



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Interacciones lípido-proteína en el
canal TRPV4**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ALAN EMMANUEL MEDINA ARELLANO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR

Ciudad de México, 2018





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **MEDINA ARELLANO ALAN EMMANUEL**, con número de cuenta **311202636**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **08 de junio de 2018** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

VOCAL Dra. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR*

SECRETARIO Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

SUPLENTE Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

SUPLENTE Dra. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

El título de la tesis que presenta es: **Interacciones lípido-proteína en el canal TRPV4.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 09 de mayo de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

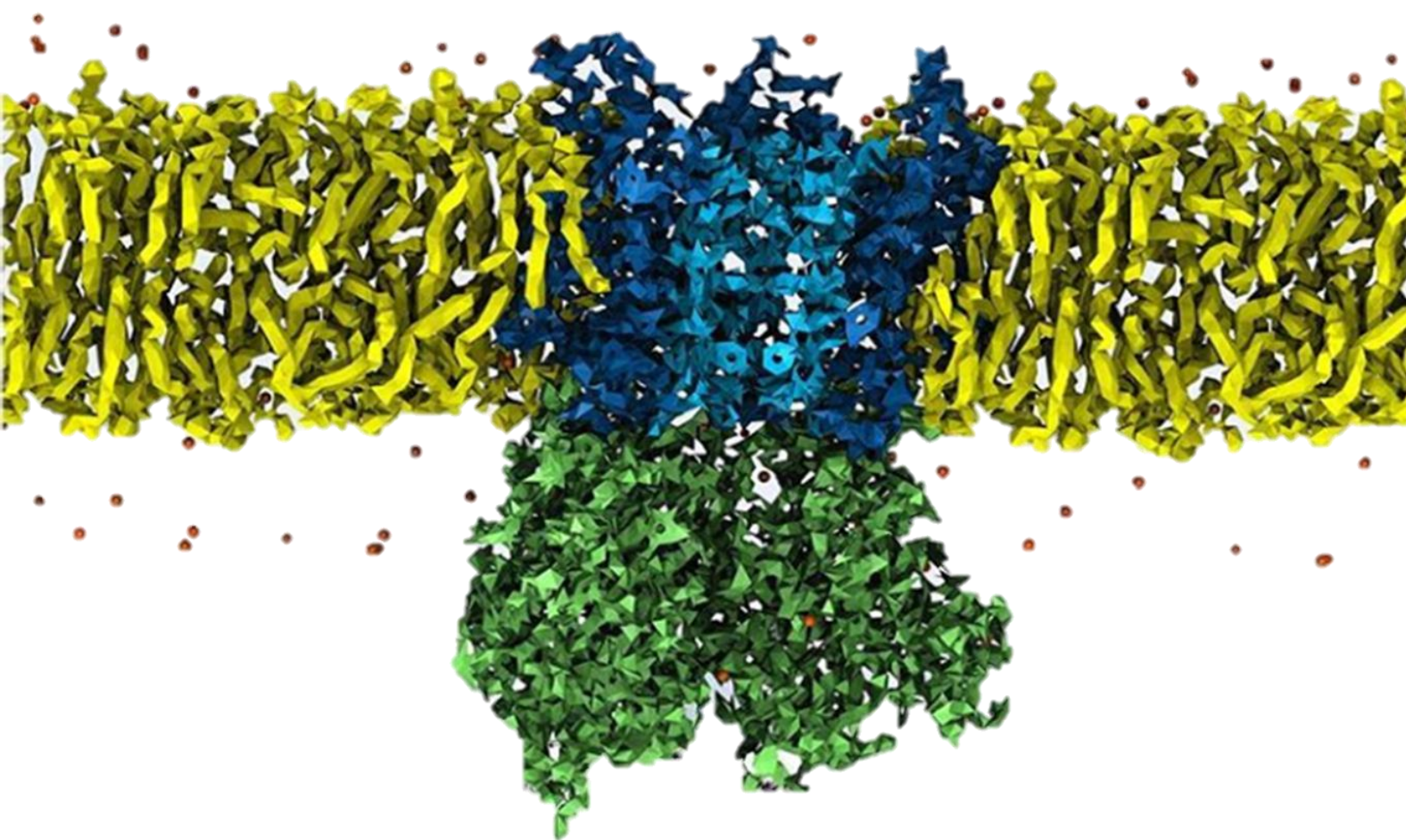


RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con el proyecto titulado “Caracterización de regiones que sufren cambios conformacionales ante agonistas en el canal TRPV1” clave IN2007-17, y con apoyo de CONACYT con el proyecto que lleva por número CB-238399.

Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida.



Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, y en especial a la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, por ser mi *alma mater* y forjarme con un espíritu universitario.

Mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Tamara Rosenbaum** por la enorme paciencia que me ha dedicado y por permitirme formar parte de su equipo. ¡Mil gracias!

A la asesora interna, la **Dra. Esther Cruz**, por ser una excelente persona, por las charlas amenas y por siempre recibirme con los brazos abiertos en su laboratorio.

Al comité sinodal conformado por el **Dr. Roberto Domínguez Casalá** y las Doctoras **Leticia Morales Ledesma** y **Maria Elena Ayala Escobar**, por sus observaciones en beneficio de este proyecto.

A la **Biól. Ana Elena** por su apoyo y ayuda en la realización de muchos de los experimentos que se presentan en esta tesis.

A la **Dra. Sara Morales**, sin usted nada de esto habría comenzado.

A la **Biól. Alejandra Llorente** por su ayuda y apoyo en la biología molecular, y por la realización de las mutantes utilizadas en esta tesis, y a **Félix Sierra** por los consejos y apoyo técnico.

Dedicatorias

Principalmente dedico esta tesis a mis padres **Pilar Arellano** y **Manuel Medina**, así como a mis hermanos **Edwin** y **Valeria**, por representar la mayor de mis fortalezas en la vida ahora y siempre.

A mis familiares, y en especial a mis abuelas a quienes les tengo un enorme cariño, por su apoyo incondicional en estos veintidós años de vida.

A los profesores de la vida que me han enseñado que para aprender no basta asistir a clase.

A mis amigos: Damaris Martínez, Arely García, Juan Mondragón, Eduardo Rodríguez, Lizbeth Muñoz, Maricarmen Gutiérrez, y Sarahí Silva, por las enseñanzas, viajes y charlas compartidas durante todos estos años. Deseo con todo mi corazón que sigamos cosechando recuerdos para la posteridad.

A mis amigos biólogos: Alan Izalde, Thelma Parra, Yerenni Castro, Daniel Torres, Demi Anguiano, Viri González, Uriel Rico, Ari Herrera, Alberto Monroy, Narda Mena, Alan Segura y Raúl Librado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio BL-303 del IFC: Damián, Ileana, Miguel, Rebeca, Carla, Aldair y Raúl, en particular a la Biól. Ana Elena, por su ayuda y contribución en muchos de los experimentos de esta tesis, pero principalmente por enseñarme el apasionante pero terrorífico mundo del canal iónico TRPV4.

A todos los que hicieron posible que alcanzara el primer escalón de este gran sueño que apenas comienza.

Índice

Resumen

1. Introducción	
1.1 Los canales iónicos y la excitabilidad celular	1
1.2 La superfamilia de canales iónicos TRP	4
1.3 El canal iónico TRPV4.....	8
1.4 Modulación de la actividad de los canales TRP por lípidos	11
1.5 La lisofosfatidilcolina y los canales iónicos	12
2. Hipótesis	17
3. Objetivos	
3.1 Generales.....	17
3.2 Particulares	17
4. Métodos	
4.1 Cultivo celular.....	18
4.2 Transfección celular transitoria	19
4.3 Mutagénesis.....	19
4.4 Registros electrofisiológicos	20
4.5 Curvas para determinar la dependencia de la activación sobre la dosis	22
4.6 Soluciones de registro	23
4.7 Análisis estadístico	24
5. Resultados	
5.1 La lisofosfatidilcolina 18:1 activa el canal rTRPV4	25
5.2 Otras especies de LPC no activan al canal rTRPV4	29
5.3 El canal TRPV4 de humano responde a LPC.....	31
5.4 El TRPV4 es activado por LPC a través de la interacción con la región carboxilo terminal del canal.....	33
5.5 La mutación R746D no altera la activación del canal por GSK1016790A.....	35
5.6 La LPC activa al canal hTRPV4 con mutaciones para sitios de interacción al PIP ₂	36
5.7 Mutaciones del TRPV4 descritas en humanos alteran la activación por LPC	37
6. Discusión	39
7. Conclusión	47
8. Experimentos futuros	48
9. Referencias	49

Abreviaturas

4 α -PDD: 4-alfa-forbol didecanoato

AA: Ácido araquidónico

aa: aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARD: Dominio de repeticiones de anquirina

ASIC-3: Canal iónico sensible a ácidos tipo 3

ATX: Autotaxina

BSA: Álbúmina de suero bovino

CaM: Calmodulina

CMT2: Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2

Cryo-EM: Criomicroscopía electrónica

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

DRG: Gánglio de la raíz dorsal

EC₅₀: Concentración de activación media

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEQ: Ácido epoxieicosatetraenoico

EET: Ácido eicosatetraenoico

EPA: Ácido eicosapentanoico

ERK: Proteína cinasa regulada por señales extracelulares

GFP: Proteína verde fluorescente

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G

HEK293: Células embrionarias de riñón humano 293

hTRPV4: Canal TRPV4 de humano

I: corriente

IP₃: Inositol trifosfato

KCNK: Canal de potasio de dos poros

K_d: Constante de disociación

K_v: Canal de potasio activado por voltaje

KCNK: Canal de potasio de dos poros

LCAT: Lecitin-colesterol acil transferasa

LPA: Ácido lisofosfatídico

LPC: Lisofosfatidilcolina

LPE: Lisofosfatidiletanolamina

LPI: Lisofosfatidilinositol

Liso-PLD: Lisofosfolipasa D

MscL: Canal mecanosensible de gran conductancia

n_{Hill}: coeficiente de Hill

OTRPC4: Receptor al potencial transitorio 4 tipo OSM-9

Ox-LDL: Lipoproteína de baja densidad oxidada

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI3,4K: Fosfatidilinositol 3,4 cinasa

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKA: Proteína cinasa A

PKC: Proteína cinasa C

PKD: Enfermedad poliquística renal

PLA: Enzima fosfolipasa A

PLC: Enzima fosfolipasa C

rTRPV4: Canal TRPV4 de rata

S: Siemens

Src: Familia de proteínas con actividad tirosina-cinasas

TRAAK: Miembro de la familia KCNK

TREK: Miembro de la familia KCNK

TRP: Receptor al potencial transitorio

TRPV1: Receptor al potencia transitorio vaniloide tipo 1

TRPV4: Receptor al potencial transitorio vaniloide tipo 4

V: Voltaje

VR-OAC: Receptor vaniloide osmóticamente activado

WT: proteína silvestre

xTRPV4: Canal TRPV4 de *Xenopus*

Resumen

Los canales TRP o receptores del potencial transitorio son una superfamilia de canales iónicos conocidos especialmente por responder a una amplia variedad de estímulos, de naturaleza tanto endógena como exógena. Esta característica polimodal es la que le permite a estas proteínas funcionar como complejas maquinarias moleculares capaces de participar en procesos celulares que van desde la homeostasis del calcio hasta la secreción de hormonas y la percepción sensorial. Bajo este panorama, el canal TRPV4 (o TRP vaniloide 4) es de especial interés por ser uno de gran relevancia fisiológica en los mamíferos, que participa en procesos como la osmorregulación en el riñón y el prurito. Aunque este canal es importante para la fisiología de los mamíferos, a la fecha se han descrito pocos ligandos endógenos para el TRPV4.

Debido a que se ha reportado activación directa del canal TRPV1 por lípidos como el ácido lisofosfatídico (LPA) y a que recientemente se ha encontrado evidencia de que este lípido es capaz de activar al canal TRPV4, en el presente trabajo se planteó el objetivo de probar si la molécula precursora del LPA, la lisofosfatidilcolina (LPC), también era capaz de activar al canal TRPV4. Mediante el uso de técnicas electrofisiológicas, este trabajo demuestra que la LPC activa a los canales TRPV4 de humano y de rata heterológamente expresados en células embrionarias de riñón humano (HEK293). También se determinó que dicha activación depende fundamentalmente del tamaño de la cadena de carbonos y el grado de insaturación de la cadena alifática del lisofosfolípido y, asimismo, se demostró que la activación del TRPV4 por LPC está mediada por una interacción electrostática con el residuo de arginina en la posición 746, localizado en el dominio TRP de la región carboxilo terminal del canal.

Además, mutantes del canal hTRPV4 para los sitios de unión a fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) se activan de manera similar al canal silvestre en LPC, indicando que la activación del canal TRPV4 por este lisofosfolípido es independiente de la interacción del canal con PIP_2 . Más aún, esta respuesta no

está mediada por modificaciones de las propiedades de la membrana. Finalmente, mutaciones reportadas en humanos para el canal TRPV4 en donde el residuo de aspartato es sustituido por una glicina o una cisteína, no son activadas en presencia de LPC, lo que evidencia un posible papel fisiológico aún no descrito para estos genotipos.

Dado que la LPC está presente en todas membranas celulares y a que es importante en procesos fisiológicos como el prurito, los resultados que aquí se describen sugieren que la lisofosfatidilcolina podría tener un papel relevante como modulador endógeno de la actividad del canal TRPV4.

1. Introducción

1.1 Los canales iónicos y la excitabilidad celular

Una de las características adaptativas más importantes de los organismos es su capacidad de detectar cambios en el medio ambiente en el que viven. Esto incluye la detección de modificaciones en la intensidad de la luz, la presión, la concentración de sustancias químicas y la temperatura. Los organismos también son capaces de detectar cambios en su medio interno para poder mantener la homeostasis, constituyendo esto un importante paso evolutivo para la adaptación animal (Talavera et al., 2008).

Para mantener la homeostasis, los organismos han desarrollado mecanismos que aseguran una adecuada comunicación inter e intracelular. Entre estos mecanismos se encuentra el transporte de iones a través de las membranas de células y organelos, mismo que es esencial para diversos procesos biológicos (Gouaux y MacKinnon, 2005). En organismos unicelulares, los flujos de iones median procesos tan dispares como la señalización, proliferación celular, el equilibrio de pH, la regulación de volumen y el ciclo celular, mientras que en organismos pluricelulares, además de los anteriores, regulan la fertilización, respuesta inmune, secreción de hormonas, contracción muscular, sinapsis y generación de señales eléctricas en nervios y músculos (Fermini, 2008; Gadsby, 2009).

En principio, la bicapa lipídica de una célula representa una barrera altamente impermeable a la mayoría de las moléculas polares y con carga, de tal forma que moléculas como los iones nunca podrían cruzar la membrana por sí solos (Alberts et al., 2004; Gouaux y MacKinnon, 2005). Para atravesar esta barrera, las células han desarrollado sistemas de transporte de moléculas hidrosolubles a través de sus membranas, estos complejos proteicos se dividen en dos clases; *los transportadores*, que requieren gasto de energía para permitir

activamente el paso a pequeñas macromoléculas, y los *canales iónicos*, donde los iones viajan a favor de su gradiente electroquímico y sin gasto de energía (Alberts et al., 2004).

Los **canales iónicos** son complejos proteicos presentes en las membranas celulares que se encuentran formados por diferentes subunidades que usualmente rodean un *poro* central hidrofílico, permitiendo que los iones predominantes en los sistemas biológicos (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ o Cl^-) fluyan a través de ellos a favor del gradiente electroquímico, atravesando de un lado al otro la membrana (Fermini, 2008; Gadsby, 2009).

Además, 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 lograrlo, ciertos aminoácidos en el poro del canal deben eliminar la mayoría de las moléculas de agua asociadas a ellos y así pasar a través de la porción más estrecha del canal (Fermini, 2008). 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 (Gouaux y MacKinnon, 2005; Fermini, 2008) (Figura 1).

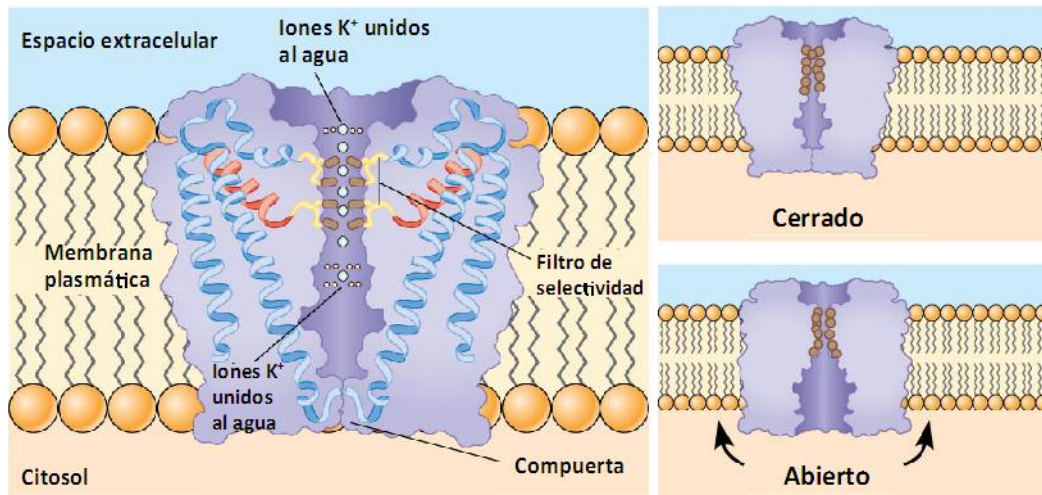


Figura 1. Esquema que muestra la estructura general del canal de potasio activado por voltaje (Kv). Cuando los iones K^+ unidos a moléculas de agua entran en el canal, pierden las moléculas de agua y se unen a los átomos de oxígeno de los aminoácidos (aa) que recubren el filtro de selectividad (panel izquierdo). Panel derecho, la transición del canal desde un estado cerrado a uno abierto que permite la entrada de iones K^+ a la célula. Tomado de Hardin et al (2012).

Los canales iónicos se pueden clasificar dependiendo del estímulo que causa su apertura (o *gating*) (Fermini, 2008; Gadsby, 2009). Suelen dividirse en: a) *activados por voltaje*, b) *activados por ligandos extracelulares o intracelulares* (Franciolini y Petris, 1988; Hille y Catterall, 2012), c) *mecanosensibles*, d) *activados por luz* (Fermini, 2008) y, más recientemente, se han descrito los e) canales activados por temperatura.

En el genoma humano, se han identificado 404 genes que codifican para canales iónicos (Venter et al., 2001). 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 (Venter et al., 2001; Xu et al., 2004), y de 27 a 32 codifican para receptores del potencial transitorio (TRP) (Birnbaumer et al., 2003; Pan et al., 2010; Hille y Catterall, 2012). 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.

1.2 La superfamilia de canales iónicos TRP

Los canales iónicos TRP reciben su nombre de una *Drosophila* mutante identificada por Cosens y Manning en 1969, en la cual las células fotorreceptoras muestran una respuesta transitoria a la luz brillante en lugar de una sostenida. Dos décadas después, el gen mutado causante de este fenotipo fue llamado *trp* o receptor del potencial transitorio, por sus siglas en inglés para “transient receptor potential” y su producto fue identificado como un canal permeable a iones Ca^{2+} (Montell y 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 (Montell, 2005; Nilius y Voets, 2005), donde los miembros de la familia de canales TRP destacan por funcionar como “sensores” celulares que participan en funciones fisiológicas como: la regulación de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y Na^{2+} , la termosensación, tacto, nocicepción, control osmótico, audición, y el desencadenamiento de potenciales de acción en células excitables (Ramsey et al., 2006; Dhaka et al., 2006; Venkatachalam y Montell, 2007).

Los miembros de esta familia son canales permeables a cationes, con una configuración estructural característica de 6 dominios transmembranales (nombrados S1-S6), similar a los canales de potasio activados por voltaje (Figura 1). Cada canal es ensamblado en forma de homotetrámeros o heterotetrámeros e insertado en las membranas celulares, formando un poro hidrofílico que al estar abierto es capaz de permitir la entrada de cationes como Ca^{2+} , Na^{2+} , K^+ y Mg^{2+} (Clapham et al., 2001), dando lugar a la generación de corrientes eléctricas a través de las membranas de las células. En los canales TRP, los dominios N-terminal y C-terminal están localizados siempre de forma intracelular (Clapham et al., 2001; Talavera et al., 2008) (Figura 2).

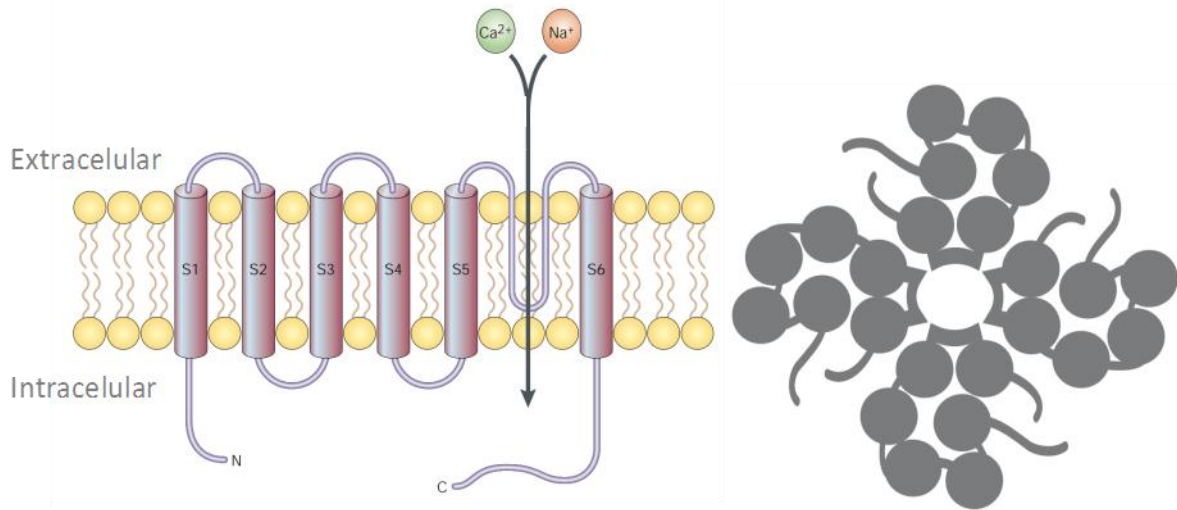


Figura 2. Izquierda: Esquema general de una subunidad de los canales TRP. Tomado y modificado de Clapham et al. (2001). Derecha: Formación del poro del canal a partir de la unión de asas entre los segmentos S5-S6 de cada una de las 4 subunidades del tetrámero de un canal TRP. Tomado de Flockerzi (2007).

Actualmente, la clasificación de los canales TRP está basada en la homología entre sus secuencias de aminoácidos, de tal forma que los 28 miembros TRP se dividen en 7 subfamilias (Clapham et al., 2005; Wu et al., 2010; Nilius y Owsianik, 2011; Ciardo y Ferrer-Montiel, 2017). La subfamilia TRPC recibe su nombre de “clásica o canónica”, por ser la primera en ser descrita y por estar estrechamente relacionada con el primer canal TRP identificado en *Drosophila* (Talavera et al., 2008), mientras que las siguientes están basadas en la designación original que se dio al primer miembro de cada subfamilia: TRPV (“vanilloide”), TRPM (“melastatina”), TRPA (“anquirina”), TRPN (“NOMP-C”), TRPP (“policistina”) y TRPML (“mucolipina”) (Ramsey et al., 2006). De ellos, la familia TRPN no se expresa en mamíferos y el TRPC2 en humanos es un *pseudogen* (Montell, 2005; Voets et al., 2007) (Figura 3). 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 (Venkatachalam y Montell, 2007).

Otras características estructurales de estos canales son la presencia de los dominios de repeticiones de anquirina (ARD, *ankyrin repeat domains*) en el extremo amino-terminal de los canales, y el dominio TRP en el extremo C terminal (Redmon et al., 2016). Este último es una secuencia de 25 aminoácidos que se encuentra inmediatamente después del dominio transmembranal S6 en el carboxilo terminal de la proteína, conservada en todas las familias de TRPs de mamíferos excepto en TRPA y TRPP (Ramsey et al., 2006). Dentro de este dominio se encuentra la caja TRP, una secuencia rica en prolinas y altamente conservada entre los miembros de la familia TRP (Wu et al., 2010; Redmon et al., 2016).

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) (Dhaka et al., 2006; Voets et al., 2007), por lo que no es extraño que los primeros estudios sobre la activación y modulación de los canales TRP hayan sido asociados a 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 (Venkatachalam y Montell, 2007), por lo que estos canales se caracterizan más por su función divergente que por la conservación de secuencias (Ramsey et al., 2006). Esta sensibilidad a la activación polimodal sugiere que el estímulo fisiológicamente relevante para algún TRP dado será de acuerdo a su contexto celular específico (Ramsey et al., 2006).

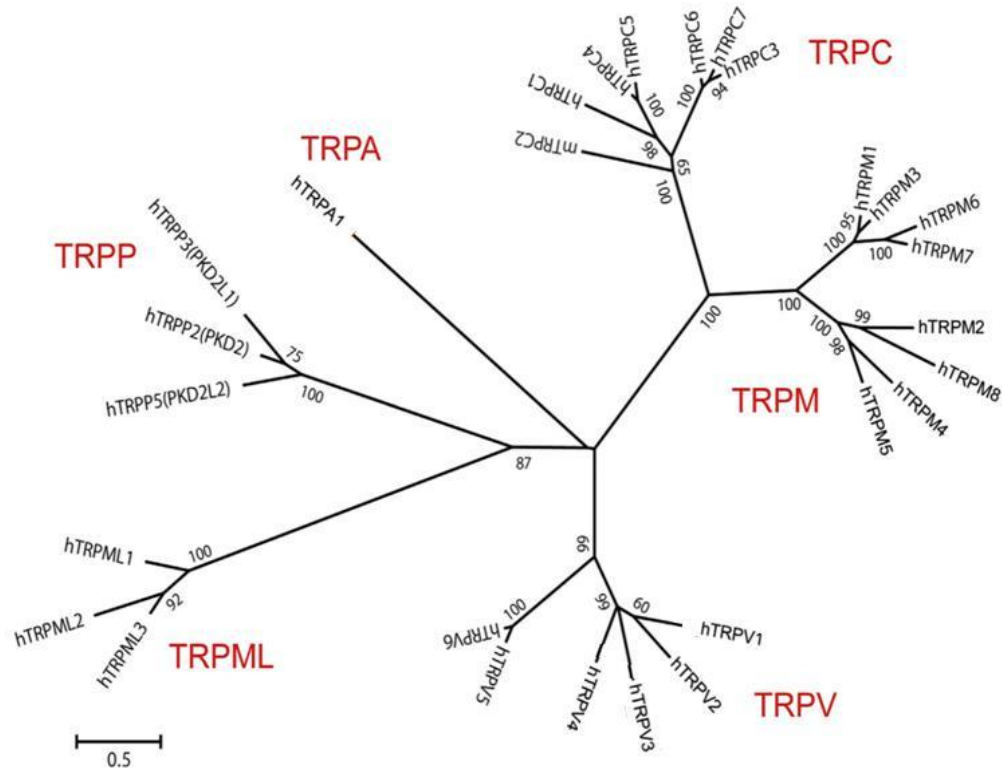


Figura 3. Árbol filogenético de la familia TRP en *Homo sapiens sapiens*. El árbol filogenético fue hecho con el principio de mínima evolución sobre las sustituciones de aminoácidos esperadas usando un modelo JTT. En el humano, hay 27 canales TRP en 6 subfamilias. Los números en cada rama indican los valores de arranque estadísticos. Se usó el gen *trpc2* de ratón debido a que el gen *trpc2* de humano es un pseudogen. Escala: distancia genética (rango de recombinación). Tomado de Kittaka y Tominaga (2017).

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 (Flockerzi, 2008; Nilius y Owsianik, 2011). Por ejemplo, los canales expresados en neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico (SNP) participan en la transducción de señales al ser activados por una serie de estímulos exógenos y endógenos como los son la temperatura, los cambios osmóticos, agentes químicos y macromoléculas como lípidos o proteínas. Una neurona sensorial es capaz de transducir el estímulo que recibe a través de señales eléctricas y propagarlo a diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC), que resulta

en la percepción y eventualmente en una respuesta adaptativa (Ciardo y Ferrer-Montiel, 2017).

En definitiva, el canal iónico TRPV1 es el miembro mejor estudiado de la familia de canales TRP (Ramsey et al, 2006; Huynh et al., 2016). Por el contrario, el canal TRPV4, miembro de la misma subfamilia, ha recibido poca atención en el campo de los canales iónicos y hay pocos estudios sobre la biofísica de la activación de este canal. Más aún, se han descrito pocos activadores endógenos de esta proteína. A continuación, se describirán brevemente las características biofísicas, estructurales y funcionales de este canal TRP.

1.3 El canal iónico TRPV4

El canal TRPV4 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 4*), también nombrado OTRPC4 (*Osm-9-like TRP Channel 4*) o VR-OAC (*Vanilloid Receptor-related Osmotically Activated Channel*) (Flockerzi, 2007), es un canal catiónico no selectivo permeable a iones Ca^{2+} , cuyo gen se encuentra en el locus 12q24.1 en humano y 5F para el ratón (Nilius y Owsianik, 2011). En el humano el gen *trpv4* contiene 12 exones y codifica para una proteína de 871 aminoácidos (Flockerzi, 2007; Redmon et al., 2016).

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

Otros agonistas no térmicos del canal incluyen: estímulos hipo-osmóticos y ésteres de forbol como el 4- α forbol didecanoato (4 α PDD) (Watanabe et al., 2002). El canal TRPV4 también puede ser activado por compuestos como la bisandrografolida A extraída de la planta *Andrographis paniculata* (Smith et al., 2006) y agonistas sintéticos como el compuesto GSK1016790A (Thorneloe et al.,

2008). Hace poco se han descrito dos lípidos que parecen modular la actividad de este canal; el ácido eicosapentaenoico (EPA) y su metabolito, el ácido epoxieicosatetraenoico (17,18-EEQ) (Caires et al., 2017), que sumados a la anandamida y a los productos del metabolismo del ácido araquidónico (AA) como el ácido 5',6'-epoxieicosatrienoico (5',6'-EET) (Watanabe et al., 2003), resultan ser los lípidos endógenos que hasta ahora se sabe regulan la actividad del canal TRPV4 en situaciones fisiológicas.

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^{2+} intracelular es una de ellas, que actúa vía la calmodulina (CaM) cuya unión al dominio C terminal del canal potencia las corrientes del TRPV4 (Strotmann et al., 2003), para después desensibilizar al canal (Redmon 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/PKC) son capaces de modular la actividad del TRPV4 (Redmon et al., 2016; White et al., 2016).

En cuanto a los inhibidores para este canal se han descrito: el rojo de rutenio, el gadolinio, el La^{3+} (Flockerzi, 2007; Clapham, 2007) y moléculas sintéticas como el HC-067047, el RN1734, el GSK205 y el GSK2193874 (Redmon et al., 2016).

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

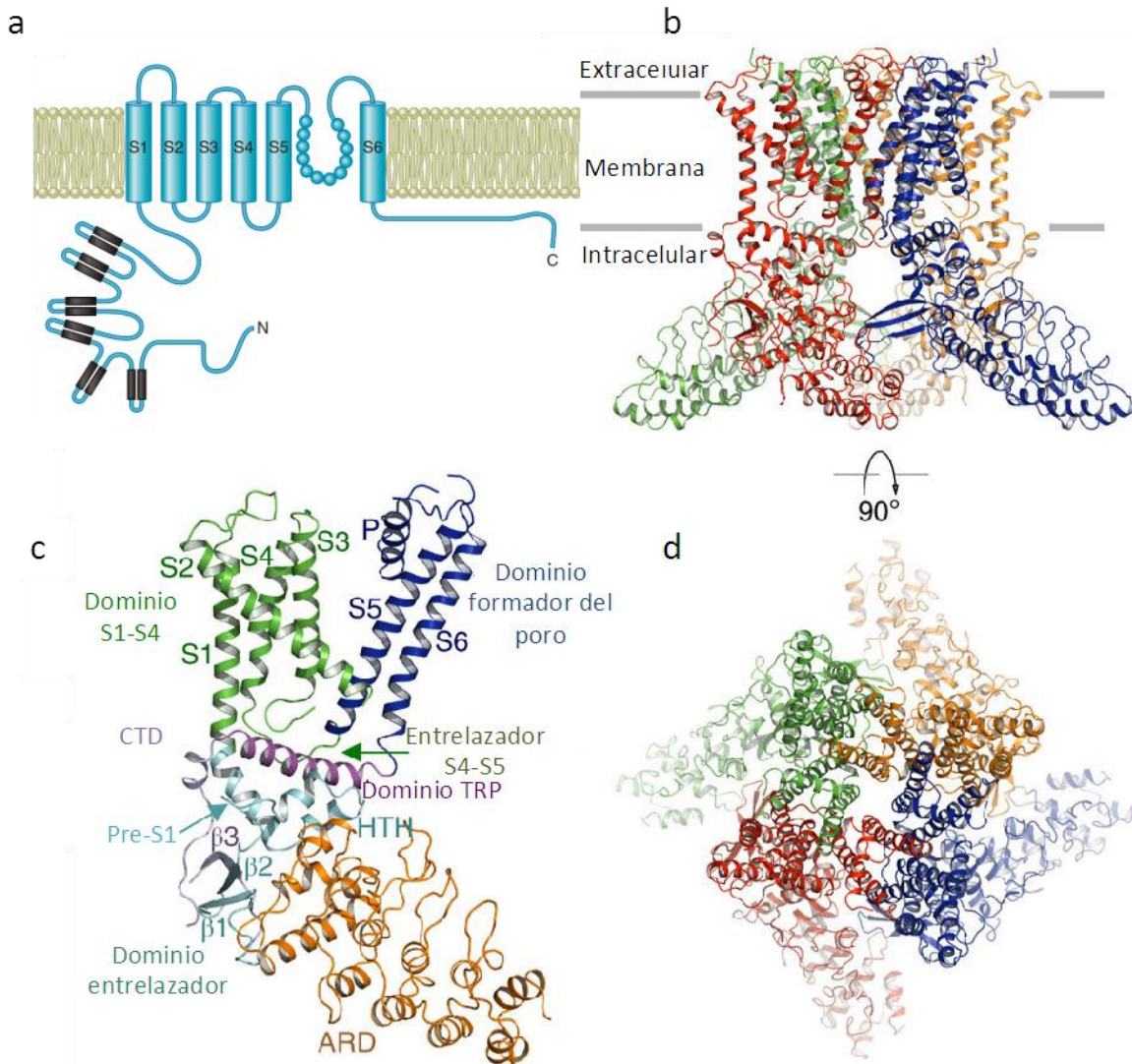


Figura 4. Estructura del canal TRPV4 por Cryo-EM. a) Representación de la estructura de una subunidad del canal. Tomado de White et al. (2016). a y d) Diagrama de listón de la estructura general del canal en dos vistas ortogonales. Cada subunidad se muestra de diferente color. c) Estructura de una sola subunidad del canal. Se indica el nombre de cada dominio y su estructura con diferente color. Tomado de Deng et al. (2018).

TRPV4 tiene una preferencia moderada por el Ca^{2+} sobre otros cationes monovalentes como K^+ y Na^+ (Redmon et al., 2016), cuyo orden de selectividad es: $\text{Ca}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ (Voets et al., 2002). A diferencia de los canales altamente selectivos a Ca^{2+} como lo son TRPV5 y TRPV6, la selectividad del TRPV4 por los iones Ca^{2+} es de $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$: 6-10 (Venkatachakam y Montell, 2007; Redmon et al., 2016). Nilius y colaboradores han reportado que la selectividad de

este canal al Ca^{2+} depende de un solo residuo de aspartato (aa de carga negativa) en la región del poro (Nilius et al., 2001), que a su vez responde a una interacción electrostática.

En cuanto a la relación corriente a voltaje (I/V) de este canal, se ha descrito un comportamiento suavemente rectificador saliente (outward rectifying) en respuesta a su activación (Ramsey et al., 2006). 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 (Redmon et al., 2016).

Este canal fue aislado 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; Liedtke, 2005; Flockerzi, 2008; Nilius y Owsianik, 2011; Redmon et al., 2016).

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 osmosensación (Liedtke y Friedman, 2003; Liedtke, 2005; Nilius y Owsianik, 2011). La actividad del canal iónico TRPV4 depende críticamente del tejido, tipo celular y del contexto del estímulo (Redmon et al., 2016).

1.4 Modulación de la actividad de los canales TRP por lípidos

La mayoría de los canales TRP funcionan como quimiosensores para ligandos exógenos, no obstante se conocen relativamente pocos ligandos endógenos que activen a estas proteínas (Wu et al., 2010). Debido a que los canales TRP se

encuentran embebidos en las membranas lipídicas, su actividad es altamente sensible a los cambios que suceden en ellas.

Hasta la fecha, más de 50 lípidos endógenos se han identificado como moduladores de estas proteínas, los que incluyen a los metabolitos de la fosfolipasa C (PLC) y A₂ (PLA₂), ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ω -3) y omega-6 (ω -6), esfingolípidos, lisofosfolípidos, mevalonato, colesterol y esteroides (Ciardo y Ferrer-Montiel, 2017).

Dentro de la familia de los canales TRP se ha descrito la activación de varios de sus miembros a partir de lisofosfolípidos. A continuación, se describirán algunas de las características de la lisofosfatidilcolina (LPC), que es un lisofosfolípido presente en todas las membranas celulares y a partir del cual se generan otros fosfolípidos que afectan la función de los canales iónicos.

1.5 La lisofosfatidilcolina y los canales iónicos

La LPC, también llamada lisolecitina, es un lisofosfolípido conformado por una cadena hidrofóbica de ácido graso y un grupo hidrofílico polar de colina ligado a un esqueleto de glicerol (Figura 5). Es el lisofosfolípido más abundante en el plasma y en los tejidos, presente en altas concentraciones en la circulación sanguínea en donde generalmente se encuentra asociado con albúmina y lipoproteínas (Kabarowski, 2009). Este lisofosfolípido está implicado en la regulación de transcripción génica, mitogénesis, quimiotaxis, relajación del músculo liso, activación plaquetaria, tumorigénesis, angiogénesis y supervivencia neuronal (Prokazova et al., 1998; D'Arrigo y Servi, 2010; Yoder et al., 2014).

Lisofosfatidilcolina

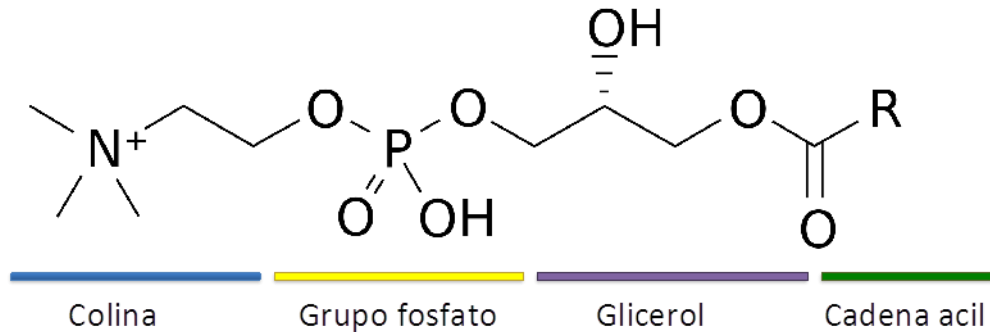


Figura 5. Estructura química de la lisofosfatidilcolina.

La LPC es sintetizada a partir de la hidrólisis de lípidos de la membrana como la esfingomielina y fosfatidilcolina (PC), mediante la enzima fosfolipasa A_2 (PLA_2) y la fosfolipasa A_1 (PLA_1), las cuales son capaces de cortar el enlace éster sn-2 y sn-1 respectivamente, o como producto de la enzima lecitin colesterol acil transferasa (LCAT) que transfiere un ácido graso de la PC al colesterol, resultando en una LPC libre y un colesterol esterificado (Subbaiah y Liu, 1996; D'Arrigo y Servi, 2010). Posteriormente, puede dar origen a diversos lípidos, como al ácido lisofosfatídico (o LPA) mediante la hidrólisis por la lisofosfolipasa D (Liso-PLD) o por autotaxina (ATX) (D'Arrigo y Servi, 2010) (Figura 6).

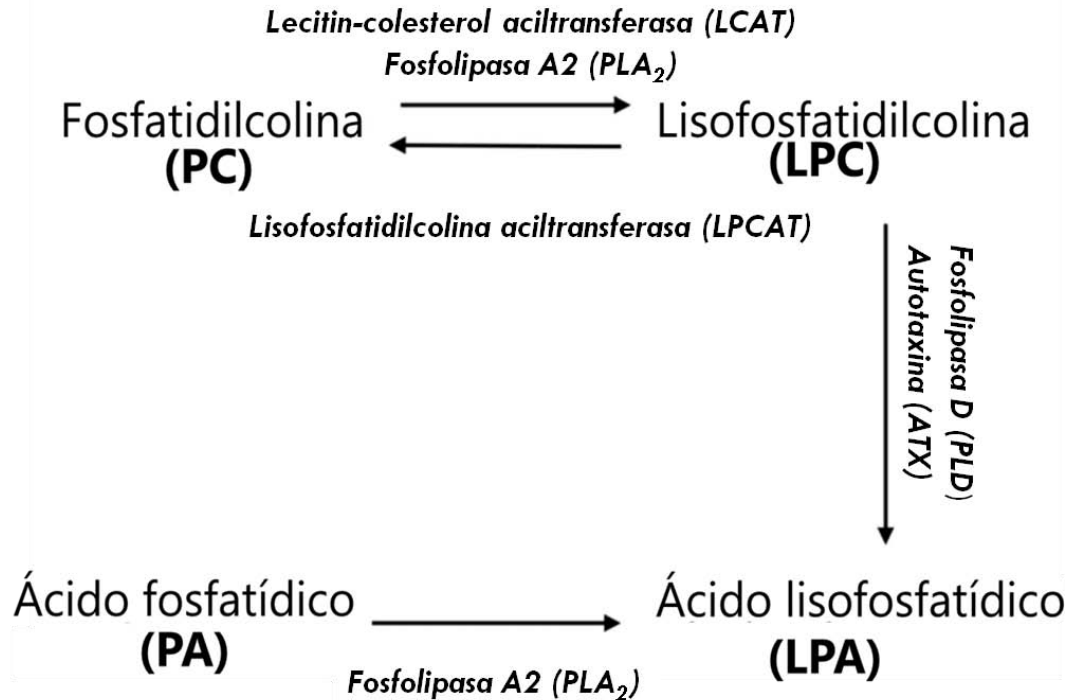


Figura 6. Síntesis de la lisofosfatidilcolina. Tomado y editado de Ahn et al. (2017).

Existen diversas especies de LPC que se diferencian fundamentalmente en la longitud de la cadena de carbonos y en el grado de insaturaciones que poseen. Las LPC más abundantes en el plasma sanguíneo son la LPC 16:0 (dieciséis carbonos, ninguna insaturación), que comprende aproximadamente el 40% del LPC total, seguido por el 1-stearoyl-LPC (LPC 18:0), 1-oleoil-LPC (LPC 18:1; dieciocho carbonos y una insaturación), y 1-lioneoil-LPC (LPC 18:2), que constituyen del 30-35% del LPC total (Ojala et al., 2007).

La LPC puede inducir un amplio rango de efectos de manera específica del tipo celular. Además de servir como transportador de ácidos grasos mono y polinsaturados y saturados, y de colina, la LPC actúa en la señalización celular mediante cuatro GPCRs: G2A, GPR4, GPR119 y GPR55. El receptor G2A (que también es un receptor para la lisofosfatidiletanolamina [LPE] y el lisofosfatidilinositol [LPI]), y recientemente el GPR55 (Dzazga et al., 2017), se han relacionado con la movilización intracelular de Ca^{2+} (Meyer zu Heringdorf y Jakobs, 2007), mientras que el receptor GPR119 está asociado a la modulación

de las concentraciones de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y al incremento de la secreción de insulina mediante señalización de proteínas cinasas C (PKC) (Prokazova et al., 1998; Soga et al., 2005). Por otra parte, los efectos del receptor GPR4 aún no se han esclarecido del todo (Khan et al., 2010).

Los lisofosfolípidos, y en particular la LPC, no solamente interaccionan con GPCRs. Varios grupos de investigación han tratado de dilucidar la participación de los lisofosfolípidos sobre la actividad de los canales iónicos. A pesar de esto la activación de canales iónicos por lípidos sigue siendo controversial.

En la mayor parte de los casos, la modulación de la actividad de canales iónicos se adjudica a la capacidad que tienen estos lisofosfolípidos de modificar las propiedades de la membrana: debido a su forma cónica se insertan de manera asimétrica en la bicapa y cambiar la curvatura de la membrana. En específico, estos cambios locales en la tensión de la membrana se han postulado como determinantes de los efectos de los lisofosfolípidos sobre la mayoría de los microdominios en donde se encuentran los canales iónicos, y no sobre los canales en sí (Kung, 2005; Ciardo y Ferrer-Montiel, 2017). Ejemplo de esto son: el canal mecanosensible MscL de bacterias (Perozo et al., 2002; Kung, 2005), los canales TREK (o KCNK2, *Potassium channel subfamily K member 2*) y TRAAK (o KCNK4) (Maingret et al., 2000; Brohawn et al., 2014 y Lesage et al., 2000), y el canal ASIC-3 (*Acid-sensing ion channel 3*) (Marra et al., 2016). En los anteriores, la activación por LPC persiste en configuraciones de parche adherido de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o patch-clamp, pero cesa en la configuración de parche escindido, lo que indica que la activación del canal es de forma indirecta ya sea a través de una vía de señalización por la activación de proteínas G, de proteínas cinasas, de productos del metabolismo de los lisofosfolípidos, o de modificación en las propiedades mecánicas de la membrana (Kung, 2005).

En cuanto a los canales TRP, ha sido determinado que la actividad del canal TRPV2 es estimulada por LPC al incidir en la vía de la PI3,4K, al inducir la translocación del canal a la membrana plasmática (Monet et al., 2009). Por otra

parte, el canal TRPC6 es activado por LPC de manera indirecta, al unirse a sus GPCRs para inducir la actividad de proteínas cinasas de la familia Src, las cuales fosforilan la Tyr99 de una CaM constitutivamente unida al canal TRPC6 contenido en vesículas citosólicas. Posteriormente, la CaM es liberada y se une a la subunidad p85 α de la PI3K activándola. La PI3K activa cataliza la conversión de PIP₂ en PIP₃, este incremento ocasiona que el canal vesiculado sea expuesto a la membrana plasmática y con ello activado (Chaudhuri et al., 2016)

A diferencia de los anteriores, se describe que los canales TRPM8 y TRPC5 son activados de manera presumiblemente directa por LPC. Este lisofosfolípido activa a ambos canales sobreexpresados en células HEK293 (Abee et al., 2006; Andersson et al., 2007; Flemming et al., 2006), dando lugar a una respuesta que es mantenida también en parches escindidos y que está ausente en células no transfectadas, lo que sugiere una acción relativamente directa del lípido sobre el canal. Sin embargo, no existen estudios posteriores sobre el posible sitio de unión del lisofosfolípido al canal.

El canal TRPV1 es activado directamente por el LPA, mediante una interacción electrostática del lípido con el residuo de lisina 710 situado en la región C-terminal del canal (Nieto-Posadas et al., 2012). A partir de las evidencias expuestas y considerando que antecedentes del laboratorio muestran que el LPA activa al canal TRPV4, en este trabajo nos planteamos probar si el precursor del LPA, la LPC, es capaz de activar directamente el canal iónico TRPV4 y si dicha activación es a través de su interacción con el residuo de arginina 746 de este canal, mismo que es homólogo al K710 presente en el TRPV1.

2. HIPÓTESIS

La lisofosfatidilcolina (LPC) es un modulador endógeno de la actividad del canal iónico TRPV4 e interacciona directamente con alguna región del canal, lo que promueve su activación.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Estudiar si el canal iónico TRPV4 es regulado por la lisofosfatidilcolina (LPC), y analizar cómo interactúa este lisofosfolípido con la proteína.

3.2 Particulares

- a) Describir las características biofísicas del canal TRPV4 aislado de células embrionarias de riñón humano (HEK 293) en parches de membrana escindidos.
- b) Describir los efectos de la LPC sobre el canal iónico TRPV4.
- c) Elucidar si existe una interacción directa entre la LPC y el canal iónico TRPV4.

4. MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney-293 cells*) 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 éste.

Las células fueron cultivadas en monocapas sobre cajas de Petri de plástico de 100 mm de diámetro (Corning) bajo las siguientes condiciones: atmósfera saturada de agua y compuesta por 95% de O₂ y 5% de CO₂ 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-Estreptomicina y 1% de aminoácidos no esenciales (L-glutamina). Todos los reactivos para el cultivo y mantenimiento de las células se obtuvieron de GIBCO-Invitrogen.

Cuando la monocapa de células 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 de tripsina-EDTA (GIBCO) y posteriormente 1 ml de DMEM suplementado, disociando mecánicamente. El volumen obtenido se centrifugó a 12,000 rpm durante 3:30 minutos. El botón se resuspendió en medio de cultivo (~ 900 µl), del que se ocupó un tercio para resembrar 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 (Sigma-Aldrich).

Las células sembradas en los cuadros de vidrio se mantuvieron en incubación, bajo las condiciones antes mencionadas. Al día siguiente, las células se transfectaron con los ADN de interés, como se detalla a continuación.

4.2 Transfección celular transitoria

Las células HEK293 se transfectaron con 1.5 µg de ADN que codifica para el canal TRPV4 de humano o rata silvestre (hTRPV4 o rTRPV4), o ADN que codificaba para canales TRPV4 mutantes (rTRPV4-R746D, hTRPV4-R746C, hTRPV4-R746G, hTRPV4-R269H y hTRPV4-¹²¹AAWAA¹²⁵), todos fusionados, en el extremo C terminal del canal, con la proteína verde fluorescente mejorada o eGFP (enhanced *Green Fluorescent Protein*), dentro del 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-eGFP o TRPV4-X_{mutante}-eGFP 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 y se agregó 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.

4.3 Mutagénesis

Las mutantes utilizadas en los experimentos se generaron por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en dos pasos (Rosenbaum y Gordon, 2002). En resumen, con ayuda del programa Vector NTI (Thermofisher) se identificó la secuencia de interés y se diseñaron oligonucleótidos que llevaron a cabo la mutación que se deseaba introducir en la secuencia de aminoácidos junto con un sitio de restricción nuevo y específico en la secuencia de ADN.

Se realizaron 2 reacciones de PCR independientes: una en la que se introdujo el residuo deseado y un nuevo sitio de restricción para diagnóstico de

que la mutación fue introducida a través del diseño de oligonucleótidos especiales, y otra reacción en la que se amplificó el ADN mutado.

Una vez obtenido el ADN mutado, se seleccionaron dos enzimas de restricción que cortaran únicamente en un sitio del canal en donde fue insertada la mutación (digestión). Al finalizar este proceso, se separaron los fragmentos de la PCR con la mutación (inserto) y el fragmento del canal en el vector de expresión (vector) en un gel de agarosa al 0.8%. Ambos fragmentos se unieron con ayuda de una ADN ligasa a temperatura ambiente por toda la noche, obteniendo así un plásmido con un canal mutante.

El ADN mutante se utilizó para transformar bacterias competentes (*Escherichia coli*) por medio de choque térmico. Las bacterias se sembraron en cajas de agar con el antibiótico canamicina (el vector de expresión poseía resistencia a canamicina) y se cultivaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se crecieron colonias de bacterias en medio de cultivo LB (10 g de Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 ml de NaOH y 15 g de agar) y se extrajo el ADN usando sistemas para extracción de ADN de la marca Promega.

El ADN extraído fue utilizado para transfectar a las células HEK293 para los experimentos de electrofisiología y el mismo protocolo fue utilizado para las demás mutantes, cambiando únicamente la secuencia de oligonucleótidos.

4.4 Registros electrofisiológicos

Los registros electrofisiológicos se realizaron con la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *Patch-Clamp*; introducida por Erwin Neher y Bert Sakmann en 1976 (Neher y Sakmann, 1992). Esta técnica puede ser utilizada 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 (Figura 7).

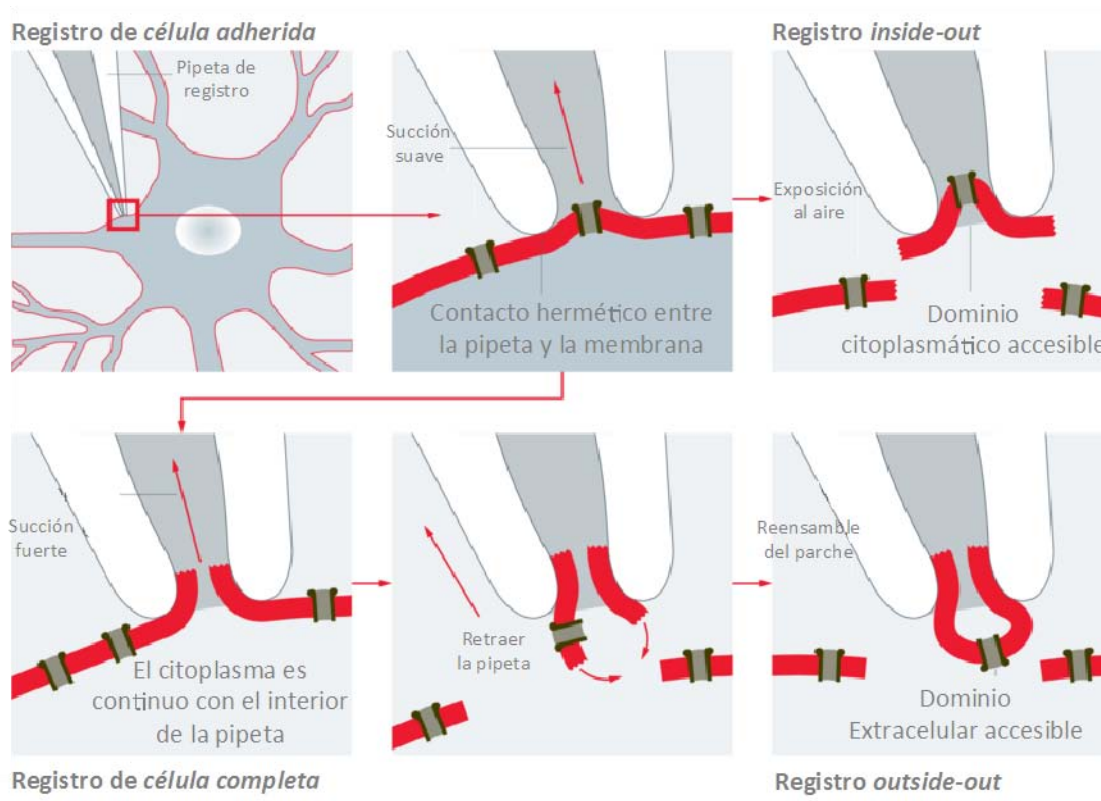


Figura 7. Esquema que muestra las cuatro configuraciones de la técnica de Patch-clamp.

Cell-attached (Célula adherida): cuando la pipeta se encuentra en la proximidad más cercana a la membrana celular, se aplica una suave succión para obtener un sellado hermético y de alta resistencia entre la pipeta y la membrana.

Whole-cell (Célula completa): Se aplica otra succión breve pero fuerte, de esta forma la membrana celular se rompe y se obtiene acceso al citoplasma y al registro de todos los canales iónicos de esta célula.

Inside-out (Parte intracelular del canal expuesta): En el modo *cell-attached*, la pipeta se retrae provocando que el parche se separe del resto de la membrana y se exponga la parte intracelular del canal.

Outside-out (Parte extracelular del canal expuesta): En el modo *whole-cell*, la pipeta se retrae dando lugar a dos pequeñas piezas membranales que se reensamblan y forman una estructura vesicular pequeña con el lado citosólico frente a la solución de la pipeta, mientras que la porción extracelular del canal se encuentra expuesta ante la solución del baño.

Tomado y modificado de <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>

Las corrientes macroscópicas del TRPV4 fueron registradas usando la configuración *inside-out* de la técnica de patch-clamp, ya que el aislar al pedazo de membrana que contiene a los canales iónicos nos permite separar el complejo contexto celular de los fenómenos que se desean estudiar. Para evaluar la respuesta del canal, se registró la corriente de fuga o inicial antes de exponer a los

canales a la LPC, luego a los 3 minutos de exposición al lípido disuelto en solución de baño (LPC 5 μM) y finalmente ante una concentración saturante (1 μM) del agonista selectivo GSK1016790A. 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 -60 mV y +60mV 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. Las corrientes activadas al inicio, a los 3 minutos de exposición a LPC y en presencia de GSK1016790A se normalizaron contra el valor de corriente generado en GSK1016790A a +120 mV. Finalmente, las corrientes normalizadas se promediaron y el porcentaje de activación se reportó como la media \pm error estándar de la media (S.E.M.).

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 fueron filtradas a 2 kHz y muestreadas a 10 kHz con un amplificador EPC 10 (HEKA Elektronik). En todos los experimentos se usaron micropipetas de borosilicato con una resistencia de entre 5-7 M Ω y fueron realizados a temperatura ambiente (22°C). Todos los registros se obtuvieron con el programa Patchmaster (HEKA Instruments) y posteriormente se analizaron con el programa IgorPro versión 6.36 (Wavemetrics).

4.5 Curvas para determinar la dependencia de la activación sobre la dosis.

Se realizaron curvas de corriente activada del canal iónico TRPV4 (hTRPV4 y rTRPV4) silvestre y mutante (rTRPV4-R746D) en respuesta a diferentes concentraciones de GSK1016790A. Las concentraciones empleadas para la curva

fueron: 10 nM, 20nM, 50nM, 80nM, 100nM, 500nM, 800nM y 1 μ M, preparados en la solución de registro a partir del stock a 15.25 mM de GSK1016790A (Tabla 1). Los registros se obtuvieron en soluciones isométricas (130 mM NaCl, 3 mM HEPES y 1 mM EDTA en baño y pipeta). Las curvas finales fueron obtenidas 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 fue normalizado contra el valor de corriente que se obtuvo con 1 μ M de GSK1016790A en el mismo parche de membrana.

Los datos fueron ajustados 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.

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 hTRPV4 y rTRPV4, tanto silvestres como mutantes, en la configuración inside-out de la técnica de Patch-clamp.

4.6 Soluciones de registro

Para los experimentos de patch-clamp en la configuración inside-out, las soluciones de registro contenían (en mM): 130 NaCl, 3 HEPES y 1 EDTA para la solución de baño que representa el espacio intracelular, y 130 NaCl, 3 HEPES y 5 $CaCl_2$ para la solución de la pipeta que corresponde al medio extracelular. En los experimentos donde se determinó la dependencia de la activación del canal en la

dosis, se utilizó la solución intracelular arriba descrito tanto para la solución de baño como para la pipeta (isométricas).

La preparación de los stocks de LPC 18:1 (Sigma-Aldrich), 18:0 y 16:0 (Avanti Polar Lipids) se realizó a las molaridades indicadas en la Tabla 1, disolviéndolos en DMEM/BSA 1% y fueron guardados en congelación a -70°C. El día del experimento, se descongeló un vial en agitación sobre un vórtex y posteriormente fue incubado a 37°C durante 2 horas. Finalmente, los lípidos se prepararon a una concentración de 5 µM en solución de registro (baño).

El stock del agonista selectivo GSK1016790A fue preparado en DMSO a una concentración de 15.25 mM (Tabla 1) y guardado en congelación a -20°C. Para los experimentos de electrofisiología, el stock fue descongelado y disuelto en solución de baño a las concentraciones molares requeridas.

Tabla 1. Soluciones y compuestos utilizados para los experimentos de electrofisiología.

Solución 1-baño (sin Ca ²⁺)	Solución 2-pipeta (con Ca ²⁺)	GSK1016790A	LPC 18:1	LPC 18:0	LPC 16:0
130 mM NaCl	130 mM NaCl	Stock preparado en DMSO a 15.25 mM	Stock preparado en DMEM/BSA 1% a 10mM	Stock preparado en DMEM/BSA 1% a 10 mM	Stock preparado en DMEM/BSA 1% a 10 mM
3 mM HEPES	3mM HEPES				
1 mM EDTA	5 mM CaCl				

4.7 Análisis estadístico

Los datos se promediaron y se muestran como la media ± error estándar de la media (e.e.m.). Se usó la prueba t de student y se consideraron estadísticamente significativos los datos con un valor p<0.01.

Los gráficos de las curvas dosis-respuesta, así como el ajuste a la ecuación de Hill, se ejecutaron en el programa Igor Pro versión 6.36 (WaveMetrics).

5. RESULTADOS

5.1 La lisofosfatidilcolina 18:1 activa el canal rTRPV4

Con la finalidad de encontrar la concentración de GSK1016790A con la que se activaran la totalidad de canales TRPV4 en parches de membrana escindidos, se realizó una curva de respuesta con diferentes concentraciones desde 10 nM hasta 1 μ M. Los valores de corriente, activados por las diferentes concentraciones de GSK1016790A, se normalizaron contra el valor máximo obtenido a una concentración saturante de GSK1016790A (1 μ M) y se expresaron como corriente normalizada, es decir $I/I_{\text{máxima}}$.

La activación del canal iónico TRPV4 por el agonista selectivo GSK1016790A es dependiente de la dosis. El ajuste de los datos obtenidos a la ecuación de Hill muestra un valor para la constante de disociación (K_d) de 70.06 ± 4.7 nM y un coeficiente de Hill (n_{Hill}) de 3.86 ± 0.86 para el canal TRPV4 de rata (Figura 8). El número de Hill indica que cuatro moléculas de GSK1016790A se unirán a cada canal TRPV4, por lo que al ser el canal un tetrámero, se estima que cada molécula de GSK1016790A tiene un único sitio de interacción por cada subunidad.

Debido a que en la curva de respuesta del canal TRPV4 al GSK1016790A la concentración de 1 μ M activa todas las corrientes de un parche de membrana que expresa estos canales, se decidió emplear esta concentración como referente para conocer el porcentaje de canales activados por la lisofosfatidilcolina.

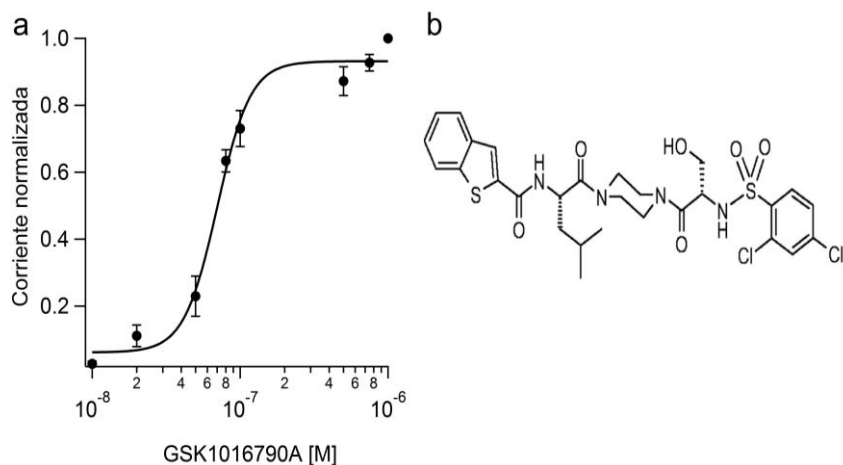


Figura 8. La activación del canal TRPV4 de rata por GSK1016790A es dependiente de la concentración. a) Curva dosis a respuesta de la activación del canal TRPV4 de rata ante diferentes concentraciones del agonista selectivo GSK1016790A. La línea continua representa el ajuste de los datos (n=5 por cada punto) a la ecuación de Hill. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. b) Estructura química del compuesto GSK1016790A. Tomado de Thorneloe et al. (2008).

La especificidad del compuesto GSK1016790A se comprobó evaluando las corrientes desencadenadas por parches de membrana inside-out de células HEK293 no transfectadas contra células HEK293 transfectadas con 1.5 μ g del ADN que codifica para el canal TRPV4 de rata. Los parches de membrana de células que no expresaron el canal no presentaron la activación de corrientes iónicas (Figura 9a y b, n=5), mientras que las células que sobreexpresaron al canal mostraron una robusta activación en respuesta al compuesto GSK1016790A (Figura 9c y d, n=5). Estos datos concuerdan con lo reportado por Thorneloe y colaboradores (2008) al describir a este compuesto como un agonista altamente selectivo del canal TRPV4.

La relación corriente a voltaje (I/V) de los canales iónicos y con ello la rectificación de un canal, dependen del tipo de ion que se encuentre fluyendo, de la concentración de este ión a ambos lados de la membrana y de la probabilidad de apertura ante el agonista a determinado voltaje. Acorde a esto, se decidió emplear una concentración de 5 mM de CaCl₂ en la pipeta, resultando en concentraciones de iones no isométricas. En la figura 9g (n=5), se aprecia una

rectificación saliente del canal en presencia de Ca^{2+} , a diferencia del comportamiento corriente-voltaje no rectificante en la figura 9f (n=5). A partir de estos datos, se decidió utilizar Ca^{2+} extracelular para alcanzar la propiedad de rectificación del canal TRPV4. Más aún, el poder observar la rectificación del canal bajo estas condiciones nos permitió determinar que la integridad de los parches de membrana con TRPV4 se mantenía ante el tratamiento astringente que constituye la exposición a un lisofosfolípido. Las corrientes lineales que se generan en presencia de únicamente Na^+ asemejan a aquellas en donde la corriente de fuga aumenta demasiado por efectos del lisofosfolípido sobre la membrana y es difícil determinar si se está rompiendo el sello de alta resistencia.

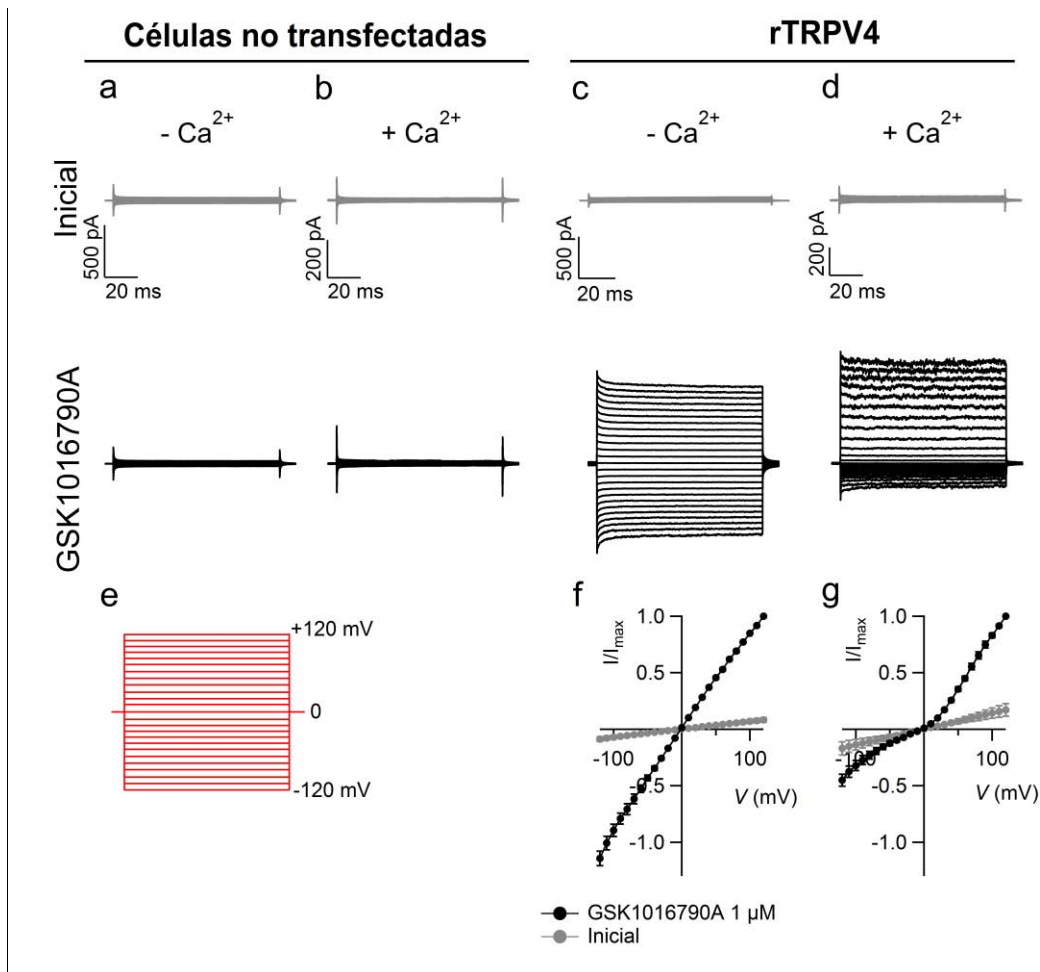


Figura 9. El canal TRPV4 alcanza rectificación en presencia de calcio extracelular. a y b) Trazos representativos de las corrientes obtenidas en parches de membrana inside-out antes (gris) y después de la aplicación de 1 μM de GSK1016790A (negro), tanto en células no transfectadas (a y b) como en células que sobreexpresan el canal rTRPV4 (c y d). e) Protocolo de voltaje para generar la curva de corriente en respuesta al voltaje (I/V) de los experimentos mostrados en a-d y e-f, de -120 a +120 mV en incrementos de 10 mV durante 100 ms. f y g) Relaciones corriente a voltaje bajo las condiciones mostradas en c y d.

Para determinar si la LPC 18:1 activa el canal TRPV4 de rata, se expresó a esta proteína en células HEK293 y se evaluó la respuesta del canal al estar expuesto a una solución con 5 μM de LPC 18:1 durante 3 minutos. El LPC 18:1 activó el 54% de las corrientes ($54.7 \pm 4.1\%$, $n=12$), en comparación a las corrientes activadas por 1 μM de GSK1016790A (Figura 10c) a voltajes de -60 y +60 mV, a diferencia de la nula respuesta observada tanto en parches de células sin transfectar expuestos a LPC 18:1 (Figura 10a, $n=5$) como en células que

expresan el canal rTRPV4 pero cuyos parches de membrana fueron expuestos solo al vehículo (DMEM/BSA 1% en solución de baño, n=3, Figura 10b).

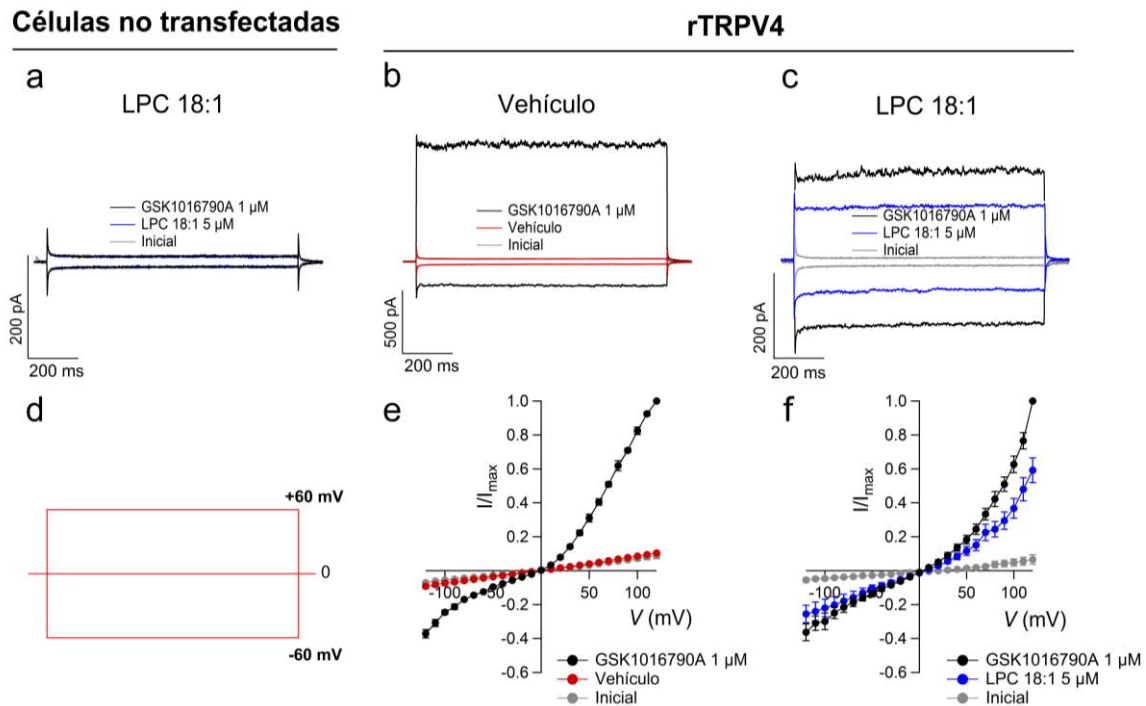


Figura 10. El canal rTRPV4 expresado en células HEK293 responde a LPC 18:1. a-c) Trazos representativos de las corrientes obtenidas de parches de membrana en la configuración inside-out, antes de la aplicación del lípido (gris), en presencia de 5 μ M LPC 18:1 (azul) o vehículo (rojo), y en la presencia de 1 μ M de GSK1016790A (negro) a -60 y +60 mV en células no transfectadas (a) y en células que sobreexpresan el canal TRPV4 de rata (b y c). d) protocolo de voltaje para los pulsos mostrados en a-c. e y f) Relaciones corriente a voltaje de -120 a +120 mV obtenidas en las mismas condiciones para b y c.

5.2 Otras especies de LPC no activan al canal rTRPV4

Debido a que se ha descrito que las dos especies de LPC que se encuentran en mayor concentración en los sueros de rata y humano son el LPC 18:0 y 16:0, se decidió probar si estas especies de lisofosfatidilcolina son capaces de activar al canal rTRPV4. Se observó que tanto la LPC 18:0 ($7.41 \pm 1.8\%$, n=14) y 16:0 ($-3.71 \pm 3.72\%$, n=8) son incapaces de activar parches de membrana de células que sobreexpresan al canal rTRPV4 en la configuración inside-out (Figura 11).

Estos datos sugieren que la activación de este canal requiere al menos la presencia de una insaturación, como ha sido descrito previamente para el LPA y el canal TRPV1 de rata (Morales-Lázaro et al., 2014), y que la activación del canal rTRPV4 involucra un mecanismo que no depende de cambios en las propiedades membranales (elasticidad, forma, etc).

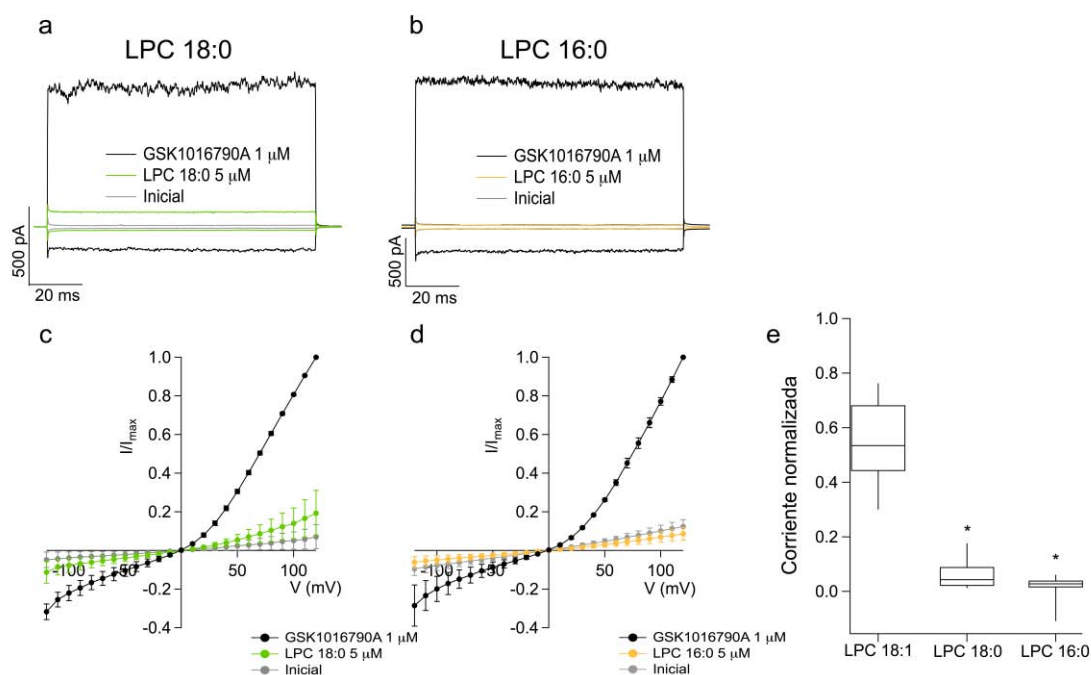


Figura 11. LPC 18:0 y 16:0 no activan al canal rTRPV4. a y b) Trazos representativos de la corrientes de TRPV4 en configuración inside-out para la corriente inicial (gris), en respuesta a 5 μM de LPC 18:0 (verde) o 5 μM de LPC 16:0 (naranja) y en la presencia de 1 μM de GSK1016790A (negro) a -60 mV y +60 mV. c y d) Relaciones corriente a voltaje de -120 a +120 mV para los experimentos mostrados en a y b (n=6 y 4 respectivamente). e) Diagrama de caja de la fracción de corriente activada por 5 μM de LPC 18:1 (n=12), 18:0 (n=14) y 16:0 (n=8) normalizada a la corriente obtenida con 1 μM de GSK1016790A (+60 mV). La línea horizontal entre las cajas indica la mediana, las cajas muestran los percentiles 25 y 75, y los bigotes representan los percentiles 5 y 95 de los datos. *indica $p < 0.0001$, con respecto a LPC 18:1.

5.3 El canal TRPV4 de humano responde a LPC

Debido a que la LPC 18:1 activa corrientes robustas mediadas por el canal TRPV4 de rata, se decidió probar si su homólogo, el canal TRPV4 de humano (97% de identidad de secuencia) (Nilius et al., 2004) es capaz de responder de la misma forma ante las tres especies de LPC.

El canal hTRPV4 heterológamente expresado en células HEK293 fue capaz de responder ante la presencia de 5 μ M de LPC 18:1 ($48.7 \pm 6\%$, n=9, Figura 12a), de manera similar a lo ocurrido en el canal rTRPV4 (Figura 9c). Sin embargo, 5 μ M de LPC 18:0 y 5 μ M de LPC 16:0 no activaron al canal hTRPV4 ($13.47 \pm 3.2 \%$, n=12 y $-2.07 \pm 3.6 \%$, n=5, respectivamente) (Figura 12b-e), emulando el comportamiento observado en el canal TRPV4 de rata y confirmando que la activación del canal ante LPC depende también de las características estructurales del lisofosfolípido.

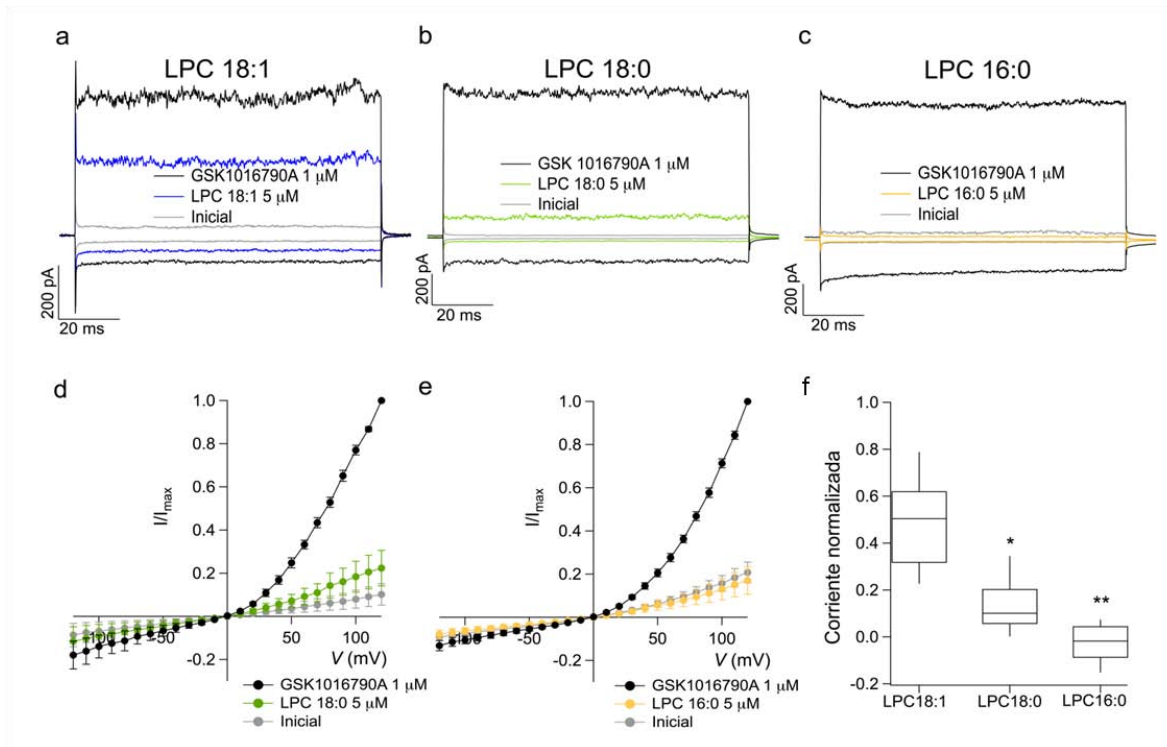


Figura 12. El canal TRPV4 de humano responde a LPC. a-c) Trazos representativos de parches de membrana inside-out que sobreexpresan el canal hTRPV4 en ausencia del agonista (gris), en la presencia de 5 μM de LPC 18:1 (azul), 18:0 (verde) o 16:0 (naranja), y con 1 μM de GSK1016790A (negro) a -60 y +60 mV. d y e) Relaciones corriente a voltaje de -120 a +120 mV para las condiciones en b y c. f) Diagrama de caja de la fracción de corriente activada por 5 μM de LPC 18:1 (n=9), 18:0 (n=12) y 16:0 (n=5) normalizada a la corriente obtenida con 1 μM de GSK1016790A (+60 mV). La línea horizontal entre las cajas indica la mediana, las cajas muestran los percentiles 25 y 75, y los bigotes representan los percentiles 5 y 95 de los datos. *indica $p < 0.0001$, con respecto a los valores de LPC 18:1.

Con la finalidad de evaluar las propiedades de activación de este canal por el agonista selectivo GSK1016790A, se realizó una curva de respuesta a la dosis similar a la descrita anteriormente para el canal rTRPV4. Los resultados obtenidos muestran que ambos canales se activan de forma similar ante el compuesto GSK1016790A, las constantes de disociación obtenidas por el ajuste de la curva a la ecuación de Hill arrojan un valor de K_d hTRPV4: 53.63 ± 8.4 nM y un coeficiente de Hill de 2.95 ± 1.22 (Figura 13), semejantes a los obtenidos para el canal de rata (K_d : 70.06 ± 4.7 nM, n_{Hill} : 3.86 ± 0.86).

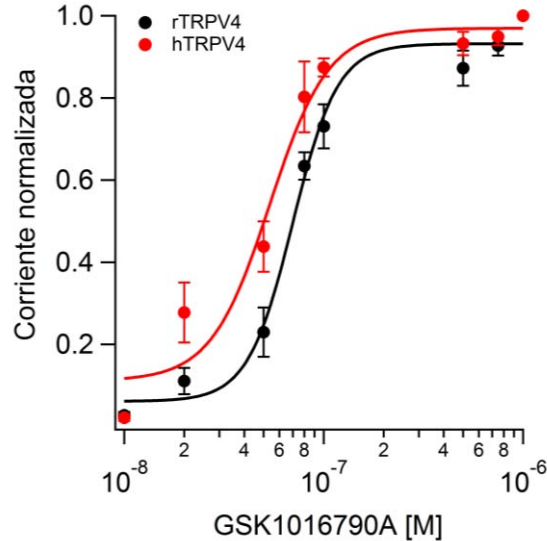


Figura 13. La respuesta a GSK1016790A es similar entre los canales TRPV4 de rata y humano. Corrientes activadas por el canal rTRPV4 (círculos negros) y hTRPV4 (círculos rojos) en presencia de GSK1016790A a diferentes concentraciones. Las corrientes obtenidas en las diferentes concentraciones fueron normalizadas al valor máximo obtenido en presencia de 1 μ M de GSK1016790A.

5.4 El TRPV4 es activado por LPC a través de la interacción con la región carboxilo terminal del canal

Previamente, Nieto-Posadas y colaboradores (2012) demostraron que el LPA activa al canal rTRPV1 a través de una interacción electrostática entre el lípido negativamente cargado y el residuo de lisina positivamente cargado en la posición 710 localizado en la caja TRP del C-terminal de este canal. Tras examinar las similitudes entre las secuencias de los canales rTRPV1 y rTRPV4 (41% de identidad de secuencia) (Moiseenkova-Bell et al., 2008), se observó la presencia de un residuo positivamente cargado homólogo a la K710 del canal TRPV1 (el residuo de arginina 746) (Figura 14a). Por lo tanto, se decidió utilizar mutagénesis dirigida sobre la secuencia del rTRPV4 para sustituir la arginina positivamente cargada en la posición 746 por un aspartato negativamente cargado.

Esta mutante rTRPV4-R746D exhibió una expresión en membrana similar al canal silvestre, sin embargo las corrientes registradas en experimentos inside-out evidenciaron que la activación de este canal ante 5 μ M de LPC 18:1 es

significativamente menor ($14.4 \pm 9.6\%$, $n=12$, $p<0.001$), en comparación a la activación del canal silvestre (Figura 14 b y c). Por lo tanto, esto sugiere que este residuo es crucial para la interacción entre el canal TRPV4 y el LPC.

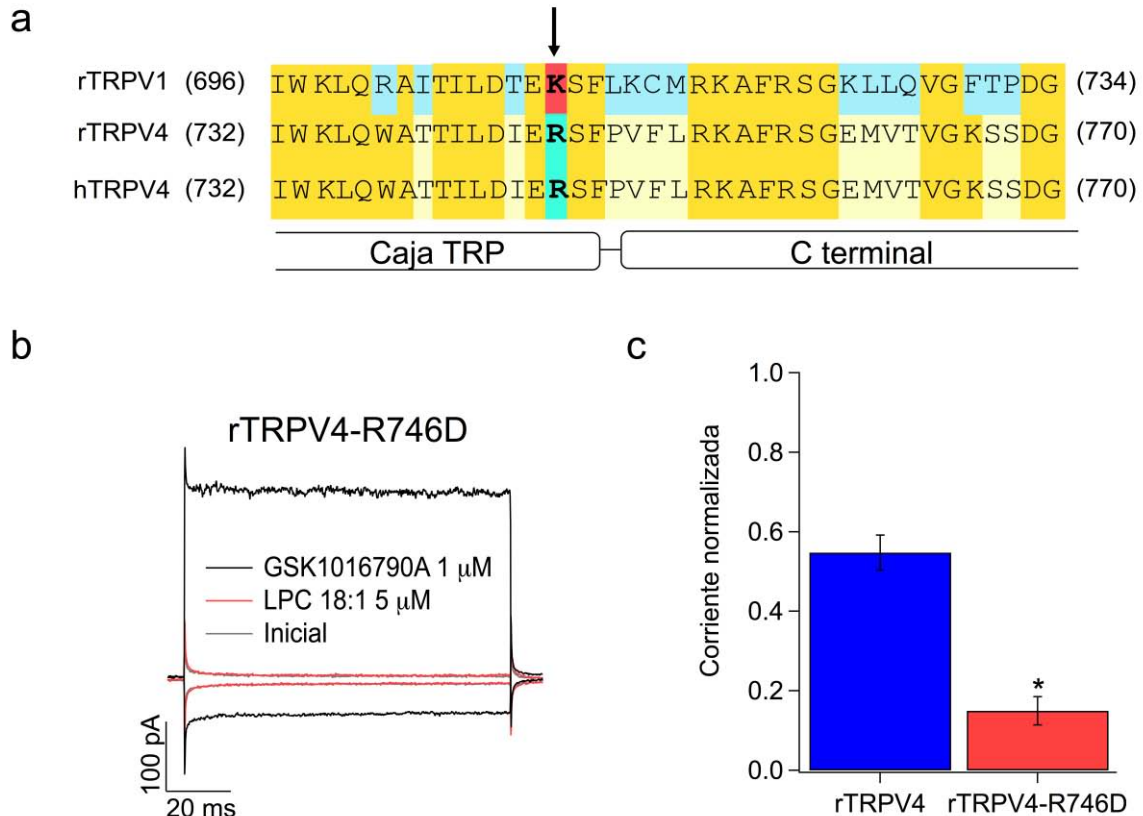


Figura 14. La activación del canal rTRPV4 por LPC 18:1 disminuye como resultado de la mutación R746D. a) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región C-terminal que comprende la caja TRP de los canales TRPV1 de rata, y TRPV4 de rata y humano. El área anaranjada marca los residuos de aminoácidos conservados entre estos canales. La flecha indica el residuo R746 en el canal TRPV4 de rata y humano corresponde al residuo K710 del canal TRPV1 de rata. Alineación realizada en Vector NTI (ThermoFisher). b) Trazo representativo de la respuesta del canal rTRPV4-R746D en configuración inside-out antes (gris) y después de la exposición a 5 μM de LPC 18:1 (rojo), y 1 μM de GSK1016790A (negro) a -60 y +60 mV. c) Gráfico de barras que muestra la media de la corriente activada a +60 mV en el canal rTRPV4-WT (azul) y rTRPV4-R746D (rojo) después de la exposición a LPC 18:1 5 μM . * indica $p<0.001$.

5.5 La mutación R746D no altera la activación del canal por GSK1016790A

Con la finalidad de comprobar que la mutación R746D únicamente altera la unión del LPC 18:1 al canal rTRPV4 y no las propiedades de compuerta y alosterismo del canal, se decidió evaluar su respuesta a diferentes concentraciones de GSK1016790A. La respuesta del canal mutado, en comparación al canal silvestre, al agonista selectivo GSK1016790A se mantuvo prácticamente sin cambios (Figura 15). Tanto el coeficiente de Hill como la constante de disociación para GSK1016790A son similares en ambos canales: $K_d_{WT} = 70.06 \pm 4.7$ nM y $n_{Hill} = 3.86 \pm 0.86$, y $K_d_{R746D} = 66.02 \pm 8.1$ nM y $n_{Hill} = 2.79 \pm 0.97$, apoyando la hipótesis de que la interacción entre la LPC y el canal TRPV4 está mediada por el residuo de arginina 746.

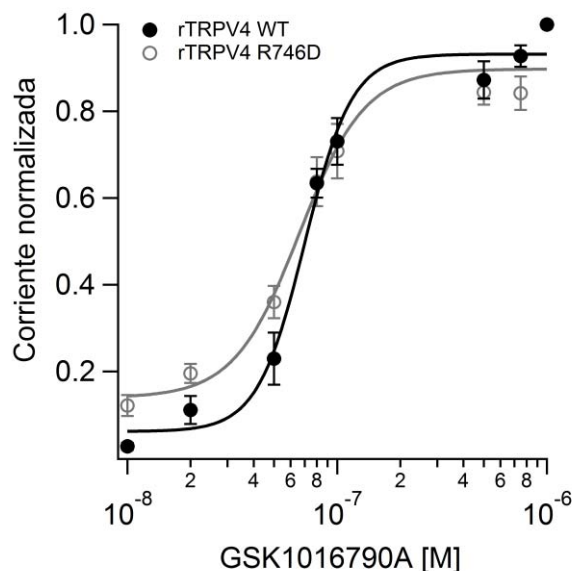


Figura 15. El canal rTRPV4-R746D responde a GSK1016790A de forma similar al canal silvestre. Corrientes activadas por el canal rTRPV4 WT (círculos negros) y rTRPV4-R746D (círculos vacíos) en presencia de GSK1016790A a diferentes concentraciones (n=5 para cada punto). Las corrientes obtenidas en las diferentes concentraciones fueron normalizadas al valor máximo obtenido en presencia de 1 μ M de GSK1016790A.

5.6 La LPC activa al canal hTRPV4 con mutaciones para sitios de interacción a PIP₂

Debido a que el sitio de unión a LPA en el canal rTRPV1 también constituye un sitio de unión a PIP₂ (Nieto-Posadas et al., 2012), se decidió probar si mutaciones en los sitios descritos para unión del PIP₂ en el canal hTRPV4 (García-Elías et al., 2013; Takahashi et al., 2014) afectaban la interacción con la LPC. Estos sitios descritos para la unión de PIP₂ en el canal hTRPV4 se encuentran en la región N-terminal del canal en los residuos R269 y ¹²¹KRWRK¹²⁵ (García-Elías et al.; Takahashi et al., 2014). Los datos obtenidos con mutantes del canal en estos sitios mostraron que las corrientes activadas en hTRPV4-R269H (42.03 ± 6.4 %, n=5) y hTRPV4-¹²¹AAWAA¹²⁵ (43.5 ± 3.9%, n=5) por 5 µM de LPC 18:1, exhiben una respuesta similar a la observada para el canal hTRPV4-WT (p>0.1), lo que demuestra que estos sitios no son requeridos para la activación por LPC 18:1 (Figura 16).

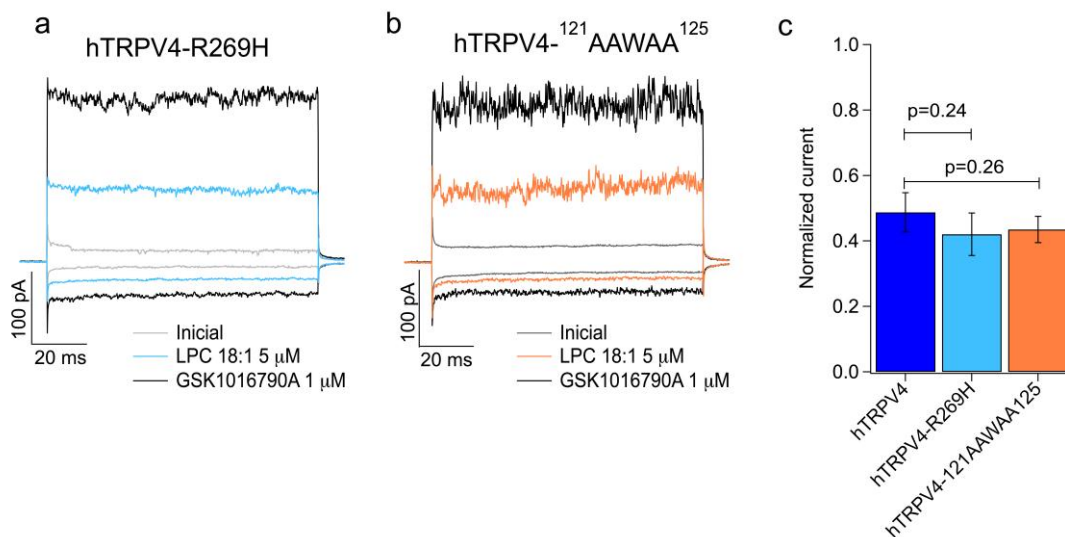


Figura 16. El canal hTRPV4 con mutaciones que alteran la unión a PIP₂ es activado por LPC. a-b) Trazos representativos de la activación de los canales mutados hTRPV4-R269H (42.03 ± 6.4%, n=5) y hTRPV4-¹²¹AAWAA¹²⁵ (43.5 ± 3.9%, n=5) por LPC 5 µM (azul cielo o naranja respectivamente) o 1 µM de GSK1016790A (negro) a -60 y +60 mV. c) Gráfico de barras que muestra la fracción de corriente activada por 5 µM de LPC en los canales hTRPV4-WT, hTRPV4-R269H y hTRPV4-¹²¹AAWAA¹²⁵, normalizada a la corriente obtenida en 1 µM de GSK1016790A a 60 mV.

5.7 Mutaciones del TRPV4 descritas en humanos alteran la activación por LPC

Después de examinar la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido o dbSNPs (por sus siglas en inglés: database of Single Nucleotide Polymorphisms de la NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), se encontró que en humanos han sido reportadas dos mutantes para el residuo 746, mismas que resultan en la sustitución de la arginina por una cisteína o una glicina. Aunque las consecuencias de dichas mutaciones en humanos no han sido descritas, se decidió estudiar si estas mutantes respondían de manera distinta a la LPC 18:1. La Figura 17 muestra los resultados que se obtuvieron con las mutantes hTRPV4-R746C y hTRPV4-R746G. En síntesis, el resultado fue que dichas mutantes se activaron en presencia de 1 μ M de GSK1016790A, pero no en presencia de 5 μ M de LPC 18:1.

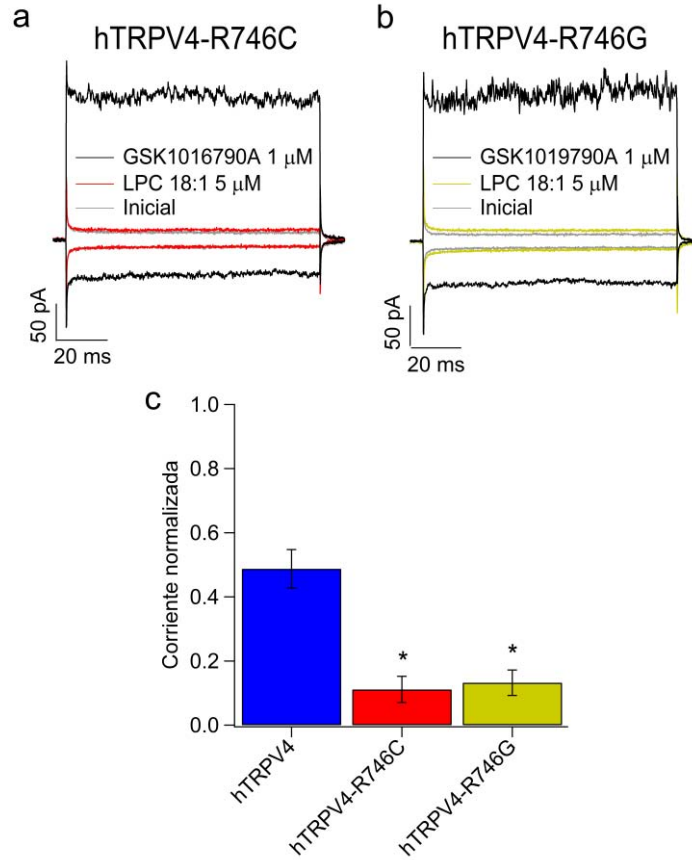


Figura 17. Mutaciones en el residuo R746 resultan en nula respuesta a LPC. a y b) Se muestran trazos representativos de la activación de los canales mutantes hTRPV4-R746C y hTRPV4-R746G por 5 μ M de LPC (rojo y olivo respectivamente) o en respuesta a GSK1016790A 1 μ M (negro) a -60 y +60 mV. c) Gráfico de barras que muestra la fracción de corriente activada por 5 μ M de LPC 18:1 en los canales hTRPV4-WT ($48.6 \pm 6\%$, n=9), TRPV4-R746C ($11.1 \pm 4\%$, n=10) y TRPV4-R746G ($13.2 \pm 3\%$, n=5), normalizada a la corriente activada con 1 μ M de GSK1016790A (60 mV). * indica $p < 0.001$.

6. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el lisofosfolípido LPC es un activador directo del canal TRPV4, cuyo mecanismo requiere de la interacción de este lípido con el residuo de arginina 746 localizado en la caja TRP de la región C-terminal de este canal. Este sitio de unión comparte características estructurales similares a las descritas para los sitios de interacción con el PIP₂ y el 5',6'-EET, las únicas dos moléculas endógenas que hasta el momento se sabe que interactúan de manera directa con el canal. Es decir, los residuos R269 (Takahashi et al., 2014) y ¹²¹KRWRK¹²⁵ (García-Elias et al., 2013) contienen residuos de carga positiva al igual que el sitio 746, con el que interacciona la LPC, que es una arginina.

Semejante a lo reportado para la interacción del canal rTRPV1 con LPA (Morales-Lázaro et al., 2014), los canales TRPV4, tanto de rata como de humano, muestran especificidad en la longitud de la cadena de carbonos y en el grado de insaturación. En el presente estudio se determinó que el TRPV4 responde ante moléculas de LPC de cadena larga (C18) que presentan una insaturación en el carbono 9. El hecho de que las otras dos especies de LPC no sean capaces de activar al canal TRPV4 demuestra la importancia que tienen la longitud de la cadena de carbonos y la presencia de una insaturación, lo que estructuralmente incrementa la posibilidad de moverse y adoptar diferentes ángulos de torsión a partir de una flexión en la cadena, y que esto posiblemente permite estabilizar la unión al residuo R746.

También consistente con los datos de este estudio es que, tanto en el canal TRPC5 como en el TRPM8, la respuesta desencadenada por LPC depende de la longitud del ácido graso, siendo mayor la respuesta ante la LPC 18:1 en contraste con la del 16:0 (Abee et al., 2006; Flemming et al., 2006). Aunque no ha sido descrito el sitio de interacción del LPC sobre estos dos canales, un alineamiento de la secuencia del canal rTRPC5 con el canal rTRPV4 arrojó un residuo homólogo al R746 del TRPV4, el residuo R820. Este mismo procedimiento en el canal rTRPM8 no mostró un residuo conservado. Esto podría sugerir que el

mecanismo de interacción entre el canal TRPC5 es parecido al que ocurre en el canal TRPV4, mecanismo que posiblemente sea distinto para el caso del TRPM8.

Es notable que la presencia de este residuo positivamente cargado en la caja TRP del canal no garantiza la activación por LPC, como sucede en el canal rTRPV1 que no se activa en presencia de este lisofosfolípido (Nieto-Posadas et al., 2012). Sin embargo, aún y cuando el LPC pudiera interactuar con el residuo correspondiente en el TRPV1 (K710), esto no necesariamente tiene que producir su activación ya que el paso del estado cerrado al abierto en un canal iónico depende de la barrera de energía que tiene que sobrepasar para lograr su apertura. Dichas energías son muy disimiles entre cada canal.

Recientemente se ha resuelto la estructura del canal TRPV4 de *X. tropicalis* mediante la técnica de cryo-EM (Deng et al., 2018). En ella, al igual que en los otros sitios de unión antes mencionados, el residuo R742 homólogo al R746 de rata y humano se encuentra en el lado citosólico de la proteína, específicamente paralelo a la membrana (Figura 18), constituyendo una vía de fácil acceso a cualquier molécula, como es el caso de la LPC. Al igual que lo que se ha reportado para el canal TRPV1, sugerimos que la unión del LPC 18:1 al R746 promueve un cambio conformacional en la estructura del canal que probablemente permite el desplazamiento de la caja TRP de manera paralela a la membrana, como el descrito por Morales-Lázaro y colaboradores (2014), conduciendo finalmente a la apertura del canal.

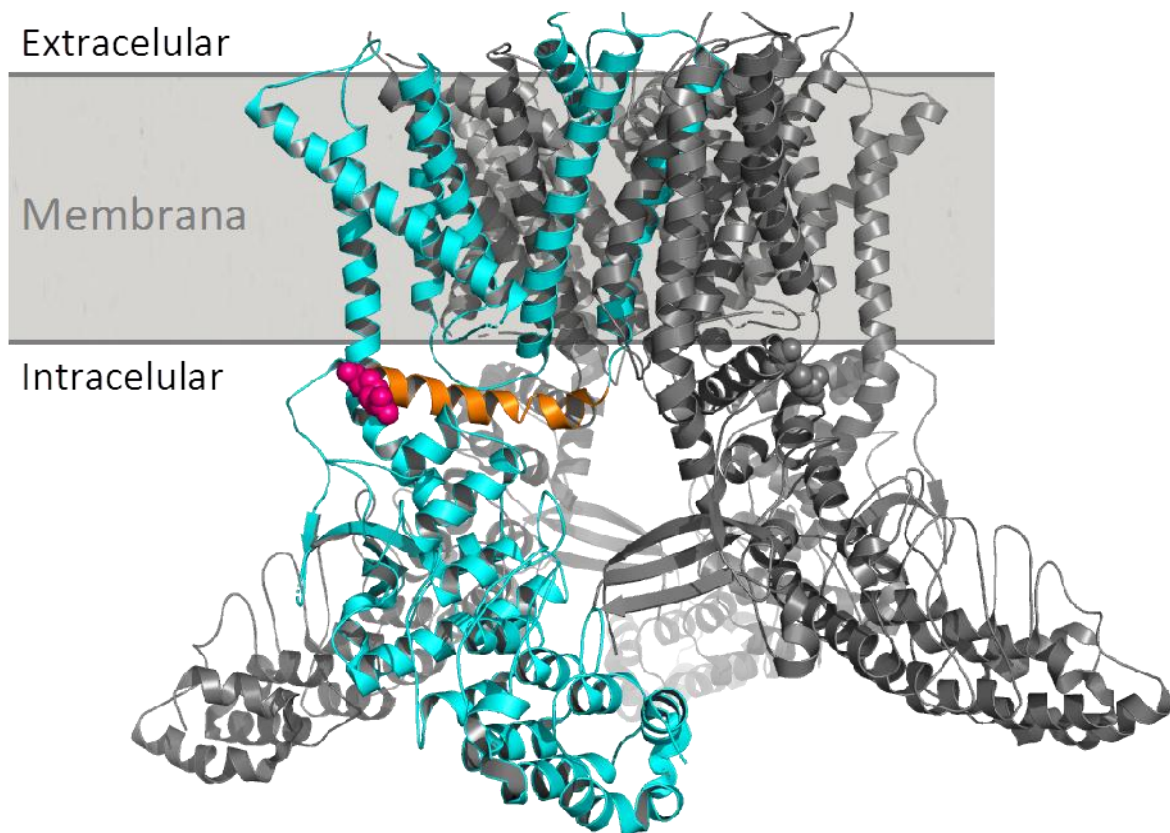


Figura 18. Diagrama de listón que representa la estructura cuaternaria del canal xTRPV4 por Cryo-EM. Se muestra en azul una de las cuatro subunidades del canal, la caja TRP se presenta en color naranja, mientras que el residuo R742 se indica de color rosa. El esquema fue realizado en PyMOL 2.1 a partir de la estructura depositada por los autores en la Protein Data Bank (RSCB PDB) con el código de acceso 6BBJ (Deng et al., 2018).

A pesar de que el efecto de los lisofosfolípidos sobre los canales iónicos ha sido tradicionalmente ligado a modificaciones de la membrana que llevan a cambios en la función del canal (Killian y de Kruijff, 2004), las mutaciones presentadas en este estudio (R746D, R746C y R746G) permiten demostrar que la actividad de la LPC sobre la actividad de los canales TRPV4 está mediada por el residuo R746, y no por las modificaciones que *per se* pueda originar este lisofosfolípido sobre la membrana, debido a que atenúan de manera significativa la actividad de la LPC. Más aún, consistente con el hecho de que la LPC no produce

la activación del TRPV4 a través de efectos en la fluidez o forma de la membrana, otras especies con longitud distinta no activan al canal.

Además, el hecho de que la LPC active al canal hTRPV4-R269H y hTRPV4-¹²¹AAWAA¹²⁵ indica que, a diferencia de otros estímulos como el calor, la hipotonicidad y el 5',6'-EET (García-Elías et al., 2013), no depende de la modificación alostérica que el PIP₂ induce en el canal para lograr la activación ni tampoco de efectos en la membrana.

Las mutaciones en el canal TRPV4 están asociadas con un amplio espectro de enfermedades hereditarias. Varios informes han identificado mutaciones en el canal TRPV4 como la causa directa de neuropatías autosómicas dominantes primarias y displasias esqueléticas, entre las que destaca la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2C (CMT2C) (Nilius y Voets, 2013). En el presente estudio, se ha demostrado que mutaciones puntuales en los codones que codifican para la R746, reportados en la dbSNPs, las cuales sustituyen a la arginina por una cisteína (R746C) o una glicina (R746G) alteran la unión del LPC al canal, impidiendo así su activación. Sin embargo, no existen fenotipos asociados a estas mutaciones, por lo que las repercusiones a nivel fisiológico no han sido dilucidadas.

Wiesner y colaboradores (2009) han determinado una concentración de LPC total de $330 \pm 168 \mu\text{M}$ en el plasma de humanos sanos, mientras que en el suero de ratón es de $66 \mu\text{M}$ (Bollinger et al., 2010), las que abarcan especies de diversas longitudes de cadena (6:0, 12:0, 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:4, 22:6, 24:0, entre otras) (Bollinger et al., 2010). Diversas son las condiciones patofisiológicas en donde las que se ha reportado una modificación de las concentraciones de la LPC, como lo descrito para sujetos humanos asmáticos en donde las especies 16:0 y 18:0, pero no 18:1, duplican sus concentraciones con respecto a los sujetos control (Yoder et al., 2014). En pacientes con aterosclerosis se ha reportado que hay un incremento en la actividad de la enzima LCAT (Wells et al., 1986) que incrementa las concentraciones de LPC que posteriormente formarán parte de la lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL) que ejerce

efectos inflamatorios sobre las células vasculares (Carvajal, 2015). Además, la isquemia y reperfusión en el riñón de rata resulta en un incremento de la actividad de la PLA₂, relacionado a la degradación de los fosfolípidos membranales hacia ácidos grasos como el LPC o el AA, elevando sus concentraciones tisulares (Nakamura et al., 1991).

Más aún, Aukema y colaboradores (1992) describieron la desregulación de las concentraciones de lípidos membranales en riñones de ratones con la enfermedad poliquística renal (PKD), mismas que se encuentran aumentadas para la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y el colesterol, mientras que las concentraciones de fosfatidilinositol y la cardiolipina están disminuidas. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce un estatus de las concentraciones de LPC en modelos de animales con la enfermedad poliquística renal, lo cual dificulta el estudio de los efectos de los cambios en la concentración de la LPC en modelos animales.

La LPC ha sido descrita como una molécula capaz de inducir la expresión de la enzima COX-2 (Zembowicz et al., 1995), cuya activación enzimática depende de la longitud y el grado de saturación de la cadena acilo del LPC (Brkić et al., 2012). En ratas con PKD, las concentraciones de esta enzima están disminuidas, mientras que las concentraciones de las cPLA2 y COX-1 están aumentadas (Aukema et al., 2003).

Lo anterior, aunado a que Blazer-Yost y colaboradores (2011) han descrito concentraciones elevadas de LPA en los quistes renales de ratones con PKD, y a que la activación del canal TRPV4 por GSK1016790A en cultivos primarios de células del túbulo colector atenua los efectos de la PKD como la baja concentración de Ca²⁺ intracelular (Zaika et al., 2013), sugieren un papel fisiológicamente relevante para la interacción del LPC con el canal TRPV4 en los túbulos colectores de los riñones de mamíferos.

Por otra parte, el prurito, definido como una *sensación no placentera que desencadena un efecto reflejo a rascarse* (Ikoma et al., 2006), ha recibido relativamente poca atención en el campo de la fisiología y su mecanismo es

actualmente poco entendido (Sun y Dong, 2016). Recientemente ha crecido el interés por dilucidar el papel que juegan los canales TRP en el prurito, hasta ser denominados pruriceptores. Estos canales comprenden al TRPA1, TRPV1, TRPV3 (Tóth et al., 2015) y el recientemente incluido TRPV4 (Chen et al., 2016). Para este último, su acción como pruriceptor se ha descrito por el grupo de investigación de Wolfgang Liedtke (Moore et al., 2013; Chen et al., 2016). El mecanismo de acción del TRPV4 en el prurito ha sido planteado en queratinocitos en experimentos donde el rascado de los animales es inducido por la inyección intradérmica de pruritógenos como la histamina y endotelina-1. En estos mismos experimentos, el rascado disminuye significativamente en ratones con el gen *trpv4* eliminado específicamente en los queratinocitos de la piel (Chen et al., 2016). De manera particular, este mecanismo consiste en la activación del canal TRPV4 de los queratinocitos por una cascada de señalización de los pruritógenos unidos a sus GPCRs, lo que aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular y lleva a la fosforilación de la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), promoviendo así la secreción de diferentes moléculas, como las interleucinas (Nguyen et al., 2012; Greter et al., 2012; Cevikbas et al., 2014) o la endotelina (Moore et al., 2013) que participan en la activación de células pruriceptoras que transducen esta secuencia de eventos hasta terminar en un comportamiento de rascado (Chen et al., 2016).

En electrofisiología, la ecuación de Hill ha sido usada para construir modelos probabilísticos en torno a la relación de un ligando con un receptor, generalmente un canal iónico (Weiss, 1977), cuya relación es saturable y no lineal (Goutelle et al., 2008). Aunado a esto, el ajuste permite conocer el valor del coeficiente de Hill, comúnmente usado para estimar el número de moléculas de ligando que son requeridas para unirse a un receptor y producir un efecto funcional (Weiss, 1977). Existen diversos reportes sobre la cinética de activación del canal TRPV4 por el compuesto GSK1016790A; sin embargo, todos estos datos han sido obtenidos mediante registros en la configuración de célula completa del patch-clamp (Thorneloe et al., 2008; Xu et al., 2009) o por estudios de fluorimetría de Ca^{2+}

(Min et al., 2011; Denadai-Souza et al., 2012; Alenmyr et al., 2014; Rajasekhar et al., 2015; Narita et al., 2015).

La mejor forma de evaluar la cinética de activación de un canal iónico es mediante ensayos electrofisiológicos. De acuerdo con esto, Thorneloe y colaboradores (2008) reportan un valor de EC_{50} (Concentración de activación media) de 3 nM para GSK1016790A en el canal hTRPV4 heterológamente expresado en células HEK293, obtenido a un voltaje de +60 mV. Por otra parte, Xu y colaboradores (2012) obtuvieron un valor de EC_{50} de 11 nM para la activación del canal TRPV4 por GSK1016790A en células uroteliales de cuyos.

Es evidente que las concentraciones medias de activación entre los estudios previos y el aquí reportado (K_d hTRPV4: 53.63 ± 8.4 nM y K_d rTRPV4: 70.06 ± 4.7 nM) son distintas. Tal diferencia puede radicar en que, al ser calculada la interacción en la configuración de célula completa, la sensibilidad de un ligando a su receptor está influenciada por varios factores, entre los que se incluyen las interacciones con proteínas adyacentes (Goutelle et al., 2008). Además, factores como el tiempo de exposición al compuesto, el voltaje al que se realizan los registros y la concentración de iones en las soluciones de registro utilizadas, son variables importantes a considerar en este tipo de cuantificaciones. En nuestro estudio, las posibles interferencias del canal ante componentes celulares son eliminadas.

Actualmente se desconoce el sitio de interacción del canal TRPV4 con el compuesto GSK1016790A. En los experimentos aquí mostrados, el lado intracelular de la proteína está expuesto a la solución de GSK1016790A, mientras que en los experimentos citados (Thorneloe et al., 2008; Xu et al., 2012) la parte extracelular de la proteína es la que está en contacto con la solución de GSK1016790A. Esta diferencia es fundamental para entender las diferencias de coeficientes medidos, ya que en dado caso de que el sitio de unión de este compuesto sea del lado extracelular, explicaría la discrepancia entre los datos obtenidos.

Aunque los mecanismos por los cuales la regulación y actividad del canal TRPV4 no han sido del todo dilucidados, es fundamental conocer la estructura

para comprender su función. En este contexto, la LPC representa una molécula emergente para la regulación de la actividad del canal TRPV4 bajo contextos fisiológicamente relevantes y por medio de una interacción directa con una región del canal.

7. CONCLUSIONES

La activación del canal TRPV4 es regulada por el lisofosfolípido LPC, un proceso que involucra la unión de este al residuo R746 positivamente cargado, ubicado en la caja TRP en el extremo C-terminal del canal.

Dicha activación es dependiente de la longitud de carbonos y de la presencia de una insaturación en la molécula de LPC, y no parece depender de los sitios de unión a PIP_2 ni de las modificaciones sobre la membrana. Además, la mutación del residuo R746 ha sido reportada en humanos, lo que expresado en un sistema heterólogo impide la interacción entre el LPC y el canal.

8. EXPERIMENTOS FUTUROS

Una de las incógnitas que parten de este proyecto es conocer la relevancia que adquieren las mutaciones R746C y R746G en un contexto fisiológico. Para contestar esta pregunta, se generarán ratones transgénicos que expresen dichas mutaciones y posteriormente será evaluada la respuesta del canal en queratinocitos y células del riñón, específicamente bajo el contexto del papel del canal TRPV4 en el prurito y en la PKD (cruzando a los ratones transgénicos que se generen con ratones comerciales modelo de la PKD). Además, se cuantificarán las concentraciones de las tres principales especies de LPC en los sueros de pacientes con PKD con la finalidad de corroborar la participación de la LPC en esta enfermedad.

8. REFERENCIAS

- Abeelev FV**, Zholos A, Bidaux G, Shuba Y, Thebault S, Beck B, Flourakis M, Panchin Y, Skryma R, Prevarskaya N. **2006**. Ca²⁺-independent phospholipase A2-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (52): 40174–40182.
- Ahn**, W. G., Jung, J. S., Kwon, H. Y., & Song, D. K. **2017**. Alteration of Lysophosphatidylcholine-related metabolic parameters in the plasma of mice with experimental sepsis. *Inflammation*, 40 (2): 537-545.
- Alberts**, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. **2004**. Transporte de moléculas pequeñas a través de membrana y propiedades eléctricas de las membranas. Capítulo 11. En: Alberts et al (Eds). *Biología molecular de la célula* (4^o ed.). Omega: Barcelona: 615-658.
- Alenmyr**, L., Uller, L., Greiff, L., Högestätt, E. D., y Zygmunt, P. M. **2014**. TRPV4-mediated calcium influx and ciliary activity in human native airway epithelial cells. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 114 (2): 210-216.
- Andersson**, D.A., Nash, M. y Bevan, S. **2007**. Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Neuroscience*, 27 (12): 3347-3355.
- Aukema**, H. M., Yamaguchi, T., Takahashi, H., Celi, B., & Holub, B. J. **1992**. Abnormal lipid and fatty acid compositions of kidneys from mice with polycystic kidney disease. *Lipids*, 27 (6): 429-435.
- Aukema**, H.M., Adolphe, J., Mishra, S., Jiang, J., Cuozzo, F.P., Ogborn, M.R. **2003**. Alterations in renal cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenases in polycystic kidney disease. *The Federation of American Societies for Experimental Biology journal*, 17 (2): 298-300.
- Birnbaumer**, L., Yidirim, E. y Abramowitz, J. **2003**. A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium*, 33 (5): 419-432.

- Blazer-Yost**, B.L., Blacklock, B.J., Flaig, S., Bacallao, R.L. y Gattone, V.H. **2011**. Lysophosphatidic acid is a modulator of cyst growth in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28 (6): 1255-1264.
- Bollinger**, J.G., Li, H., Sadilek, M. y Gelb, M.H. **2010**. Improved method for the quantification of lysophospholipids including enol ether species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 51 (2): 440-447.
- Brkić**, L., Riederer, M-, Graier, W.F., Malli, R. y Frank, S. **2012**. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on cyclooxygenase (COX)-2 expression in endothelial cells. *Atherosclerosis*, 224 (2): 348-354.
- Brohawn**, S.G., Su, Z. y MacKinnon, R. **2014**. Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (9): 3614-3619.
- Caires**, R., Sierra-Valdez, F.J., M. Millet, J.R., Herwig, J.D., Roan, E., Vásquez, V. y Cordero-Morales, J.F. **2017**. Omega-3 fatty acids modulate TRPV4 function through plasma membrane remodeling. *Cell reports*, 21 (1): 246-258.
- Carvajal** Carvajal, C. **2015**. LDL oxidada y la aterosclerosis. *Medicina legal de Costa Rica*, 32 (1): 161-169.
- Cevikbas**, F., Wang, X., Akiyama, T., Kempkes, C., Savinko, T., Antal, A., Kukova, G., Buhl, T., Ikoma, A., Buddenkotte, J., Soumelis, V., Feld, M., Alenius, H., Dillon, S.R., Carstens, E., Homey, B., Basbaum, A. y Steinhoff, M. **2014**. A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: involvement of TRPV1 and TRPA1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133 (2): 448-460.
- Chaudhuri**, P., Rosenbaum, M.A., Sinharoy, P., Damron, D.S., Birnbaumer, L. y Graham, L.M. **2016**. Membrane translocation of TRPC6 channels and endothelial migration are regulated by calmodulin and PI₃ kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (8): 2110-2115.
- Chen**, Y., Fang, Q., Wang, Z., Zhang, J. Y., MacLeod, A. S., Hall, R. P., & Liedtke, W. B. **2016**. Transient receptor potential vanilloid 4 ion channel functions as a pruriceptor in epidermal keratinocytes to evoke histaminergic itch. *Journal of Biological Chemistry*, 291 (19): 10252-10262.

- Ciardo**, M.G. y Ferrer-Montiel, A. **2017**. Lipids as central modulators of sensory TRP channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1859: 1615-1628.
- Clapham**, D.E. **2007**. Snapshot: Mammalian TRP Channels. *Cell*, 129 (1): 220-221.
- Clapham**, D.E., Julius, D., Montell, C. y Schultz, G. **2005**. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews*, 57 (4): 427– 450.
- Clapham**, D.E., Runnels, L.W. y Strübling, C. **2001**. The TRP ion channel family. *Nature Neuroscience Reviews*, 2 (6): 287-296.
- Cosens**, D. J., & Manning, A. **1969**. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224 (5216): 285.
- D'Arrigo**, P. y Servi, S. **2010**. Synthesis of lysophospholipids. *Molecules*, 15 (3): 1354-1477.
- Dhaka**, A., Viswanath, V. y Patapoutian, A. **2006**. TRP ion channels and temperature sensation. *Annual Review of Neuroscience*, 29: 135-161.
- Denadai-Souza**, A., Martin, L., de Paula, M. A. V., de Avellar, M. C. W., Muscará, M. N., Vergnolle, N. y Cenac, N. **2012**. Role of transient receptor potential vanilloid 4 in rat joint inflammation. *Arthritis and Rheumatology*, 64(6): 1848-1858.
- Deng**, Z., Paknejad, N., Makshev, G., Sala-Rabanal, M., Nichols, C.G., Hite, R.K. y 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.
- Drzazga**, A., Sowinska, A., Krzeminska, A., Rytczak, P., Koziolkiewicz, M., Gendaszewska-Darmach, E. **2017**. Lysophosphatidylcholine elicits intracellular calcium signaling in GPR55-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 489 (2): 31045-31048.
- Fermini**, B. **2008**. Recent advances in ion channel screening technologies. In: Fermini, B. y Priest, B.T. (Eds). *Ion channels*. Springer: Berlin 1-25.
- Flemming**, P.K., Dedman, A.M., Xu, S.Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., Benham, C.D., Bateson, A.N., Muraki, K. y Beech, D.J. **2006**. Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8): 4977-4982.

- Flockerzi, V. 2007.** An introduction of TRP channels. In: Flockerzi, V. y Nilius, B. (eds). **2007.** Transient Receptor Potential (TRP) channels. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Germany: 1-19.
- Flockerzi, V. 2008.** TRP channels. In: Offermans, S. y Rosenthal, W. (Eds). Encyclopedia of molecular pharmacology (2nd Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Germany: 1243-1246.
- Franciolini, F. y Petris, A. 1988.** Single channel recording and gating function of ionic channels. *Experientia*, 44 (3): 183-280.
- Gadsby, D.C. 2009.** Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. Nature reviews. *Molecular Cell Biology*, 10 (5): 344-352.
- Garcia-Elias, A., Mrkonjić, S., Pardo-Pastor, C., Inada, H., Hellmich, U. A., Rubio-Moscardó, F., Plata, C., Gaudet, R., Vicente, R. y Valverde, M. A. 2013.** Phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate-dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23): 9553-9558.
- Gouaux, E. y MacKinnon, R. 2005.** Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science*, 310(5753): 1461-1465.
- Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., & Maire, P. 2008.** The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental and clinical pharmacology*, 22(6): 633-648.
- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Künding, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M. y Becher, B. 2012.** Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity*, 37 (6): 1050-1060.
- Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., & Caterina, M. 2002.** Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *Journal of Neuroscience*, 22 (15): 6408-6414.
- Hardin, J., Bertoni, G.P. y Kleinsmith, L.J. 2012.** Becker's world of the cell (8^a Ed). Pearson Education, USA.

- Hille**, B. y Catterall, W.A. **2012**. Electrical excitability and ion channels. Capítulo 4. En: Brady, S.T., Siegel, G.J., Wayne Alberts, R. y L. Price, D. (Eds). 2012. Basic neurochemistry. Principles of molecular, celular and medical neurobiology (8° Ed.). Elsevier Academic Press: China.
- Huynh**, K.W., Cohen, M.R., Jiang, J., Samanta, A., Lodowski, D.T., Zhou, Z.H. y Moiseenkova-Bell, V.Y. **2016**. Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM. *Nature communications*, 7: 11130.
- Ikoma**, A., Steinhoff, M., Ständer, S., Yosipovitch, G. y Schmelz, M. **2006**. The neurobiology of itch, *Nature Reviews Neuroscience*, 7 (7): 535-547.
- Kabarowski**, J.H. **2009**. G2A and LPC: regulatory functions in immunity. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 89 (3-4): 73-81
- Khan**, S. Y., McLaughlin, N. J., Kelher, M. R., Eckels, P., Gamboni-Robertson, F., Banerjee, A. y Silliman, C. C. **2010**. Lysophosphatidylcholines activate G2A inducing Gai-1/Gαq/11-Ca²⁺ flux, Gβγ-Hck activation and clathrin/β-arrestin-1/GRK6 recruitment in PMNs. *Biochemical Journal*, 432 (1): 35-45.
- Killian**, J. A., & de Kruijff, B. **2004**. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1666(1): 275-288.
- Kittaka**, H. y Tominaga, M. **2017**. The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory neurons system and skin. *Allergology International*, 66 (1): 22-30.
- Kung**, C. **2005**. A posible unifying principle for mechanosensation. *Nature reviews*, 436 (4): 647-654.
- Lesage**, F., Terrenoire, C., Romey, G. y Lazdunski, M. **2000**. Human TREK2, a 2P domain mechanosensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (37): 28398-28405.
- Liedtke**, W. **2005**. TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflügers Archiv*, 451 (1): 176-180.

- Liedtke, W.** y Friedman, J.M. **2003**. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (23): 13698-13703.
- Liedtke W.**, Choe Y., Marti-Renom M.A., Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. **2000**. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103 (3): 525-535.
- Maingret, F.**, Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M. y Honore, E. **2000**. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K⁺ channels TREK-1 and TRAAK. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (14): 10128-10133.
- Marra, S.**, Ferru-Clément, R., Breuil, V., Delaunay, A., Christin, M., et al. **2016**. Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *The EMBO Journal*, 35: 414–428.
- Meyer zu Heringdorf, D.** y Jakobs, K.H. **2007**. Lysophospholipid receptors: signaling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768 (4): 923-940.
- Jin, M.**, Wu, Z., Chen, L., Jaimes, J., Collins, D., Walters, E. T. y O'Neil, R. G. **2011**. Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS One*, 6 (2): e16713.
- Moiseenkova-Bell, V. Y.**, Stanciu, L. A., Serysheva, I. I., Tobe, B. J., & Wensel, T. G. **2008**. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (21): 7451-7455.
- Monet, M.**, Gkika, D., Lehen'kyi, V.Y., Pourtier, A., Abeele, F.V., et al. **2009**. Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*, 1793 (3): 528-539.
- Montell, C.** **2005**. The TRP superfamily of cation channels. *Science Signaling*, 2005 (272): re3-re3.
- Montell, C.** y Rubin, G. M. **1989**. Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2 (4): 1313-1323.

- Moore, C.,** Cevikbas, F., Pasolli, H. A., Chen, Y., Kong, W., Kempkes, C., Parekh, P., Hee Lee, S., Kontchou, N.A., Yeh, I., Jokerst, N.M., Fuchs, E., Steinhoff, M. y Liedtke, W. **2013.** UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (34): E3225-E3234.
- Morales-Lázaro, S.L.,** Serrano-Flores, B., Llorente, I., Hernández-García, E., González-Ramírez, R., Banerjee, S., Miller, D., Gududuru, V., Fells, J., Norman, D., Tigyi, N., Escalante-Alcalde, D. y Rosenbaum, T. **2014.** Structural determinants of the Transient Receptor Potential 1 (TRPV1) channel activation by phospholipid analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (35): 24079-24090.
- Nakamura, H.,** Nemenoff, R.A., Gronich, J.H. y Bonventre, J.V. **1991.** Subcellular characteristics of Phospholipase A2 activity in the rat kidney. *The American Society for Clinical Investigation*, 87 (5): 1810-1818.
- Narita, K.,** Sasamoto, S., Koizumi, S., Okazaki, S., Nakamura, H., Inoue, T., & Takeda, S. **2015** TRPV4 regulates the integrity of the blood-cerebrospinal fluid barrier and modulates transepithelial protein transport. *The FASEB Journal*, 29 (6): 2247-2259.
- Neher, E. y** Sakmann, B. **1992.** The patch clamp technique. *Scientific American*, 266 (3): 44-51.
- Nguyen, T.T.,** Niyonsaba, F., Ushio, H., Akiyama, T., Kiatsurayanon, C., Smithrithee, R., Ikeda, S., Okumura, K. y Ogawa, H. **2012.** Interleukin-36 cytokines enhance the production of host defense peptides psoriasin and LL-37 by human keratinocytes through activation of MAPK and NF- κ B. *Journal of Dermatological Science*, 68 (1): 63-66.
- Nieto-Posadas, A.,** Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L.D. y Rosenbaum, T. **2012.** Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature chemical biology*, 8 (1): 78-85.
- Nilius, B. y** Owsianik, G. **2011.** The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology*, 12 (3): 218-228.
- Nilius, B.,** Vennekens, R., Prenen, J., J. Hoenderop, J.G., Droogmans, G. y Bindels, R.J. **2001.** The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block

of the epithelial Ca²⁺ channel. *The journal of biological chemistry*, 276 (2): 1020-1025.

Nilius, B. y Voets, T., 2005. TRP channels: a TR (I) P through a world of multifunctional cation channels. *Pflügers Archiv*, 451 (1): 1-10.

Nilius, B., Watanabe, H. y Vriens, J. 2003. The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflügers Archiv*, 446 (3): 298-303.

Nilius, B., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G.y Voets, T. 2004. TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286 (2): C195-C205.

Nilius, B. y Voets, T. 2013. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO Reports*, 14 (2): 152-163.

Ojala, P.J., Hirvonen, T.E., Hermansson, M., Somerharju, P., Parkkinen, J. 2007. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 82 (6): 1501-1509.

Pan, Z., Yang, H. y Reinach, P.S. 2010. Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. *Human genomics*, 5 (2): 108-116.

Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. y Martinac, B. 2002. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nature Structural Biology*, 9 (9): 696-703.

Prokazova, N.V.; Zvezdina, N.D.; Korotaeva, A.A. 1998. Effect of lysophosphatidylcholine on transmembrane signal transduction. *Biochemistry-New York-English Translation of Biokhimiya*, 63 (1): 31-37.

Rajasekhar, P., Poole, D. P., Liedtke, W., Bunnett, N. W. y Veldhuis, N. A. 2015. P2Y1 receptor activation of the TRPV4 ion channel enhances purinergic signaling in satellite glial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (48): 29051-29062.

Ramsey, S., Delling, M. y Clapham, D.E. 2006. An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology*, 68: 619-647.

Rosenbaum, T. y Gordon, S. E. 2002. Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron*, 33 (5): 703-713.

- Smith, P. L., Maloney, K. N., Pothen, R. G., Clardy, J., and Clapham, D. E. 2006.** Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* activates TRPV4 channels. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (40): 29897-29904.
- Soga, T., Ohishi, T., Matsui, T., Saito, T., Matsumoto, M., et al. 2005.** Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326 (4): 744-751.
- Strotmann, R., Schultz, G., y Plant, T.D. 2003.** Ca²⁺-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (29): 26541–26549.
- Subbaiah, P.V. y Liu, M. 1996.** Comparative studies on the substrate specificity of lecithin: cholesterol acyltransferase towards the molecular species of phosphatidylcholine in the plasma of 14 vertebrates. *Journal of Lipid research*, 37 (1): 113-122.
- Sun, S. y Dong, X. 2016.** TRP channels and itch. En: *Seminars in immunopathology* , 38 (3): 293-307. Springer Berlin Heidelberg.
- Takahashi, N., Hamada-Nakahara, S., Itoh, Y., Takemura, K., Shimada, A., Ueda, Y., et al. 2014.** TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P₂. *Nature communications*, 5: 4994.
- Talavera, K., Voets, T. y Nilius, B. 2008.** Mechanisms of thermosensation in TRP channels. Capítulo 6. En: Martinac, B. (Ed.). *Sensing with ion channels*. Springer: Berlín: 101-117.
- Thorneloe, K.S., Sulpizio, A.C., Lin, Z., Figueroa, D.J., Clouse, A.K., McCafferty, G.P., Chendrimada, T.P., et al. 2008.** N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[[(2,4-Dichlorophenyl) sulfonyl] amino]-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. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326 (2): 432-442.
- Tóth, B. I., Szallasi, A. y Bíró, T. 2015.** Transient receptor potential channels and itch: how deep should we scratch? In: *Pharmacology of Itch*. Springer, Berlin: 89-133.

- Venkatachalam, K. y Montell, C. 2007.** TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 387-417.
- Venter, J.C. et al. 2001** The Sequence of the human genome. *Science*, 291 (5507): 1304-1351.
- Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Bödding, M., Droogmans, G. y Nilius, B. 2002.** Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (37): 33704-33710.
- Voets, T. y Nilius, B. 2007.** Modulation of TRPs by PIPs. *The Journal of Physiology*, 582 (3): 939-944.
- Watanabe, H., Davis, J.B., Smart, D., Jerman, J.C., Smith, G.D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., et al. 2002.** Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (16): 13569–13577.
- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. 2003.** Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*, 424 (6947): 434–438.
- Weiss, J. N. 1997.** The Hill equation revisited: uses and misuses. *The Federation of American Societies for Experimental Biology journal*, 11 (11): 835-841.
- Wells, I.C., Peitzmeier, G. y Vincent, J.K. 1986.** Lecithin: cholesterol acyltransferase and lysolecithin in coronary atherosclerosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 45 (3): 303-310.
- White, J.P., Cibelli, M., Urban, L., Nilius, B., McGeown, G. y Nagy, I. 2016.** TRPV4: Molecular conductor of a diverse orchestra. *Physiological reviews*, 96 (3): 911-073.
- Wiesner, P., Leidl, K., Boettcher, A., Schmitz, G. y Liebisch, G. 2009.** Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 50 (3): 574-585.
- Wu, L.J., Sweet, T.B. y 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.

- Xu, X., Gordon, E. A., Lin, Z., Lozinskaya, I. M., Chen, Y., & Thorneloe, K. S. 2009.** Functional TRPV4 channels and an absence of capsaicin-evoked currents in freshly-isolated, guinea-pig urothelial cells. *Channels*, 3(3): 156-160.
- Xu, J., Chen, Y. y Li, M. 2004.** High-throughput technologies for studying potassium channels --progresses and challenges. *Drug Discovery today: TARGETS*, 3 (1): 32-38.
- Yoder, M., Zhuge, Y., Yuan, Y., Holian, O., Kuo, S., van Breemen, R., Thomas, L.L. y Lum, H. 2014.** Bioactive lysophosphatidylcholine 16: 0 and 18: 0 are elevated in lungs of asthmatic subjects. *Allergy, asthma and immunology research*, 6(1): 61-65.
- Zaika, O., Mamenko, M., Berrout, J., Boukelmoune, N., O'Neil, R.G. y Pochynyuk, O. 2013.** TRPV4 dysfunction promotes renal cystogenesis in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24: 1-12.
- Zembowicz, A., Jones, S.L. y Wu, K.K. 1995.** Induction of cyclooxygenase-2 in human umbilical vein endothelial cells by lysophosphatidylcholine. *The Journal of Clinical Investigation*, 96 (3): 1688-1692.