminales sensoriales de los nervios en las vías respiratorias, tiene un papel importante en el desarrollo de la hipersensibilidad y, al igual que TRPV4, se ha propuesto como un posible blanco para tratar enfermedades crónicas en vías respiratorias (Delescluse et al., 2012).

Se ha demostrado que el canal TRPV4 está involucrado en varios procesos inflamatorios y de respuesta inmune fuera del contexto del asma. Debido a que la temperatura es un activador del canal, TRPV4 es importante para la maduración de células dendríticas al presentarse un aumento en la temperatura como resultado de la respuesta inmune. Estas células, al estar expuestas a temperaturas de entre 39 y 40 °C, aumentan su producción de citocinas proinflamatorias como la IL12 y la disminución de citocinas antiinflamatorias como IL 10 en presencia de un agente infeccioso (Tominaga & Caterina, 2004; Tournier et al., 2003),

además de jugar un papel muy importante en la hiperalgesia térmica durante el proceso de inflamación incrementando la sensibilidad al calor (probablemente con ayuda de TRPV3) (Todaka et al., 2004). Otros canales de  $\text{Ca}^{2+}$  también se han visto involucrados en los mismos procesos como ORAI1 el cual, con ayuda de la proteína STIM, regula los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula como respuesta a cambios en la temperatura del organismo en procesos inmunes (Mancarella et al., 2011; Schwab et al., 2020).

La habilidad del TRPV4 de activarse por estímulos mecánicos también tiene un papel muy importante de la respuesta inmune debido a que, mediante la vía de las integrinas, contribuye a la detección de daño tisular y a guiar la respuesta inmune al inducir la sobreexpresión de citocinas que ayudan a reclutar eosinófilos y células dendríticas que reparan el daño (Wiesner et al., 2020). Sin embargo, también se ha encontrado que la sobreexpresión de TRPV4 en pulmón contribuye de manera significativa a la ruptura de la barrera vascular y al incremento de la permeabilidad vascular así como a la infiltración y activación de neutrófilos (Yin et al., 2016a). De forma similar se ha visto que en células mieloides el canal mecanosensor PIEZO1, es parte fundamental de la respuesta inflamatoria a través de AP-1 y que juega un papel importante en la respuesta inmune a infecciones bacterianas y en la fibrosis pulmonar (Solis et al., 2019).

Por su parte se ha visto que el salbutamol tiene efecto inhibitorio en varios tipos de células inflamatorias (mastocitos y eosinófilos) y no inflamatorias (células del hígado y del corazón). A pesar de que el salbutamol es uno de los fármacos más usados para tratar el asma y otras enfermedades respiratorias sus efectos se siguen estudiando y se piensa que pueden ir más allá de su interacción con el receptor  $\beta$ 2-adrenérgico (Nakpheng et al., 2017; Sottas et al., 2016). Lo que sí se sabe con cierta certeza es que el salbutamol actúa disminuyendo los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dentro de la célula, lo cual es una señal que modula la inflamación y la respuesta inmune (Shannon et al., 2017). En macrófagos, a través del receptor  $\beta$ 2-adrenérgico, el salbutamol y la terbutalina son capaces de inhibir la producción de citocinas al evitar la fosforilación de ERK y la producción de MCP-1 por medio de un mecanismo dependiente de cAMP resultando en un efecto antiinflamatorio (Keränen et al., 2017).

Los resultados encontrados nos muestran que el salbutamol puede estar actuando en parte a

través de la inhibición de TRPV4 ya que el canal muestra una disminución de la corriente de alrededor de 50% en presencia del fármaco. También parece ser que la inhibición del salbutamol es exclusiva del canal TRPV4 ya que en el canal TRPV1 no presento ningún efecto.

Varios estudios han mostrado el vínculo entre padecimientos pulmonares, salbutamol y TRPV4 pero ninguno ha demostrado una interacción molecular directa entre el fármaco y el canal y tampoco se han explorado los efectos que tiene sobre su cinética (Al-Azzam et al., 2020; Balakrishna et al., 2014; Hamanaka et al., 2007). En el presente trabajo se observa esta posible interacción y se infiere que se puede estar dando en la parte extracelular del canal de manera alostérica.

Como se ha mencionado antes, el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico afecta el funcionamiento del canal TRPV4 mediante la activación de PKA, por lo que era posible que los agonistas y antagonistas de estos receptores afectaran a la actividad del canal TRPV4 vía este mecanismo. Sin embargo, se observó el mismo efecto inhibitorio del canal tanto con agonistas como con antagonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, lo que indica que este receptor no está involucrado en dicho efecto. No solo se observó el mismo efecto, el antagonista ICI 118,551 presentó mayor corriente inhibida que los agonistas (aproximadamente un 30% más). Anteriormente se había observado que ICI 118,551 puede actuar de forma inhibitoria sobre otros mecanosensores, ya que en terminales nerviosas de Merkel se ha visto que este compuesto es capaz de inhibir los mecanosensores de adaptación lenta tipo 1 (SA1) y de adaptación rápida (RA) a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  pero no a concentraciones menores de 1  $\mu\text{M}$  (suficientes para inhibir el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico). Así mismo, se ha observado que disminuye la corriente de canales de sodio activados por voltaje hasta en un 80% en células del ganglio trigémino (Sonekatsu et al., 2019).

La diferencia entre los agonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico se debe, en parte, a su estabilidad dentro de la célula pero su interacción y efectos sobre el receptor es el mismo, lo que podría explicar que no hubiera diferencias sobre la actividad del canal entre los diferentes compuestos. Sin embargo, el antagonista se une al mismo sitio del receptor pero de manera distinta de tal forma que impide los cambios conformacionales asociados a su función y

además este antagonista parece tener una mayor afinidad por el receptor (Bilski et al., 1983; Pecha et al., 2015). En el TRPV4 podría ser que, al igual que en el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, el ICI 118,551 y el salbutamol se están uniendo al mismo sitio y que es el antagonista el que ejerce su efecto preferentemente sobre el canal ya que al poner los dos compuestos al mismo tiempo no se ve un efecto combinado, sino que se observa la inhibición producida por el ICI 118,551 en solitario.

### **Conclusión**

La actividad del canal TRPV4 se ve disminuida por los agonistas y antagonistas del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico. Este efecto es dependiente de la concentración y es mayor cuando el canal se encuentra cerrado. Además, el efecto es independiente de la presencia del receptor ya que los compuestos se unen de manera alostérica al canal aparentemente en la región extracelular.

### **Perspectivas**

Para poder eliminar por completo la posibilidad de que la vía de señalización del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico este interviniendo en los efectos observados se requiere tratar las células con inhibidores específicos para esta vía y observar si la inhibición se mantiene. También es necesario comprobar la interacción directa de los compuestos con el canal mutando regiones del canal donde se pueda dar dicha interacción y observando sus efectos sobre la actividad del canal. Por último, sería conveniente estudiar estos efectos en un modelo animal para comprobar el papel del TRPV4 en asma.

## Bibliografía

- Al-Azzam, N., Teegala, L. R., Pokhrel, S., Ghebregziabher, S., Chachkovskyy, T., Thodeti, S., ... Paruchuri, S. (2020). Transient Receptor Potential Vanilloid channel regulates fibroblast differentiation and airway remodeling by modulating redox signals through NADPH Oxidase 4. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66617-2>
- Alvarez, D. F., King, J. A., Weber, D., Addison, E., Liedtke, W., & Townsley, M. I. (2006). TRPV4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: A novel mechanism of acute lung injury. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000247065.11756.19>
- Balakrishna, S., Song, W., Achanta, S., Doran, S. F., Liu, B., Kaelberer, M. M., ... Jordt, S. (2014). TRPV4 inhibition counteracts edema and inflammation and improves pulmonary function and oxygen saturation in chemically induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307, 158–172. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00065.2014>.-The
- Barnes, P. J. (2004). Distribution of receptor targets in the lung. *Proceedings of the American Thoracic Society*. <https://doi.org/10.1513/pats.200409-045MS>
- Becq, F., Barrett-Jolley, R., Nieves-Cintrón, M., Yu, Z., Chen, H., Wang, Y., & Qin, L. (2017). Functional Cooperation between KCa3.1 and TRPV4 Channels in Bronchial Smooth Muscle Cell Proliferation Associated with Chronic Asthma. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00559>
- Billington, C. K., Penn, R. B., & Hall, I. P. (2016).  $\beta_2$  Agonists. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 237, pp. 23–40). [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_64](https://doi.org/10.1007/164_2016_64)
- Bilski, A. J., Halliday, S. E., Fitzgerald, J. D., & Wale, J. L. (1983). The pharmacology of a  $\beta_2$ -selective adrenoceptor antagonist (ICI 118, 551). *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 5(3), 430–437. <https://doi.org/10.1097/00005344-198305000-00013>
- Burnett, B. G., Muñoz, E., Tandon, A., Kwon, D. Y., Sumner, C. J., & Fischbeck, K. H. (2009). Regulation of SMN Protein Stability. *Molecular and Cellular Biology*, 29(5), 1107–1115. <https://doi.org/10.1128/MCB.01262-08>
- Canul-Sánchez, J. A., Hernández-Araiza, I., Hernández-García, E., Llorente, I., Morales-Lázaro, S. L., Islas, L. D., & Rosenbaum, T. (2018). Different agonists induce distinct single-channel conductance states in TRPV1 channels. *Journal of General Physiology*, 150(12), 1735–1746. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812141>
- Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C., & Schultz, G. (2005). *International Union of Pharmacology*.

- XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 427–450. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.6>
- Clapham, David E., Runnels, L. W., & Strübing, C. (2001). The trp ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6), 387–396. <https://doi.org/10.1038/35077544>
- Clapham, David E. (2003). TRP channels as cellular sensors. Retrieved from [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)
- Coelho, M., Moz, M., Correia, G., Teixeira, A., Medeiros, R., & Ribeiro, L. (2015). Antiproliferative effects of  $\beta$ -blockers on human colorectal cancer cells. *Oncology Reports*, 33(5), 2513–2520. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3874>
- Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216), 285–287. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5344615>
- Delescluse, I., Mace, H., Adcock, J. J., & Building, A. F. (2012). Inhibition of airway hyper-responsiveness by TRPV1 antagonists (SB-705498 and PF-04065463) in the unanaesthetized, ovalbumin-sensitized guinea pig. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01891.x>
- Deng, Z., Paknejad, N., Maksaev, G., Sala-Rabanal, M., Nichols, C. G., Hite, R. K., & Yuan, P. (2018). Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(3), 252–260. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0037-5>
- Dhaka, A., Viswanath, V., & Patapoutian, A. (2006). TRP ion channels and temperature sensation. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 135–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958>
- Duloher, M. M., Maldonado, F., & Limper, A. H. (2016). Drug-Induced Pulmonary Disease. In Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (pp. 1275-1294.e17). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3383-5.00071-3>
- Emir, T. L. R. (2017). Neurobiology of TRP Channels. *Neurobiology of TRP Channels*. CRC Press/Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4324/9781315152837>
- Fermini, B. (2008). Recent Advances in Ion Channel Screening Technologies. In *Ion Channels* (pp. 1–25). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/7355\\_2008\\_024](https://doi.org/10.1007/7355_2008_024)
- Gadsby, D. C. (2009). Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), 344–352. <https://doi.org/10.1038/nrm2668>

- Gaudet, R. (2006). Structural Insights into the Function of TRP Channels (pp. 349–360). <https://doi.org/10.1201/9781420005844.ch25>
- Gombedza, F., Kondeti, V., Al-Azzam, N., Koppes, S., Duah, E., Patil, P., ... Paruchuri, S. (2017a). Mechanosensitive transient receptor potential vanilloid 4 regulates *Dermatophagoides farinae* –induced airway remodeling via 2 distinct pathways modulating matrix synthesis and degradation. *The FASEB Journal*, 31(4), 1556–1570. <https://doi.org/10.1096/fj.201601045R>
- Gombedza, F., Kondeti, V., Al-Azzam, N., Koppes, S., Duah, E., Patil, P., ... Paruchuri, S. (2017b). Mechanosensitive transient receptor potential vanilloid 4 regulates *Dermatophagoides farinae* –induced airway remodeling via 2 distinct pathways modulating matrix synthesis and degradation. *The FASEB Journal*, 31(4), 1556–1570. <https://doi.org/10.1096/fj.201601045R>
- Gouaux, E., & Mackinnon, R. (2005). Principles of Selective Ion Transport in Channels and Pumps. *Science*, 310(5753), 1461–1465. <https://doi.org/10.1126/science.1113666>
- Hamanaka, K., Jian, M.-Y., Townsley, M. I., King, J. A., Liedtke, W., Weber, D. S., ... Parker, J. C. (2010). TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(3), L353–L362. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00315.2009>
- Hamanaka, K., Jian, M.-Y., Weber, D. S., Alvarez, D. F., Townsley, M. I., Al-Mehdi, A. B., ... Parker, J. C. (2007). TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(4), L923–L932. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00221.2007>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Holgate, S. T., Wenzel, S., Postma, D. S., Weiss, S. T., Renz, H., & Sly, P. D. (2015). Asthma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.25>
- Jeske, N. A., Diogenes, A., Ruparel, N. B., Fehrenbacher, J. C., Henry, M., Akopian, A. N., & Hargreaves, K. M. (2008). A-kinase anchoring protein mediates TRPV1 thermal hyperalgesia through PKA phosphorylation of TRPV1. *Pain*, 138(3), 604–616. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.02.022>
- Jia, Y., Wang, X., Varty, L., Rizzo, C. A., Yang, R., Correll, C. C., ... Hey, J. A. (2004). Functional

- TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287, 272–278. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00393.2003>.-Hypotonic
- Jian, M.-Y., King, J. A., Al-Mehdi, A.-B., Liedtke, W., & Townsley, M. I. (2008). High Vascular Pressure–Induced Lung Injury Requires P450 Epoxygenase–Dependent Activation of TRPV4. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(4), 386–392. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0192OC>
- Jo, A. O., Lakk, M., Frye, A. M., Phuong, T. T. T., Redmon, S. N., Roberts, R., ... Križaj, D. (2016). Differential volume regulation and calcium signaling in two ciliary body cell types is subserved by TRPV4 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(14), 3885–3890. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515895113>
- Keränen, T., Hömmö, T., Moilanen, E., & Korhonen, R. (2017).  $\beta$ 2-receptor agonists salbutamol and terbutaline attenuated cytokine production by suppressing ERK pathway through cAMP in macrophages. *Cytokine*, 94, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.07.016>
- Ledford, D. K., & Lockey, R. F. (2013, February). Asthma and comorbidities. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32835c16b6>
- Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., ... Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103(3), 525–535. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081638>
- Liedtke, Wolfgang. (2005). TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 451(1), 176–180. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1449-8>
- Mancarella, S., Wang, Y., Gill, D. L., & Chem Biol, N. (2011). Signal transduction STIM1 senses both Ca<sup>2+</sup> and heat NIH Public Access Author Manuscript. *Nat Chem Biol*, 7(6), 344–345. <https://doi.org/10.1038/nchembio.587>
- Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313–1323. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2516726>
- Nakpheng, T., Songkarak, S., Suwandecha, T., Sritharadol, R., Chunchachaichana, C., & Srichana, T. (2017). Evidences for salbutamol metabolism by respiratory and liver cell lines. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 32(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.11.006>

- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology*, 12(3), 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>
- Nilius, B., & Szallasi, A. (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacological Reviews*, 66(3), 676–814. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008268>
- O’Kane, C. M., McKeown, S. W., Perkins, G. D., Bassford, C. R., Gao, F., Thickett, D. R., & McAuley, D. F. (2009). Salbutamol up-regulates matrix metalloproteinase-9 in the alveolar space in the acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*, 37(7), 2242–2249. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181a5506c>
- Ortega, V. E., Hawkins, G. A., Peters, S. P., & Bleecker, E. R. (2007, November). Pharmacogenetics of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Gene. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2007.09.007>
- Pecha, S., Flenner, F., Sö Hren, K.-D., Lorenz, K., Eschenhagen, T., & Christ, T. (2015). b 1 Adrenoceptor antagonistic effects of the supposedly selective b 2 adrenoceptor antagonist ICI 118,551 on the positive inotropic effect of adrenaline in murine hearts. *Pharma Res Per*, 3(5), 168. <https://doi.org/10.1002/prp2.168>
- Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). An introduction to trp channels. *Annual Review of Physiology*, 68(1), 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>
- Ryskamp, D. A., Frye, A. M., Phuong, T. T. T., Yarishkin, O., Jo, A. O., Xu, Y., ... Križaj, D. (2016). TRPV4 regulates calcium homeostasis, cytoskeletal remodeling, conventional outflow and intraocular pressure in the mammalian eye. *Scientific Reports*, 6(1), 30583. <https://doi.org/10.1038/srep30583>
- Schwab, A., Italiani, P., Kuebler, W. M., & Michalick, L. (2020). TRPV4-A Missing Link Between Mechanosensation and Immunity. *Frontiers in Immunology | Www.Frontiersin.Org*, 1, 413. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00413>
- Shannon, E. K., Stevens, A., Edrington, W., Zhao, Y., Jayasinghe, A. K., Page-McCaw, A., & Shane Hutson, M. (2017). Multiple Mechanisms Drive Calcium Signal Dynamics around Laser-Induced Epithelial Wounds. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.022>
- Smith, P. L., Maloney, K. N., Pothén, R. G., Clardy, J., & Clapham, D. E. (2006). Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* Activates TRPV4 Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29897–29904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605394200>

- Solis, A. G., Bielecki, P., Steach, H. R., Sharma, L., Harman, C. C. D., Yun, S., ... Flavell, R. A. (2019). Mechanosensation of cyclical force by PIEZO1 is essential for innate immunity. *Nature*, 573(7772), 69–74. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1485-8>
- Sonekatsu, M., Gu, S. L., Kanda, H., & Gu, J. G. (2019). Effects of norepinephrine and  $\beta$ 2 receptor antagonist ICI 118,551 on whisker hair follicle mechanoreceptors dissatisfy Merkel discs being adrenergic synapses. *Molecular Brain*, 12(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0450-7>
- Sottas, C. E., Anderson, B. J., & Holford, N. H. G. (2016). Salbutamol has rapid onset pharmacodynamics as a bronchodilator. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 60(9), 1328–1331. <https://doi.org/10.1111/aas.12769>
- Thorneloe, K. S., Sulpizio, A. C., Lin, Z., Figueroa, D. J., Clouse, A. K., McCafferty, G. P., ... Westfall, T. D. (2008). N-((1S)-1-(3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl]carbonyl)-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a Novel and Potent Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel Agonist Induces Urinary Bladder Contraction and Hyperactivity: Part I. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(2), 432–442. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.139295>
- Todaka, H., Taniguchi, J., Satoh, J. I., Mizuno, A., & Suzuki, M. (2004). Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35133–35138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406260200>
- Tominaga, M., & Caterina, M. J. (2004). Thermosensation and pain. *Journal of Neurobiology*, 61(1), 3–12. <https://doi.org/10.1002/neu.20079>
- Tournier, J.-N., Hellmann, A. Q., Lesca, G., Jouan, A., Drouet, E., & Mathieu, J. (2003). Fever-like thermal conditions regulate the activation of maturing dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(4), 493–501. <https://doi.org/10.1189/jlb.1002506>
- Ullmann, N., Caggiano, S., & Cutrera, R. (2015). Salbutamol and around. *Italian Journal of Pediatrics*, 41(Suppl 2), A74. <https://doi.org/10.1186/1824-7288-41-S2-A74>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1304–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>

- Villalta, P. C., Rocic, P., & Townsley, M. I. (2014). Role of MMP2 and MMP9 in TRPV4-induced lung injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(8), L652–L659. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00113.2014>
- Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., ... Nilius, B. (2002). Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33704–33710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204828200>
- Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., ... Nilius, B. (2002). Activation of TRPV4 Channels (hVRL-2/mTRP12) by Phorbol Derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13569–13577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200062200>
- Wiesner, D. L., Merkhofer, R. M., Ober, C., Kujoth, G. C., Niu, M., Keller, N. P., ... Klein, B. S. (2020). Club Cell TRPV4 Serves as a Damage Sensor Driving Lung Allergic Inflammation. *Cell Host & Microbe*, 27(4), 614–628.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.006>
- Wu, L.-J., Sweet, T.-B., & Clapham, D. E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 381–404. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>
- Xia, Y., Fu, Z., Hu, J., Huang, C., Paudel, O., Cai, S., ... Sham, J. S. K. (2013a). TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 305(7), C704–C715. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00099.2013>
- Xia, Y., Fu, Z., Hu, J., Huang, C., Paudel, O., Cai, S., ... Sham, J. S. K. (2013b). TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 305(7), C704–C715. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00099.2013>
- Yin, J., Hoffmann, J., Kaestle, S. M., Neye, N., Wang, L., Baeurle, J., ... Kuebler, W. M. (2008). Negative-Feedback Loop Attenuates Hydrostatic Lung Edema via a cGMP-Dependent Regulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4. *Circulation Research*, 102(8), 966–974. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.168724>
- Yin, J., Michalick, L., Tang, C., Tabuchi, A., Goldenberg, N., Dan, Q., ... Kuebler, W. M. (2016a). Role of transient receptor potential vanilloid 4 in neutrophil activation and acute lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(3), 370–383. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0225OC>
- Yin, J., Michalick, L., Tang, C., Tabuchi, A., Goldenberg, N., Dan, Q., ... Kuebler, W. M. (2016b).

Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Neutrophil Activation and Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(3), 370–383. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0225OC>

Zhang, S. J., Cheng, H., Zhou, Y. Y., Wang, D. J., Zhu, W., Ziman, B., ... Xiao, R. P. (2000). Inhibition of spontaneous  $\beta$ 2-adrenergic activation rescues  $\beta$ 1- adrenergic contractile response in cardiomyocytes overexpressing  $\beta$ 2- adrenoceptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21773–21779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909484199>