



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Permeación y dependencia del voltaje en el canal iónico**

**TRPV1**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Miriam García Ávila

TUTOR PRINCIPAL

Dr. León David Islas Suárez  
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Luis Vaca Domínguez  
[Instituto de Fisiología Celular](#)  
Dr. Froylan Miguel Gómez Lagunas  
[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México, Junio, 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.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer en principio al Dr. León D. Islas Suarez, por su tutoría y paciencia en la realización de este proyecto y en mi desarrollo en la ciencia.

A mi comité tutorial: el Dr. Luis Vaca Domínguez y el Dr. Gómez Lagunas Froylan Miguel, por todos sus comentarios, correcciones y aportes a este trabajo.

A la Dra. Gisela Edith Rangel Yescas, técnico del laboratorio, por su gran apoyo académico en el área de biología molecular y por ser increíblemente buena para transmitir sus conocimientos, de una forma amena. Gracias por tu amistad.

A Javier Tello Marmolejo por el desarrollo del programa de simulación de registros unitarios, que fue de gran importancia para la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, por sus comentarios y apoyo hacia el proyecto, pero también por crear un ambiente confortable y feliz para hacer ciencia.

Agradezco a mis padres Guillermina Ávila y Fausto García por confiar en mí y alentarme a seguir mis sueños, porque todo lo que soy, siempre se los deberé a ustedes. ¡Los quiero tanto!

A Pablo, por sostener mi mano todos los días e impulsarme a conseguir nuevas metas. Gracias por confiar en mí, un poco más de lo que yo misma lo hago. Te amo.

A mis amigos, porque a pesar de no vernos como antes, están ahí cuando se les necesita. Gracias.

Este trabajo fue financiado por los apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (252644); de la Dirección General de Asuntos de Personal académico-PAPIIT (IN203318) y del programa de Investigación en Fronteras de la Ciencia (IFC-2015-1/77) otorgados al Dr. León David Islas Suárez.

Y agradezco también por la beca de maestría que recibí por parte de CONACYT (No. de Becario 609464) con una duración de agosto de 2016 a julio de 2018.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
CANALES IÓNICOS .....	9
CANALES SENSIBLES A VOLTAJE .....	10
CANALES TRP .....	14
EL CANAL TRPV1.....	16
Permeabilidad y selectividad.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	23
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVO ESPECIFICO .....	24
HIPOTESIS.....	24
MÉTODOS.....	25
EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE TRPV1.....	25
REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	26
REGISTRO DE CORRIENTES MACROSCÓPICAS .....	27
REGISTRO DE CORRIENTES DE CANAL UNITARIO.....	28
ANÁLISIS .....	28
RESULTADOS .....	31
La corriente macroscópica de TRPV1 se modifica al variar el ion que permea por el canal.....	31
La permeabilidad de $K^+$ es mayor a la de $Na^+$ .....	31
La permeabilidad de $NH_4^+$ es mayor a la de $Na^+$ .....	33
La permeabilidad de $Cs^+$ es mayor a la de $Na^+$ .....	34
La permeabilidad de $CH_3NH_3^+$ es menor que la de $Na^+$ .....	35
La permeabilidad de $Li^+$ es menor que la de $Na^+$ .....	36
La permeabilidad de $Rb^+$ es menor que la de $Na^+$ ; el rubidio parece actuar como un bloqueador permeante.....	37
La conductancia y dependencia de voltaje varia con el ion permeante .....	39
Las corrientes unitarias del canal TRPV1 son distintas al variar el tipo de ion permeante .....	41
Los iones $Rb$ y $NH_4^+$ cambian la probabilidad de apertura del canal .....	41
La conductancia unitaria con $Li^+$ es menor que con $Na^+$ .....	44
La corriente unitaria es mayor con $K^+$ con respecto a $Na^+$ .....	45
La corriente unitaria con $Cs^+$ es mayor que con $Na^+$ .....	46

La corriente unitaria con $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ y $\text{Li}^+$ es menor que con $\text{Na}^+$ .....	47
La probabilidad de apertura del canal TRPV1 con diferentes iones .....	48
La secuencia de permeabilidad relativa de TRPV1 coincide con la secuencia I de Eisenman .....	48
La corriente unitaria del canal TRPV1 explicada por un modelo con tres estados cerrados .....	51
Discusión .....	58
Conclusiones .....	64
Perspectivas .....	65
Bibliografía .....	66

## RESUMEN

Los canales iónicos, son proteínas de membrana que regulan el intercambio de iones entre el espacio intracelular y el extracelular; existe una gran variedad de canales iónicos, dependiendo del estímulo al que responden y los iones que transportan.

El canal TRPV1 es un canal catiónico que puede permear diferentes iones, este canal es mejor conocido por ser el receptor de capsaicina y también por ser activado por temperaturas mayores a 43° C. Su estructura es similar a la de los canales Kv, pero presentan una sensibilidad menor al voltaje, la cual no puede ser explicada con la presencia de un sensor de voltaje bien caracterizado como el de canales Kv. Sin embargo, se ha hipotetizado que existe un mecanismo diferente, en que el tipo de ion permeante y su interacción con el poro del canal puedan explicar la dependencia de voltaje, como sucede en otros canales, por ejemplo, los canales K2P.

En este trabajo se realizó una secuencia de permeabilidad relativa para el canal TRPV1, lo cual no se había hecho de manera detallada. Nuestros registros de corrientes macroscópicas, variando el tipo de ion permeante, muestran que el tipo de ion afecta la amplitud de la corriente del canal, a pesar de que el potencial de reversión es cero para todos los iones, además, la voltaje dependencia aumenta de manera significativa con litio, lo cual indica que este ion interactúa con el poro del canal de manera voltaje dependiente por lo que, podría arrojar información respecto a la relación entre el tipo de ion permeante y la voltaje dependencia del canal.

Con los registros de canal unitario, variando el tipo de ion permeante, se mostró la existencia de fluctuaciones durante el estado abierto del canal que pueden ser explicadas por transiciones rápidas entre el estado abierto y dos estados cerrados y que parecen ser dependientes de voltaje.

## INTRODUCCIÓN

Una de las formas de regular la comunicación de la célula con el exterior, es a través de la activación de los canales iónicos. Estos son proteínas que permiten el paso de iones a través de la membrana celular de una manera selectiva. La activación de dichos canales está directamente relacionada con una gran variedad de procesos fisiológicos, como los impulsos nerviosos, la contracción muscular, la regulación del potencial de membrana y la señalización celular en todos los organismos (Dorothy M Kim et al., 2015).

Hay una gran variedad de canales iónicos, los cuales responden a diferentes estímulos; existen los que son activados por ligando, por voltaje o por estímulos mecánicos. Algunos de estos canales son muy específicos, como los canales Kv que permiten principalmente el flujo de iones de potasio, que son activados por variaciones en el voltaje, mientras que existen otros, como el canal TRPV1, que es permeable a diferentes iones, y puede ser activado con diferentes estímulos tales como la temperatura, el bajo pH extracelular, agonistas como la capsaicina y además es sensible a voltaje.

El canal iónico TRPV1 es un canal catiónico, que exhibe una preferencia a cationes divalentes, principalmente es permeable a calcio. Este canal está involucrado con la sensibilidad de los organismos a los cambios de temperatura y la exposición a sustancias pungentes. Estructuralmente es similar a los canales Kv, ya que cada canal está formado por cuatro sub-unidades y cada una de estas a su vez, están formadas por seis segmentos transmembranales (S1 a S6), donde el dominio del poro corresponde a los segmentos transmembranales S5-S6, y tienen los dominios amino y carboxilo terminales en la parte intracelular (Jara-Oseguera et al., 2010).

Los canales Kv cuentan con un dominio sensible al voltaje, bien caracterizado en el segmento S1-S4, particularmente el S4 presenta un residuo cargado (arginina o lisina) por cada tres aminoácidos en esta secuencia y se sabe que las cargas son capaces de sentir e interactuar con el campo eléctrico que las rodea, lo que produce cambios conformacionales que incrementan la probabilidad de apertura del canal (Islas, 2016). Sin embargo, a pesar de que el canal TRPV1 es también

activado con voltaje, éste no cuenta con un dominio sensible a voltaje canónico, como el descrito en canales Kv y no se conoce el mecanismo por el cual el canal TRPV1 responde a los cambios de voltaje.

Por lo general, los canales sensibles a voltaje tienen un sensor de voltaje similar al descrito en canales Kv, sin embargo, se han propuesto otros mecanismos por los cuales un canal puede sensor el campo eléctrico a su alrededor y ser activados por voltaje, tal es el caso de los canales K2P, que al igual que TRPV1, carecen de un dominio sensor de voltaje, pero son activados por cambios en el potencial de membrana. En los canales K2P se ha propuesto que la dependencia de voltaje está dada por la interacción del ion permeante con el filtro de selectividad del canal (Schewe et al., 2016). Por lo que es posible que el canal TRPV1, tenga un mecanismo en el que la dependencia de voltaje sea modificada por el ion que permea por el canal.

Se trabajó con el canal TRPV1 expresado de manera heteróloga en células HEK293. También se investigó la permeabilidad del canal TRPV1 a diferentes iones y, si existe una relación entre esta y su capacidad para sensor los cambios de voltaje.

## CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que cuentan con un poro de selectividad para ciertos iones. Son elementos fundamentales para la membrana de células excitables.

Hodgkin y Huxley en 1952 propusieron por primera vez el concepto de poro o canal iónico para explicar las vías selectivas de flujo para el  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Fanjul and Hiriart, 1998), y ahora conocemos que los canales iónicos son estructuras complejas que presentan selectividad respecto a los iones que pueden transportar, por ejemplo, algunos tienen una mayor selectividad a  $\text{Na}^+$  e impiden el paso de otros iones, o pueden ser selectivos a  $\text{K}^+$ , mientras que otros permiten el paso de varios iones con la misma facilidad. Pero aun los canales menos selectivos discriminan entre aniones y cationes (Hill et al., 2006), por lo que son llamados canales aniónicos o catiónicos, respectivamente.

Existe una gran diversidad de canales especializados para diferentes funciones, además de la producción de impulsos nerviosos, tal es el caso de los que participan en el mantenimiento del potencial de reposo de la célula, otros que responden a mensajeros, ya sea en la cara externa o en la cara interna de la membrana. También, existe una gran variedad de canales respecto a sus mecanismos de activación; como los sensibles a voltaje, que se abren o cierran en respuesta a cambios de voltaje en la membrana; los canales activados por tensión que se abren y cierran en respuesta a alteraciones en la tensión física de la membrana; canales regulados por fosforilación que responden a cambios en la fosforilación de los aminoácidos del canal y los canales modulados por ligandos, que actúan como receptores de señales y como canales iónicos (Hill et al., 2006) o los activados por otros estímulos como pH o temperatura.

El flujo de iones a través de los canales no es continuo, sino que estos se abren y cierran generando pulsos de corriente escalonada. La apertura o cierre de los canales es probabilística; sin embargo, la probabilidad de apertura puede cambiar en respuesta a un estímulo como el voltaje o un ligando, dependiendo del tipo de canal. En los canales dependientes de voltaje, por ejemplo, la probabilidad de

apertura se incrementa o disminuye en los rectificadores entrantes, con la despolarización, mientras que los canales sensibles a ligando, la unión a ligando favorece o inhibe su apertura (Fanjul and Hiriart, 1998).

## **CANALES SENSIBLES A VOLTAJE**

Los canales dependientes de voltaje son críticos para la generación y propagación de señales eléctricas en células excitables (Miceli et al., 2015). Los canales dependientes de voltaje representan un gran grupo de proteínas de señalización, además, actúan como blancos fundamentales para drogas de aplicación terapéutica (Miceli et al., 2015).

La mayor parte de los canales activados por voltaje cuentan con un dominio sensor de voltaje y son cruciales para la señalización eléctrica en el sistema nervioso (Swartz, 2008). Por ejemplo, los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), son posiblemente los canales dependientes de voltaje más estudiados; ya que juegan un papel central en muchos procesos fisiológicos, como mecanismos biofísicos de la excitabilidad eléctrica, tales como la repolarización del potencial de acción, la adaptación de la frecuencia de disparo, la repolarización sináptica, la contracción muscular, entre otros. La variedad de funciones de los canales Kv, lleva a que dependiendo del sitio donde se encuentran y la función que llevan a cabo, se activen a diferentes rangos de voltaje. (Islas, 2016)

Los canales Kv están formados por un tetrámero y cada subunidad está compuesta por 6 segmentos transmembranales (Fig. 1), los primeros 4, se postula, son responsables de la sensibilidad a voltaje mientras que el S5 y S6 forman el dominio del poro y regulan la permeación (Yellen et al., 1991).

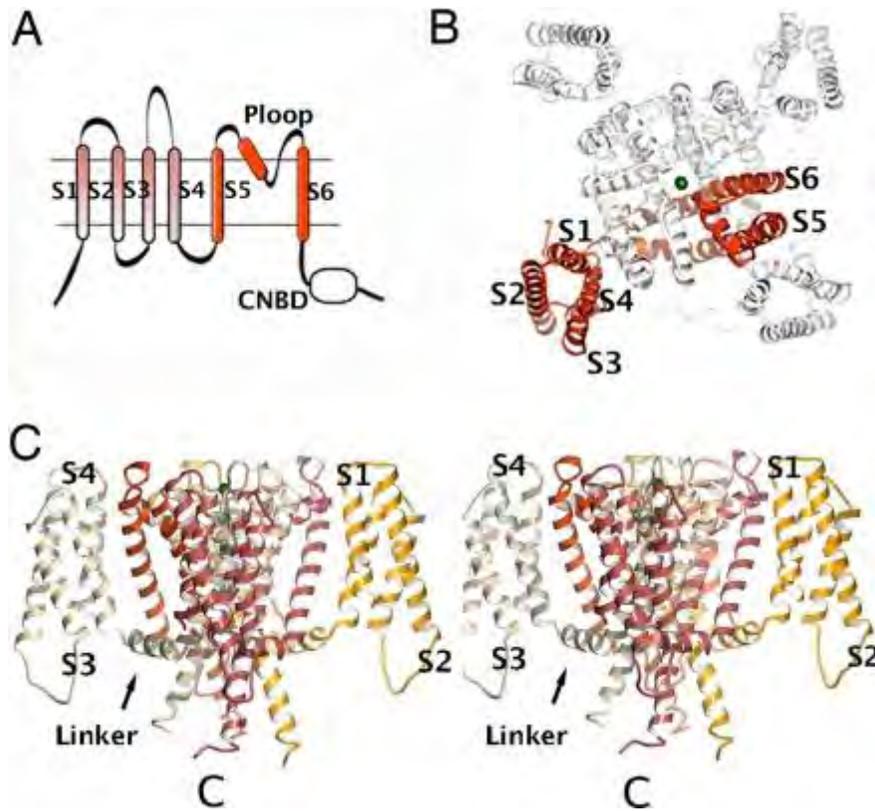


Figura 1. Estructura general de un canal de K<sup>+</sup> dependiente de voltaje (Kv). A) Esquema de una subunidad del canal, cuenta con 6 segmentos transmembranales y el poro se forma entre el segmento 5 y 6. B) Estructura vista desde la parte extracelular con un ion de K<sup>+</sup> en el interior (esfera verde). C) Cara frontal del canal, las subunidades están marcadas por diferentes colores la letra C representa al carboxilo terminal. Tomado de Clayton, et. al., 2008.

Estudios de mutagénesis dirigida de neutralización de cargas y sustitución por residuos de Cys han demostrado que el sensor de voltaje se encuentra en los primeros 4 segmentos, especialmente en el segmento 4 (Fig. 2), que presenta cada tres residuos un aminoácido cargado positivamente (arginina/lisina) y por las cargas negativas de los segmentos S2 y S3, que tienen una interacción electrostática con el segmento S4 (Liman and Hess, 1991). Sin embargo, no todos los canales sensibles a voltaje tienen un dominio sensible a voltaje como el de los canales Kv; uno de estos es el canal TRPV1, el cual también se activa por voltaje, pero como se muestra en la figura 2b, al comparar la secuencia del segmento transmembranal

4 con el de canales Kv, el canal TRPV1 no tiene aminoácidos cargados, por lo que se dice que carece de un sensor de voltaje canónico.

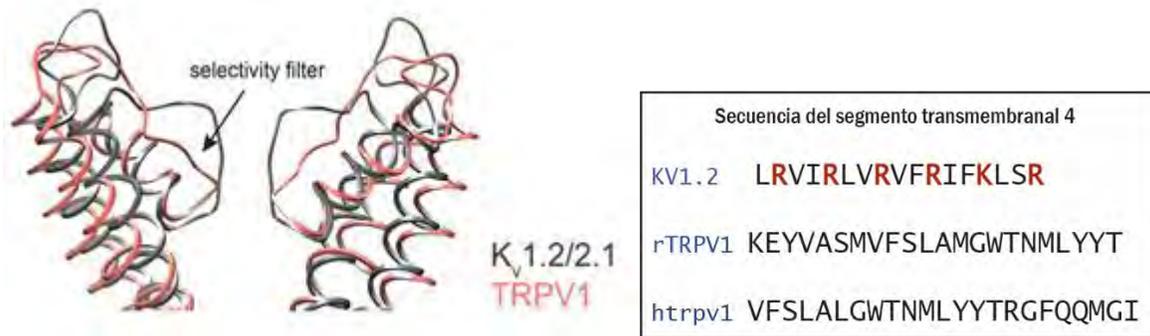


Figura 2. Estructura y secuencia del poro de canales Kv 1.2/2.1 y TRPV1. A) Superposición de los segmentos 5 y 6 de dos subunidades de los canales Kv 1.2/2.1 (gris) y TRPV1 en rojo. B) Secuencia del sensor de voltaje, del canal Kv 1.2 comparado con la misma secuencia en TRPV1, (aminoácidos con carga positiva en rojo).

Algunos canales, como la mayoría de los canales K2P, tienen una dependencia de voltaje, pero no cuentan con un dominio sensible a este, y se ha propuesto que la voltaje dependencia está localizada dentro del filtro de selectividad y el mecanismo por el cual estos canales perciben los cambios de voltaje, consiste en el movimiento de tres o cuatro iones dentro del campo eléctrico de un filtro de selectividad inactivo; lo que genera un mecanismo tipo válvula en la que el movimiento de iones dentro del filtro induce la apertura de una compuerta acoplada al poro del canal ( Figura 3; Schewe 2016).

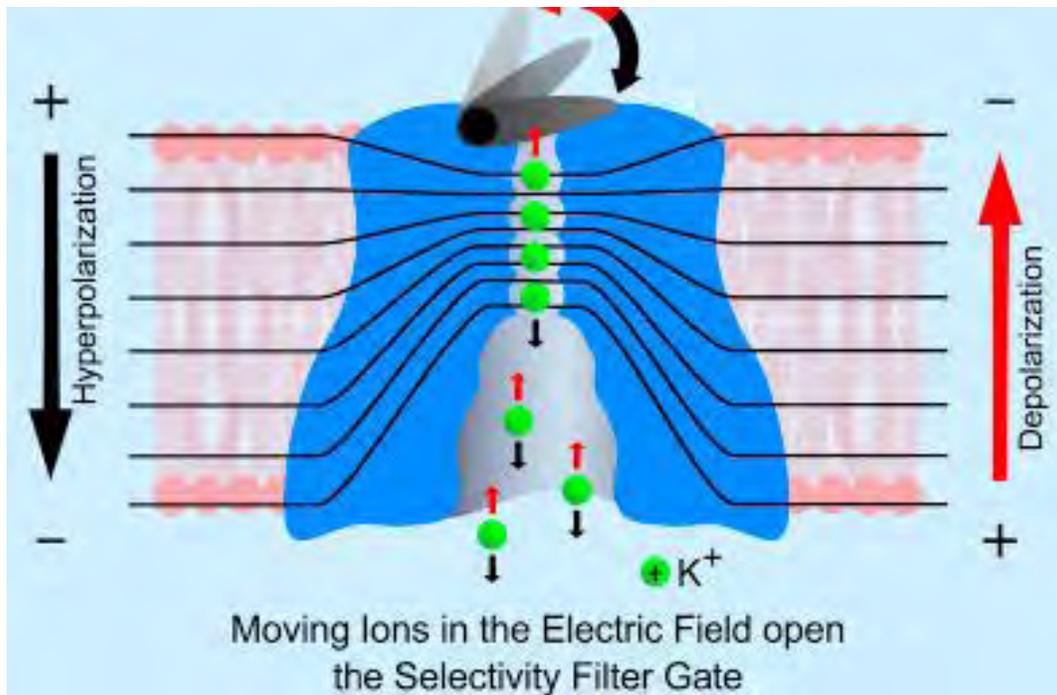


Figura 3. Esquema que muestra el mecanismo propuesto por el cual algunos canales K2P sienten el voltaje.

Otro ejemplo de un mecanismo distinto al dominio sensible a voltaje presente en los canales Kv, son los canales dependientes de la unión de ligandos intracelulares, como los dependientes de nucleótidos cíclicos (CNG), los cuales cuentan con una estructura muy similar a los canales Kv, tanto en el poro como en la presencia de aminoácidos cargados en el S4. Sin embargo, se ha mostrado que son dependientes de voltaje sólo en presencia de la permeación de cationes grandes como  $Rb^+$  y  $Cs^+$  y no de  $Li^+$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  (Marchesi et al., 2012).

Además, se ha reportado que iones como el  $Mg^{++}$  pueden actuar abriendo, cerrando o bloqueando canales iónicos. Por ejemplo, se sabe que interfiere con canales de potasio activados por calcio, por una unión al canal abierto, además se une a los sitios de unión a calcio. Se ha demostrado que estructuralmente también existe un sitio de unión a  $Mg^{++}$  en el dominio RCK/Rossmann, un motivo intracelular que inmediatamente es seguido de la activación de la hélice S6 y que es responsable de la activación del canal por magnesio (Guiet-Bara 2007).

El canal TRPV1, es activado por diversos factores, entre ellos, la variación de voltaje (Caterina et al., 1997a), pero no posee un dominio sensible a voltaje, por lo que es posible que siga un mecanismo similar a los descritos, en el cual la dependencia de voltaje se deba a una interacción del ion permeante con el poro del canal.

## **CANALES TRP**

Los canales TRP (potencial de receptor transitorio, por sus siglas en inglés), forman una familia de canales permeables a cationes. El primer miembro de esta familia fue identificado en *Drosophila*; en el gen cuyo producto es requerido para la transducción visual (Hardie and Minke, 1993). Estos canales son expresados en neuronas nociceptoras, por lo que son los elementos centrales de la nocicepción, y pueden ser blancos potenciales para aliviar síndromes clínicos de dolor neuropático (Basso et al., 2016). Las funciones de los canales TRP son diversas, y el conocimiento de la modulación de estos canales aún es limitada. Se conoce que los canales TRP están involucrados en procesos como la termosensación, la recepción de feromonas, la nocicepción, la detección de estímulos sensoriales, osmoregulación, homeostasis de calcio intracelular, proliferación celular y otros (Clapham et al., 2001).

Todos los canales TRP cuentan con una topología general de tetrámero en donde cada subunidad consiste de 6 segmentos transmembranales, y el poro está formado por el segmento 5, 6 y el asa que los une (Venkatachalam and Montell, 2007 Clapham et al., 2001).

Estudios tanto filogenéticos como estructurales indican que los canales TRP están relacionados con la familia de canales catiónicos activados por voltaje, como los canales permeables a  $K^+$  o  $Ca^+$  ( $K_v$  y  $Cav$  respectivamente) (Steinberg et al., 2014). Como ya se ha mencionado, los canales TRP, también son activados por voltaje, pero no tienen un sensor de voltaje, como el que caracteriza a los canales  $K_v$  (Fig. 2), que está bien caracterizado (Clapham et al., 2001).

Los canales TRP son permeables a cationes, solo dos canales TRP son impermeables a calcio (TRPM4 y TRPM5) (Pingle et al., 2007) y según la isoforma, la permeabilidad y la selectividad para cationes mono o divalentes varía. Se encuentran ampliamente distribuidos en diversos tejidos, especialmente en los de los sistemas nerviosos central y periférico, donde tienen un papel crucial en la transducción sensorial (Venkatachalam and Montell, 2007), además, su permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  lo involucra en la activación de señales de transducción celular (Ferrer 2009).

Desde la caracterización del canal TRP, 28 genes han sido identificados para esta familia, y sus productos se han clasificado en 6 subfamilias: vanilloide (TRPV), canonica (TRPC), melastatina (TRPM), anquirina (TRPA), policistina (TRPP) y mucolipina (TRPML) (Basso et al., 2016).

Las diferencias más marcadas dentro de la familia de canales TRP están en los carboxilos terminales, y la región más conservada es el dominio S6, el cual es presumiblemente el más importante para su gating (Clapham et al., 2001).

El compendio más estudiado de bloqueadores y activadores se ha realizado para TRPV1 y TRPM8, que forman parte de los llamados termo TRPs (TRPV1, 2, 3, 4; TRPM4, 5, 8; TRPA1), los cuales son activados por temperatura y convierten este estímulo en señales químicas y eléctricas (Flockerzi, 2007). La familia de canales TRPV en mamíferos, está formada por 6 miembros TRPV1-6, de las que destaca TRPV1 por ser un sensor molecular del umbral de temperaturas nocivas para el organismo.

## EL CANAL TRPV1

El canal TRP vaniloide tipo 1 (TRPV1), es el receptor de capsaicina, y fue clonado por primera vez en 1997 por el grupo de Julius (Caterina et al., 1997a). Se expresa principalmente en neuronas del sistema periférico como las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, de los ganglios trigeminal y torácico vagal, y en fibras sensoriales predominantemente en neuronas de tamaño pequeño y mediano. En neuronas peptidérgicas, están involucrados en el desarrollo de dolor neurogénico e inflamatorio mientras en neuronas nopeptidérgicas participan en mediar el dolor crónico. También se ha localizado en diferentes regiones del cerebro como el hipotálamo, cerebelo, corteza cerebral, bulbo olfatorio, medula, hipocampo, tálamo y sustancia nigra; en tejidos no neuronales se expresa en queratocitos de la epidermis, músculo liso, células gliales, hígado y macrófagos (Pingle et al., 2007).

En humanos, el gen de TRPV1 está localizado en el cromosoma 17 y codifica en una proteína de 839 aminoácidos (Nilius and Flockerzi, 2014), cuya estructura es homóloga a la de canales de potasio activados por voltaje (Yu and Catterall, 2004), ya que consiste de un homotetramero, donde cada dominio se conforma de 6 segmentos transmembranales (S1-S6); el poro se encuentra entre el segmento S5 y S6 y el asa que los une y el extremo amino y carboxilo terminal son intracelulares (Fig. 4; Julius et al., 2013). El extremo amino terminal cuenta con 6 repeticiones de anquirinas al igual que otros TRPs, responsables de la unión de múltiples ligandos y modulación de la sensibilidad del canal.

Es un canal con características de activación polimodales, ya que es activado por temperatura alta (43 °C), pH bajo, ligandos como capsaicina y también por voltaje, (Basso et al., 2016), a pesar de que carece de un sensor de voltaje bien caracterizado. Por lo que es un receptor polimodal que traduce estímulos físicos y químicos en estímulos nerviosos. (Ferrer, 2009).

El canal TRPV1 se ha relacionado con procesos fisiológicos como la detección de estímulos dolorosos y la generación de procesos de inflamación, lo que lo ha convertido en una diana para el diseño de fármacos que produzcan analgesia, y ha

llevado a la caracterización y síntesis de compuestos que actúan sobre él (Salazar et al., 2009a).

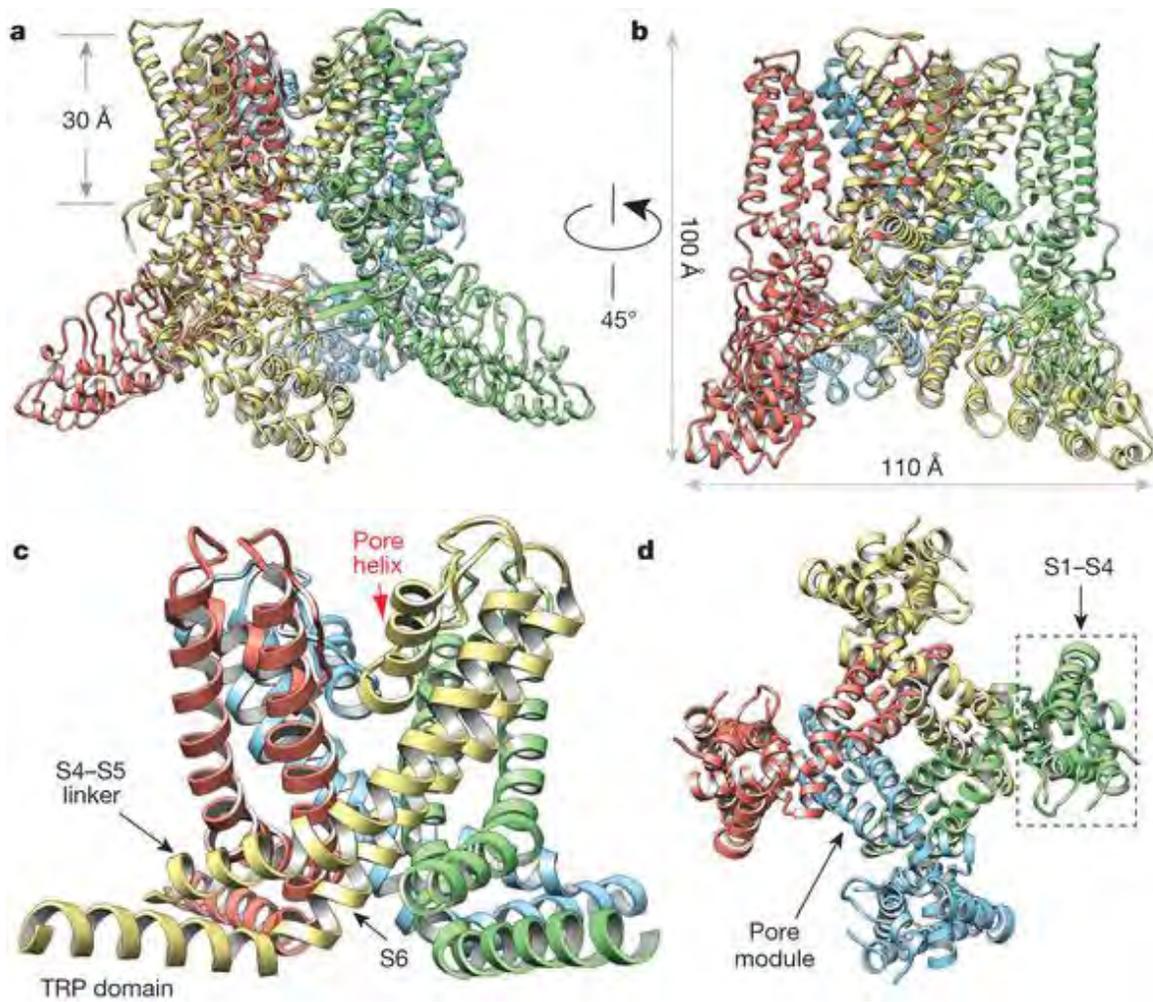


Figura 4. Estructura del canal TRPV1. A) Vista frontal del canal. B) Giro de 45° de la estructura. C) Segmentos 5y 6 de las 4 subunidades formando el poro junto al asa que los une. D) Vista extracelular del canal. Las 4 subunidades del canal están marcadas en diferentes colores.

## Permeabilidad y selectividad

Son pocos los estudios que han tratado el tema de la permeabilidad del canal TRPV1, de manera muy general se le clasifica como un canal catiónico no selectivo, con preferencia a permear cationes divalentes de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Según la estructura de criomicroscopía disponible, se conoce que la región exterior del poro de TRPV1 es ancha comparada con la de canales Kv, con una estructura en forma de cono, que facilita la permeabilidad a pequeños y grandes iones.

Se ha reportado, mediante registro de corrientes macroscópicas y con experimentos independientes entre sí, que también puede permear cationes monovalentes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y  $\text{Cs}^+$  prácticamente con la misma selectividad (Fig. 5b; Caterina et al., 1997b).

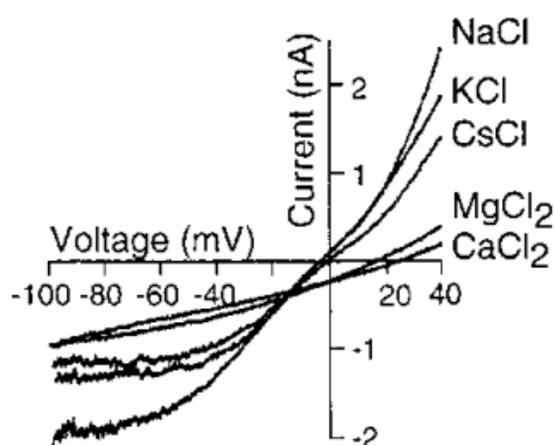


Figura 5. Los canales TRPV1 no muestran selectividad iones monovalentes. Gráfica I/V de registros de canales TRPV1. Las corrientes fueron registradas en parches con múltiples canales, se observa que el potencial de reversión es muy similar para iones monovalentes.

Otro estudio relevante en términos de permeabilidad es el de (Samways and Egan, 2011a), en el cual exploran la forma en que el calcio disminuye la conductancia unitaria del canal TRPV1, utilizando la técnica de patch-clamp en su configuración outside-out para la adquisición de corrientes unitarias. En dicho estudio midieron la permeabilidad relativa de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  y  $\text{Mg}^+$  (Fig. 6), a partir del potencial

de reversión, con cada uno de los iones en registros de corrientes unitarias y con diferentes iones en experimentos independientes a potenciales negativos.

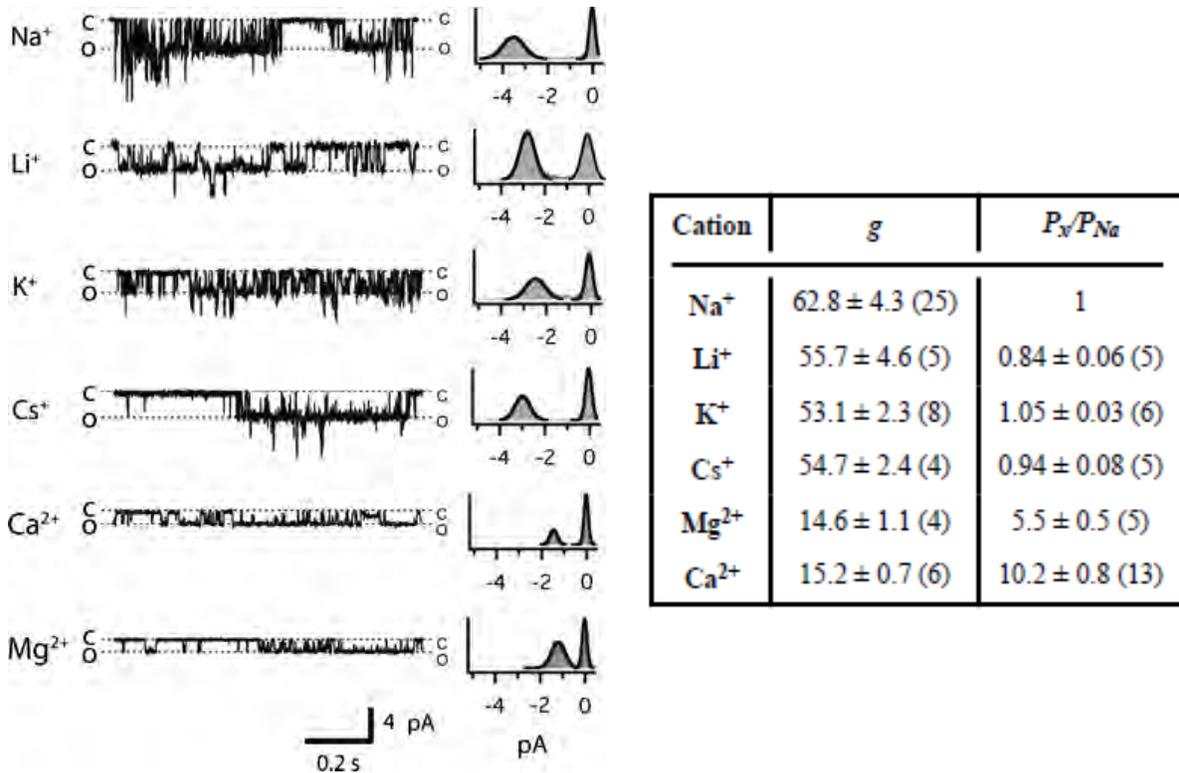


Figura 6 Permeabilidad del canal TRPV1. A) Registros representativos de corriente unitaria, con diferentes iones, seguido del histograma de amplitudes de cada registro. B) Tabla de conductancia y permeabilidad relativa del canal con diferentes iones.

También se ha reportado que la presencia de sodio extracelular parece estabilizar el estado cerrado del canal *trpv1* al unirse a un sitio en la parte extracelular del poro. El sodio actúa como un inhibidor del canal, sin embargo, este sitio de unión no es muy selectivo para sodio; el potasio exterior puede estabilizar el estado cerrado tan efectivamente como sodio, seguido por Rb<sup>+</sup>, Tris, Cs<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> (Jara-Oseguera et al. 2015). Además, se ha encontrado que algunos iones localizados en el espacio extracelular (Na<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup> y Ca<sup>++</sup>) pueden sensibilizar el TRPV1 a la capsaicina e incluso en concentraciones suficientemente altas pueden promover su activación en ausencia de capsaicina (Salazar et al., 2009a).

Como se ha mencionado, el canal TRPV1, permite el paso de diferentes iones a partir de las diferencias de permeabilidad encontradas entre los diferentes iones, pueden ser comparadas con las secuencias de permeabilidad teóricas de Eisenman. Esta teoría considera la interacción de un catión hidratado en solución con un sitio cargado fijo, calculando la energía electrostática de interacción entre el catión y el sitio de unión y relacionándola con la energía de deshidratación del catión. Considerando que ambos términos son inversamente proporcionales al radio atómico del catión, Eisenman propuso con estos parámetros 11 secuencias de permeabilidad (Fig. 7).

Por ejemplo, si el radio del sitio de unión es grande y la energía de interacción es pequeña, tendríamos un caso en el que la permeación de iones grandes como Cs<sup>+</sup> se ve favorecida mientras que iones pequeños como Li<sup>+</sup>, que tienen una energía de deshidratación más grande, permeen menos. Así mismo, si el radio del sitio de unión es pequeño y la energía de interacción es muy grande comparada con la energía de deshidratación, tendríamos que la permeación de iones pequeños se vea favorecida (Owsianik et al., 2006). Estas secuencias de permeabilidad teóricas se han utilizado para explorar la permeabilidad de distintos canales.

### Secuencias de permeabilidad de Eisenman

Li > Na > K > Rb > Cs	Sequence	XI (at highest field strength)
Na > Li > K > Rb > Cs	Sequence	X
Na > K > Li > Rb > Cs	Sequence	IX
Na > K > Rb > Li > Cs	Sequence	VIII
Na > K > Rb > Cs > Li	Sequence	VII
K > Na > Rb > Cs > Li	Sequence	VI
K > Rb > Na > Cs > Li	Sequence	V
K > Rb > Cs > Na > Li	Sequence	IV
Rb > K > Cs > Na > Li	Sequence	III
Rb > Cs > K > Na > Li	Sequence	II
Cs > Rb > K > Na > Li	Sequence	I (at lowest field strength)

Figura 7. Secuencias de permeabilidad teóricas propuestas por Eisenman.

La selectividad de cada canal está dada por lo que se conoce como filtro de selectividad, y se refiere a la parte más estrecha de un canal que se encuentra dentro del poro del canal. Se ha calculado el tamaño del poro de un canal con estudios de permeabilidad relativa o de dinámica molecular, por ejemplo, se ha mostrado que el canal TRPV1 puede tener un tamaño de poro inicial de 10.1 Å e incrementar su tamaño hasta 12.3 Å (Chung et. A. 2008, Cao et al., 2013) esto por la activación o la unión de algún ligando. En la figura 8, se muestra un mapa de densidad del poro del canal TRPV1 predicho a partir de la estructura obtenida por crio-microscopia (Julius et al., 2013), donde se modelan las distancias entre los átomos en la presencia de un agonista (capsaicina) y en su ausencia (APO) cabe resaltar que la parte más estrecha del poro de selectividad no cambia con el agonista, sin embargo, se debe mencionar que dicha estructura, al ser obtenida por crio-microscopia, no arroja evidencia funcional de que dicho modelo sea una representación fiel de los estados: abierto y cerrado Además, se debe considerar que el canal TRPV1 también es activado por temperatura y no hay evidencia experimental de que pueda activarse por agonistas a temperaturas bajas. Por lo tanto, las estructuras presentadas deben tomarse solo como un punto de partida.

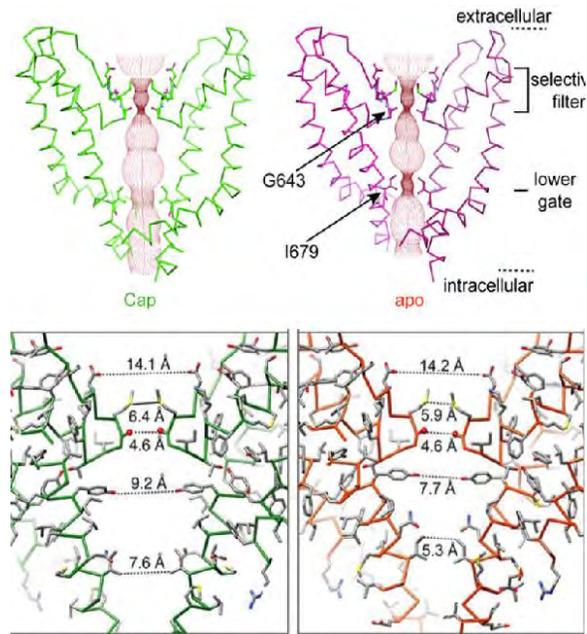


Figura 8. Mapa de densidad de la región del poro, de dos subunidades opuestas. Superior: accesibilidad del poro con la unión de capsaicina (CAP) y sin agonistas (APO). Inferior: distancias entre específicos átomos a través del poro.

Retomando la estructura disponible de TRPV1, se puede observar dos constricciones dentro del poro del canal, la primera en la parte inferior, que al parecer corresponde a la compuerta activada por agonistas como la capsaicina, y la segunda dentro del filtro de selectividad. Mediante estudios de accesibilidad de cisteínas han revelado que el segmento transmembranal 6 contribuye a la formación de una compuerta de activación (Salazar et al., 2009b), la cual correspondería a la primer constricción mencionada. Sin embargo, no existe evidencia funcional de la existencia de una segunda compuerta, pero, se hipotetiza que, debido a presencia de esa constricción en el filtro de selectividad, esta puede comportarse como otra compuerta.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los canales dependientes de voltaje tienen un papel fundamental en la traducción de señales celulares en un organismo, como la propagación de señales eléctricas, en células excitables.

La forma más común en la que un canal puede sensor el voltaje, es a través de un dominio sensor de voltaje, como el presente en canales Kv (que se describió anteriormente).

Sin embargo, existen canales que tienen sensibilidad a voltaje, pero no cuentan con un dominio en su estructura especializado, para percibir los cambios en el potencial de membrana. Tal es el caso de los canales K2P, los cuales tienen un mecanismo en el cual la dependencia de voltaje está relacionada directamente al tipo de ion que atraviesa por el canal; el flujo de ciertos iones produce la apertura del canal (Schewe 2016).

El canal TRPV1 es estructuralmente similar a los canales Kv y también es activado por voltaje, sin embargo, no comparte la presencia de un dominio sensible a voltaje y no se conoce el mecanismo por el cual sensa el voltaje. Este canal es permeable a diferentes iones como:  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, la permeabilidad a estos y otros iones no ha sido estudiada a detalle y es posible que al igual que los canales K2P tenga un mecanismo en que el sensor de voltaje involucra el movimiento del ion dentro del campo eléctrico del filtro selector.

## **OBJETIVO GENERAL**

Contribuir a entender cómo el canal TRPV1 sensa los cambios de voltaje en la membrana celular.

## **OBJETIVO ESPECIFICO**

Investigar si la dependencia a voltaje del canal esté relacionada con el ion que permea a través de él.

## **HIPOTESIS**

Si la dependencia de voltaje del canal TRPV1 depende del ion que permea a través de él, entonces al variar el tipo de ion que permea y su concentración, la dependencia en el voltaje se alterará.

## MÉTODOS

### EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE TRPV1

La expresión heteróloga fue realizada en células HEK293, una línea celular proveniente de riñón embrionario humano, cultivadas en cajas Petri con 10 ml medio DMEM (Gibco), suplementado con 10% de suero bovino fetal (invitrogen) y 100 U de penicilina-100 µg estreptomycinina y 100 µg de ciprofloxacina. Las células fueron mantenidas en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se realizaron pases celulares cada 3 o 4 días; los cuales consisten en despegar las células incubándolas por 5 min con tripsina (Gibco), seguido de disgregación mecánica con una micropipeta para proseguir a sembrarlas en cajas de cultivo de 35 mm (Corning) previamente preparadas con pequeños vidrios en el fondo y 2 ml de medio de cultivo DMEM. El DNA del canal rTRPV1 utilizado para la transfección, esta expresado en el vector pcDNA y eGFP en el vector PeGFP (Clontech).

Para cumplir el objetivo planteado, se realizaron registros electrofisiológicos de corrientes macroscópicas y de canal unitario de TRPV1, expresado de manera heteróloga en células HEK293, para lo que se realizó una cotransfección con JetPei, como agente de transfección, y DNA de rTRPV1 WT y de eGFP, este último utilizado como marcador indirecto de expresión. Tanto el DNA como el JetPei fueron diluidos por separado en 100 µl de NaCl 150 mM, la mezcla posterior se incubó 30 minutos en cada ocasión, después de lo cual fue adicionada a la caja de cultivo con vidrios en el fondo, cuyas células tenían al menos un día de haber sido sembradas. Las células fueron registradas después de al menos 24 horas de ser transfectadas.

## REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Para investigar el mecanismo por el cual el canal TRPV1 sensa el voltaje, se realizarán registros electrofisiológicos, utilizando la técnica de patch-clamp, en su configuración inside-out en células HEK 293 que expresan de manera heteróloga el canal.

La técnica de patch-clamp en su configuración inside-out permite hacer mediciones de la conductancia iónica a partir de un fragmento aislado de la membrana celular. Para conseguirlo, la micropipeta de vidrio se acerca hasta tocar la membrana celular seguido de la aplicación de succión, de tal manera que se forma un sello de alta resistencia, que puede llegar al orden de 1 o varios GΩ entre la membrana y en la punta de la pipeta; una vez formado el gigasello, se jala la pipeta para lograr despegar el segmento de membrana que se ha unido a ella, de esta manera la cara intracelular de la membrana queda expuesta al baño y nos permite manipular libremente las soluciones en ambos lados de la membrana.

La solución de registro utilizada en la pipeta (cara extracelular de la membrana), en todos los casos contenía 130 mM de NaCl, 5 mM EDTA y 10 mM de HEPES a pH 7.2. Para las soluciones utilizadas en la cara intracelular de la membrana, solamente se reemplazó el NaCl por KCl, RbCl, CsCl, LiCl, NH<sub>4</sub>Cl o CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>Cl y se adiciono 10 μM (para corrientes macroscópicas) o 100 nM (para corrientes unitarias) de capsaicina.

## REGISTRO DE CORRIENTES MACROSCÓPICAS

Para los registros de corrientes macroscópicas, las condiciones de transfección fueron las siguientes: 400ng/ml de TRPV1-WT y GFP. Los experimentos fueron realizados utilizando pipetas de borosilicato con una resistencia de 6 a 8 MΩ obtenidas con un puller (Sutter instrument modelo P-97) y pulidas con una microforja MF-830 (Narishige). Los datos fueron adquiridos utilizando el programa PatchMaster (HEKA instruments). El protocolo utilizado para los registros de corrientes macroscópicas consistió en mantener el potencial de membrana a 0 mV seguido de una serie de pulsos cuadrados de voltajes desde -130 a 130 mV con una duración de 150 ms, y un intervalo de 20 mV entre cada uno. Estos registros se adquirieron a 50 kHz y se filtraron a 1 kHz.

Para los registros donde se compara la permeabilidad de Na<sup>+</sup> con respecto a otro ion, se llevó a cabo la siguiente secuencia durante el experimento: se registró de la corriente del canal TRPV1 con 130 mM de NaCl en el baño (cara intracelular de parche), después se cambió la solución por una que contenía 130 mM de NaCl y 10 μM de capsaicina en el interior, seguido de un cambio en la solución intracelular por 130 mM de KCl, RbCl, CsCl, LiCl, NH<sub>4</sub>Cl o CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>Cl manteniendo 10 μM de capsaicina, como se muestra en el esquema de la figura 9. Las soluciones se perfundieron por gravedad utilizando un intercambiador de soluciones.



Figura 9. Esquema patchclamp inside-out, representando el cambio del ion permeante durante el experimento.

## REGISTRO DE CORRIENTES DE CANAL UNITARIO

Para realizar los registros de canal unitario la transfección se llevó a cabo como se describió anteriormente, pero se transfectó 50 ng de TRPV1-WT y 100 ng de eGFP para disminuir la expresión del canal en las células y aumentar la probabilidad de registro de un solo canal. Las células fueron registradas alrededor de 22 horas después de la transfección.

Los experimentos fueron realizados utilizando pipetas de borosilicato con una resistencia de 8 a 12 MΩ. El protocolo de estimulación consistió en aplicar una serie de pulsos de voltaje desde -110 a +150 mV con el potencial de mantenimiento en 0 mV. con 1 a 2s de duración y un intervalo de 20 mV entre cada pulso. Las corrientes unitarias se adquirieron a 61.3 KHz y se filtraron a 2 y 5 kHz.

Los registros de corrientes macroscópicas tuvieron como objetivo explorar la selectividad del canal con diferentes iones, mientras que la relación del ion permeante se estudió con el análisis de los registros de corrientes unitarias.

## ANÁLISIS

De las corrientes macroscópicas se obtuvo una gráfica IV con el promedio de la amplitud de la corriente de n parches, cuyos datos fueron normalizados tomando como corriente máxima a la obtenida en los registros con 130 mM de NaCl y 10 μM de capsaicina en la cara intracelular del parche.

La conductancia fue calculada como:

$$\text{Ec. 1) } g = \frac{i}{V_m - E_r}$$

g = conductancia

i = corriente

V<sub>m</sub> = potencial de membrana

E<sub>r</sub> = potencial de reversión

A cada curva de conductancia se le ajusto una función Boltzmann (Ec 2) y se obtuvo el promedio de las conductancias normalizadas a la curva con 130 mM de NaCl y 10  $\mu$ M de capsaicina. En cada caso se muestra también, la curva de conductancia normalizada contra sí misma.

$$\text{Ec 2)} \quad G(V) = g_{max} / (1 + e^{(-Z(V-V_{1/2})/KT)})$$

$g_{max}$  = conductancia máxima.

Z= Valencia en cargas elementales.

V = voltaje

$V_{1/2}$  = voltaje al que se alcanza la mitad de la conductancia en mV.

K = constante de Boltzmann.

T = temperatura.

Se realizó una prueba t- student de dos colas para muestras emparejadas, para comparar las  $v_{1/2}$  calculadas en las curvas de conductancias, aceptando la hipótesis nula cuando  $P > 0.01$ .

La probabilidad de apertura del canal TRPV1 se calculó como:

$$\text{Ec. 3)} \quad P_o = \frac{\sum t_o}{\sum t_o + \sum t_c}$$

$\sum t_o$  es la sumatoria del tiempo de vida en el estado abierto.

$\sum t_c$  es la sumatoria del tiempo de vida en el estado cerrado.

Para el análisis del registro de canal unitario se construyeron histogramas de las amplitudes de la corriente unitaria; se realizó un histograma por cada voltaje al que se estimuló; se ajustó una curva Gaussiana (Ec. 4) con la finalidad de medir la media de la amplitud del estado abierto del canal en cada histograma.

$$\text{Ec. 4)} \quad y + Ae^{(-\left(\frac{x-x_o}{2z}\right)^2)}$$

A partir de los datos de la media de la amplitud de la corriente unitaria, obtenidos del ajuste de la curva gauss, se graficó una curva de la corriente unitaria con relación al voltaje.

Para el análisis entre la relación de la compuerta del canal y el ion permeante, se diseñó en el laboratorio un programa en lenguaje Python, el cual realiza una simulación de un registro de corriente unitaria que parte de un modelo en el que el canal puede estar cerrado y abrirse, permanecer un tiempo en este estado abierto, regresar al primer estado cerrado o pasar a otros dos estados cerrados, con diferente probabilidad. A la simulación resultante, se le agrega ruido simulado y es filtrada, como sucede en la adquisición de datos experimentales; después, el programa realiza un histograma teórico a partir de los datos simulados y ajusta este histograma al histograma experimental, dando como resultado los valores de probabilidad por unidad de tiempo, de que ocurra una transición entre un estado y otro (ver resultados).

## RESULTADOS

Para investigar si la dependencia de voltaje del canal TRPV1 está influenciada por el ion que permea a través de él, se inició realizando registros de corrientes macroscópicas utilizando la técnica de patch-clamp con la configuración inside-out, lo cual nos permitió explorar la permeabilidad y selectividad del canal TRPV1 a diferentes iones.

### **La corriente macroscópica de TRPV1 se modifica al variar el ion que permea por el canal**

Como ya se mencionó, para el registro de corrientes macroscópicas se transfectó con 400 ng/ml de rTRPV1-WT y GFP, para obtener una población de canales en la membrana que forma el sello con la pipeta. Los registros de patch-clamp inside-out se realizaron manteniendo siempre 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion la cara intracelular del parche, utilizando pipetas de 6 M $\Omega$ .

### **La permeabilidad de K<sup>+</sup> es mayor a la de Na<sup>+</sup>**

Para los registros comparando la permeabilidad de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, se llevó a cabo la secuencia descrita previamente (ver métodos). En la figura 10a, se observan las familias de corrientes registradas durante un experimento. Los trazos negros muestran la corriente evocada solo con los pulsos de voltaje y sodio como el único ion permeante, mientras que en los trazos rojos se puede apreciar el aumento en la corriente por la presencia de capsaicina en la cara intracelular del parche, manteniendo al sodio como el único ion permeante. Al comparar estas corrientes con los trazos azules, en los cuales el sodio intracelular fue remplazado por potasio, se observa un incremento en la amplitud de la corriente alcanzada. Como se muestra en la figura 10b, la corriente entrante (debida prácticamente a la permeabilidad de sodio), es muy similar en ambas condiciones, mientras que la corriente saliente es diferente, siendo que la corriente de potasio tiene una mayor amplitud que la de sodio. Esto podría indicar que la permeabilidad de K<sup>+</sup> es mayor que la de Na<sup>+</sup> en este canal. Además, el potencial de reversión tomado a partir de

la gráfica I/V es 0 mV en ambas condiciones, lo que nos indica que el canal no tiene una selectividad marcada por alguno de los iones.

La grafica de conductancia mostrada en la figura 10c muestra que La  $V_{1/2}$  no se altera de manera significativa ( $P = 0.18$ ) y que la conductancia es mayor para potasio que para sodio (28% más grande), lo cual podría indicar que los iones de potasio interactúan con el poro del canal, quizás permitiendo que tenga una mayor probabilidad de apertura, o que la cantidad de iones que permeen sea mayor ante el mismo estímulo. Para dilucidar la razón del incremento observado con  $K^+$  en comparación con  $Na^+$  se realizaron registros de corriente de canales unitarios.

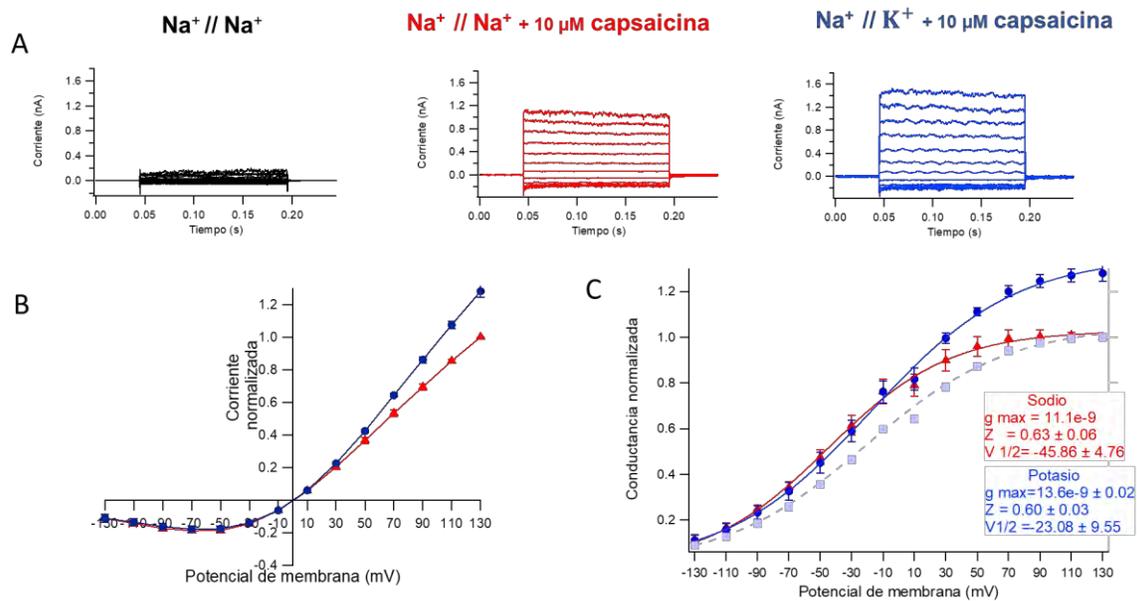


Figura 10. A) Registro representativo de familias de corrientes en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -130 a +130mV con un incremento de 20 mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. 130 mM NaCl (trazos negros), 130 mM de NaCl + 10  $\mu M$  de capsaicina (rojo), 130 mM de KCl (azul). B) y C) Graficas del promedio de la corriente y conductancia (respectivamente) de  $Na^+$  (rojo) y  $K^+$  (azul) normalizadas a la corriente con 130 mM de NaCl simetrico.C) Se muestra la conductancia de potasio normalizada contra si misma(azul claro) n=6 barras muestran el error estandar.

## La permeabilidad de $\text{NH}_4^+$ es mayor a la de $\text{Na}^+$

La permeabilidad de TRPV1 a iones grandes como el ion amonio no había sido estudiada. En este trabajo se muestran registros de corrientes macroscópicas (fig. 11a), que muestran un incremento en la amplitud de la corriente con  $\text{NH}_4^+$  intracelular. La gráfica de corriente I/V (fig. 11b), muestra un incremento solo para corriente saliente, la cual depende del ion  $\text{NH}_4^+$  y que el potencial de reversión es el mismo para ambos iones. La grafica de conductancia (fig. 11c), muestra que a pesar de que la conductancia con amonio (trazo azul oscuro) es mayor que con sodio (trazo rojo), al comparar ambas curvas normalizadas contra sí mismas (trazo azul claro y trazo rojo) las conductancias se sobrelapan, además, la  $V_{1/2}$  no tiene diferencias significativas ( $P=0.49$ ).

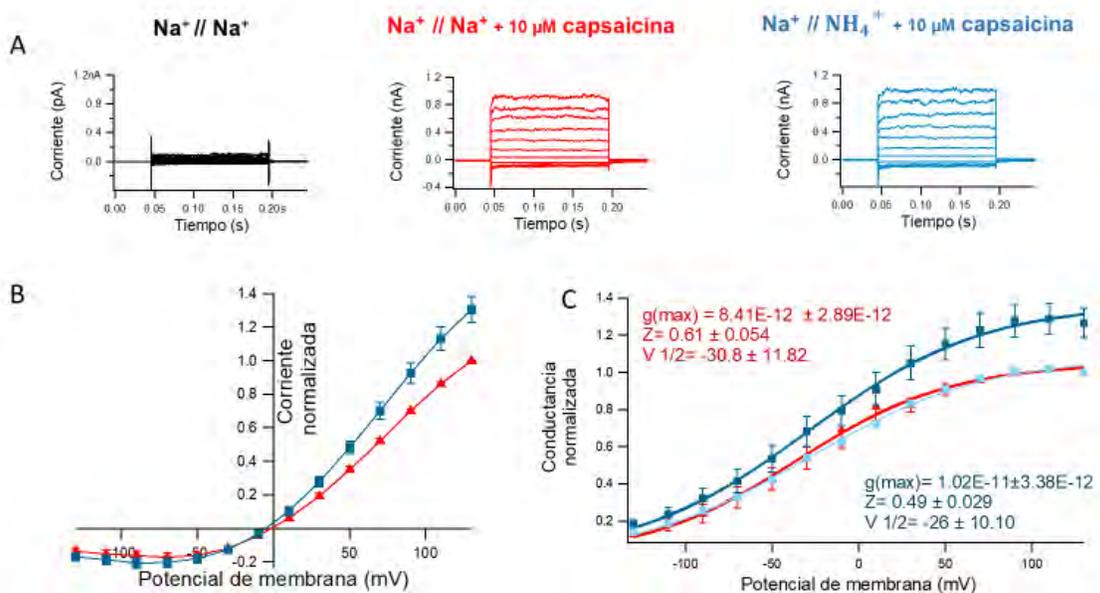


Figura 11. A) Registro representativo de familias de corrientes en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -130 a +130 con un incremento de 20 mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. Trazos negros: 130 mM NaCl; trazos rojos: 130 mM de NaCl + 10 mM de capsaicina; trazos morados: 130 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . B) y C). Graficas del promedio de la corriente y conductancia (respectivamente) de  $\text{Na}^+$  (rojo) y  $\text{NH}_4^+$  (azul) normalizadas a la corriente con 130 mM de NaCl a ambos lados de la membrana. Se muestra la conductancia de amonio normalizada contra si misma (azul claro)  $n=9$ , las barras muestran el error estandar.

## La permeabilidad de Cs<sup>+</sup> es mayor a la de Na<sup>+</sup>

Para estos experimentos las condiciones fueron iguales a los utilizados para explorar la conductancia de los anteriores iones respecto a Na<sup>+</sup>. Pero esta vez, la solución intracelular de Na<sup>+</sup> y capsaicina fue intercambiada por Cs<sup>+</sup> + capsaicina.

El Cs<sup>+</sup> esta reportado como ion permeante en TRPV1 (Caterina et al., 1997b; Samways and Egan, 2011a). En los registros de corrientes mostrados en la figura 12a y b, se observa que la amplitud de las corrientes aumenta en presencia de Cs<sup>+</sup> intracelular, tanto la corriente entrante como la corriente saliente. En la figura 12c se muestra la conductancia promedio.

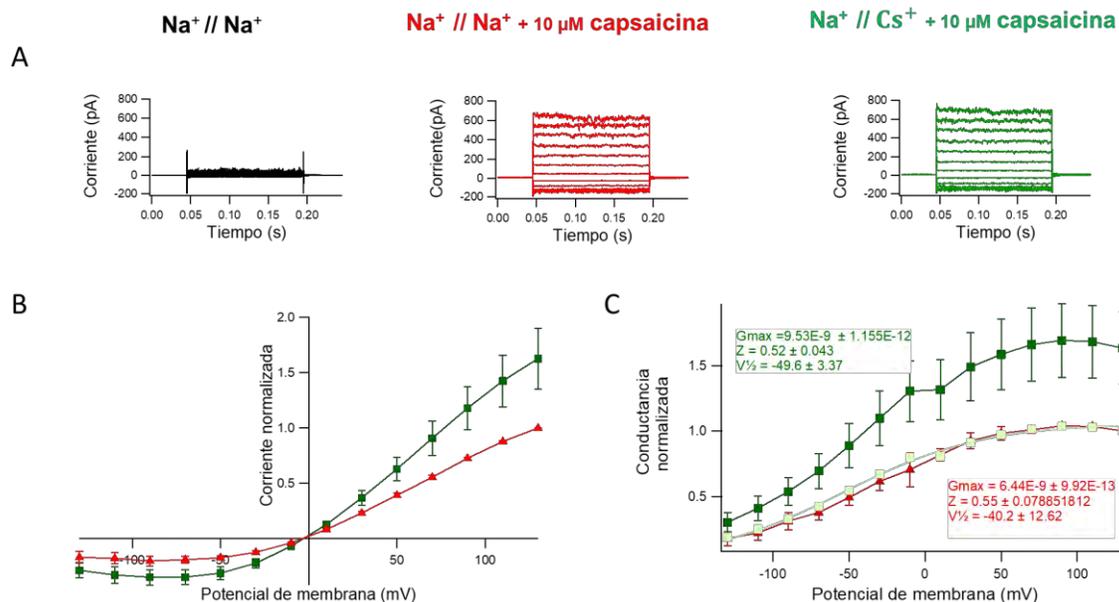


Figura 12. A) Registro representativo de familias de corrientes en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -130 a +130 con un incremento de 20 mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. Trazos negros: 130 mM NaCl; trazos rojos: 130 mM de NaCl + 10 mM de capsaicina; trazos morados: 130 mM de Cs<sup>+</sup>. B) y C). Graficas del promedio de la corriente y conductancia (respectivamente) de Na<sup>+</sup> (rojo) y Cs<sup>+</sup> (verde oscuro) normalizadas a la corriente con 130 mM de NaCl a ambos lados de la membrana. Se muestra la conductancia de cesio normalizada contra si misma(iverde claro) n= 9, las barras muestran el error estandar.

## La permeabilidad de $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ es menor que la de $\text{Na}^+$

El ion  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ , es el ion de mayor tamaño, cuya permeabilidad se estudia en este trabajo. Su permeabilidad en el canal TRPV1 no había sido reportada, sin embargo, se conoce que el canal es capaz de permear iones grandes como guanidina y NMDG (Nilius B. et. al., 2014) En los registros de corrientes macroscópicas (fig. 13a), se observa que la corriente con el ion  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$  intracelular disminuye en comparación a la corriente con sodio simétrico. La grafica I/V (fig. 13b), muestra que el ion no altera la corriente entrante y solo hay cambios en la corriente saliente, además el potencial de reversión es 0 mV para ambos iones. La grafica de la fig. 13c muestra que con el ion  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$  la conductancia es menor que con sodio (trazo amarillo) y a pesar de que la conductancia muestra una cinética distinta (trazo amarillo claro) a la de sodio (trazo rojo) las diferencia en las  $v_{1/2}$  no es significativa ( $P = 0.18$ ).

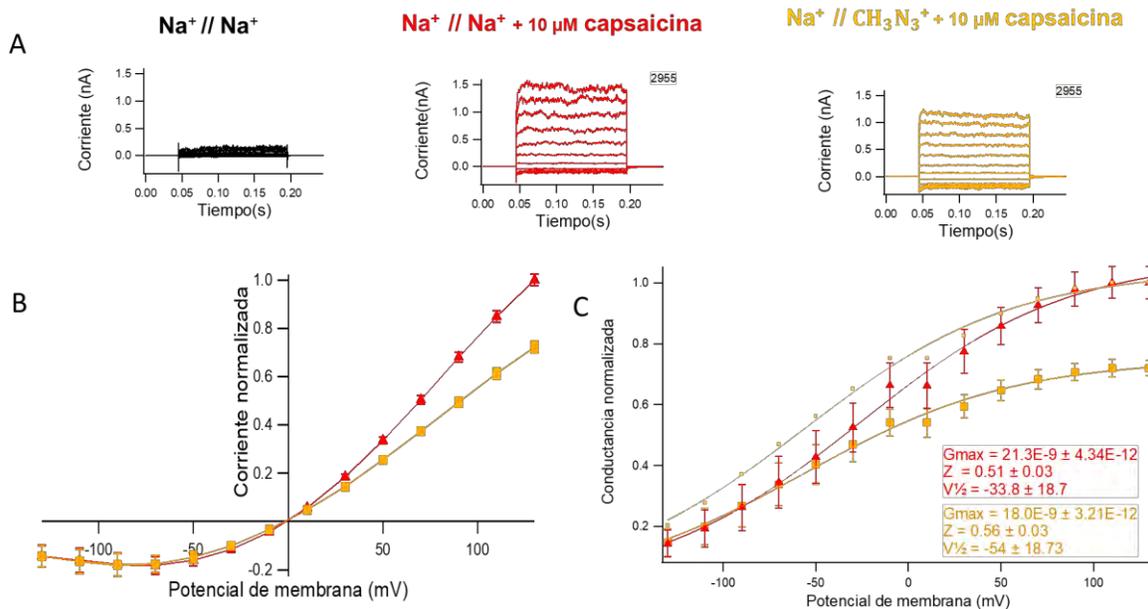


Figura 13. A) Registro representativo de familias de corrientes en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -130 a +130 con un incremento de 20 mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. Trazos negros: 130 mM NaCl; trazos rojos: 130 mM de NaCl + 10mM de capsaicina; trazos morados: 130 mM de CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>Cl. B) y C). Graficas del promedio de la corriente y conductancia (respectivamente) de Na<sup>+</sup> (rojo) y CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (amarillo) normalizadas a la corriente con 130 mM de NaCl a ambos lados de la membrana. Se muestra la conductancia de potasio normalizada contra si misma(amarillo claro) n= 9, las barras muestran el error estandar.

### **La permeabilidad de Li<sup>+</sup> es menor que la de Na<sup>+</sup>**

El Li<sup>+</sup> se ha reportado como un ion que permea a través del canal TRPV1, esto se ha realizado con registros de canal unitario, que sugieren que evoca una menor conductancia que canales registrados con sodio simétrico (Samways and Egan, 2011a). En este apartado, se muestran registros representativos de corrientes macroscópicas (Fig. 15a), comparando la conductancia de sodio y litio en experimentos pareados, igual a los descritos anteriormente con otros iones.

Se observa que la corriente evocada con litio intracelular disminuye comparada con la corriente con sodio. En la gráfica I/V (fig. 15b) se muestra que esta disminución solo es apreciable para la corriente saliente, mientras que la corriente entrante se mantiene. La conductancia (fig. 15c) muestra que la conductancia con litio es menor que con sodio (trazo verde), además, la  $v^{1/2}$  presenta una diferencia significativa ( $P=0.0002$ ), lo que puede sugerir que el litio este interactuando con el filtro selector y podría indicar la presencia de una compuerta en el mismo.

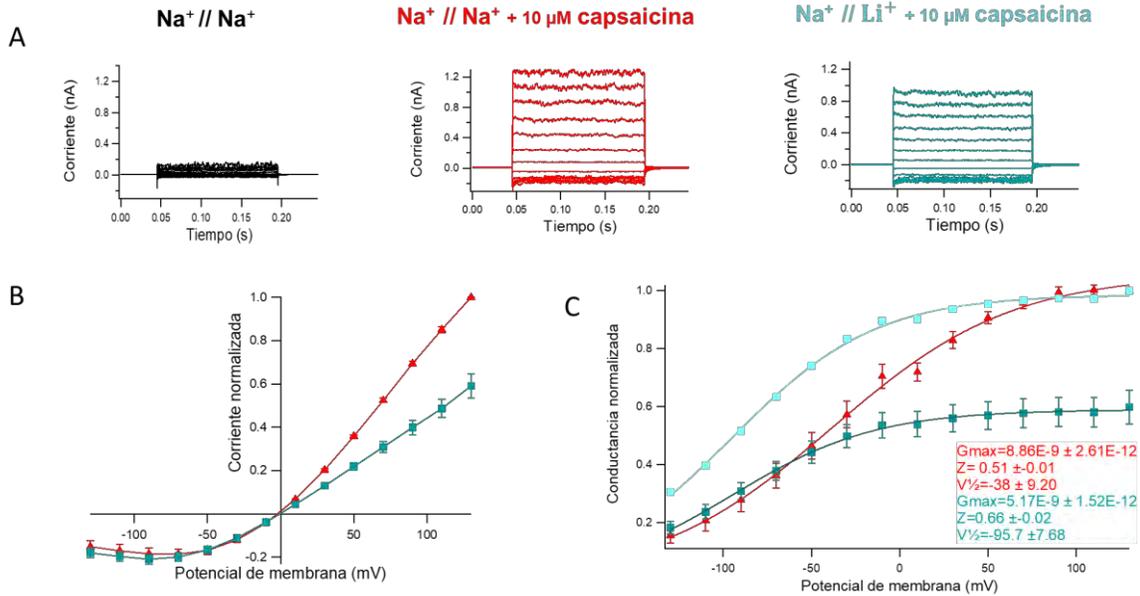


Figura 15. A) Registro representativo de familias de corrientes en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -130 a +130 con un incremento de 20 mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. Trazos negros: 130 mM NaCl; trazos rojos: 130 mM de NaCl + 10 mM de capsaicina; trazos morados: 130 mM de LiCl. B) y C). Graficas del promedio de la corriente y conductancia (respectivamente) de Na<sup>+</sup> (rojo) y Li<sup>+</sup> (verde) normalizadas a la corriente con 130 mM de NaCl a ambos lados de la membrana. Se muestra la conductancia de litio normalizada contra si misma (azul claro) n= 9, las barras muestran el error estandar.

### **La permeabilidad de Rb<sup>+</sup> es menor que la de Na<sup>+</sup>; el rubidio parece actuar como un bloqueador.**

Para estos experimentos las condiciones fueron iguales a los utilizados para explorar la conductancia de otros iones respecto a Na<sup>+</sup>. Pero esta vez, la solución intracelular de Na<sup>+</sup> y capsaicina fue intercambiada por Rb<sup>+</sup> + capsaicina.

La permeabilidad de Rb<sup>+</sup> en el canal TRPV1 no ha sido investigada, pero existen reportes de que TRPV1 puede transportar iones de Rb<sup>+</sup> (Zicha et al., 2013), a pesar de esto, la información sobre su permeabilidad es escasa. Los registros de corrientes macroscópicas en estos experimentos muestran una menor amplitud en los registros que presentan Rb<sup>+</sup> en la cara intracelular respecto a los registros donde las concentraciones de sodio son iguales a ambas caras de la membrana (Fig. 16a).

En la gráfica de la corriente respecto al voltaje (Fig. 16b), se observa que el  $Rb^+$  está disminuyendo la corriente saliente e incluso la entrante, que está dada por el  $Na^+$  que hay en la pipeta, lo que podría indicar que el  $Rb^+$  está actuando como un bloqueador, disminuyendo la conductancia del canal. Aunque existe la posibilidad de que el  $Rb^+$  este disminuyendo la probabilidad de apertura, lo cual también puede explicar la disminución en la amplitud de la corriente macroscópica. Estas hipótesis se investigaron con los registros de canales unitarios. En la conductancia (fig. 16c), se observa que la voltaje dependencia no tiene cambios significativos ( $P = 0.052$ ).

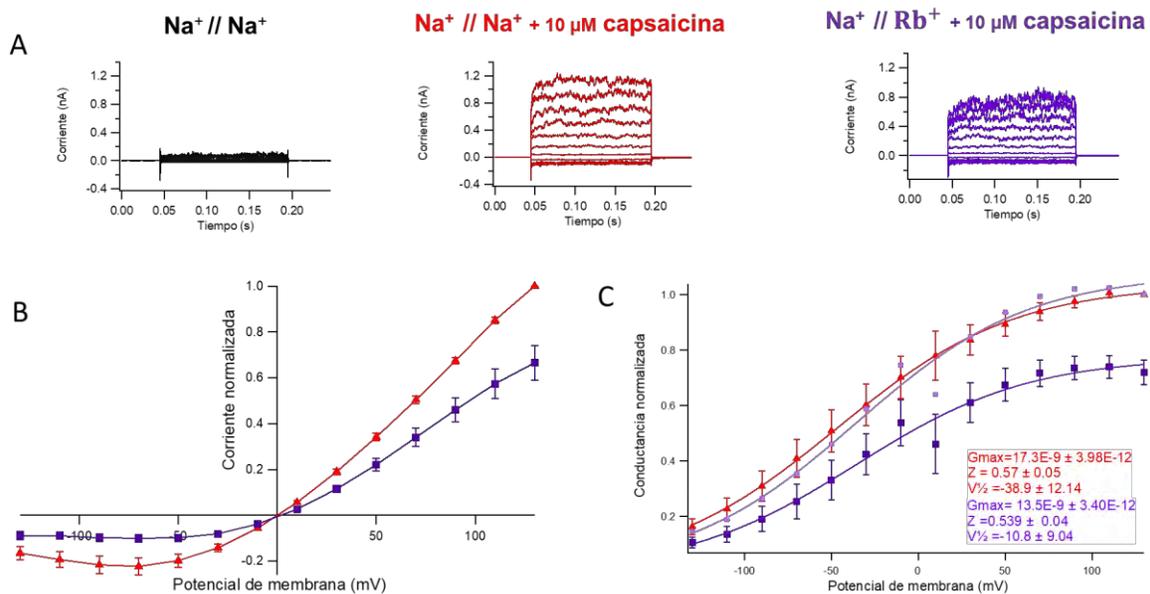


Figura 16. A) Registro representativo de familias de corrientes en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -130 a +130 con un incremento de 20 mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. Trazos negros: 130 mM NaCl; trazos rojos: 130 mM de NaCl + 10 mM de capsaicina; trazos morados: 130 mM de RbCl. B) y C). Graficas del promedio de la corriente y conductancia (respectivamente) de  $Na^+$  (rojo) y  $Rb^+$  (morado) normalizadas a la corriente con 130 mM de NaCl a ambos lados de la membrana. Se muestra la conductancia de rubidio normalizada contra si misma (lila)  $n=10$  barras muestran el error estandar.

## La conductancia y dependencia de voltaje varia con el ion permeante

A cada grafica de conductancia mostrada para cada uno de los 6 iones estudiados, le fue ajustada una función Boltzmann. y se calcularon los promedios de la conductancia máxima, la carga y la  $v^{1/2}$ . En la tabla 1, se muestra un resumen de estos valores para cada experimento, comparado con los valores obtenidos con sodio simétrico y al cambiar el tipo de ion. Puede notarse en rojo el valor de la  $v^{1/2}$  en los experimentos con litio, único caso en que hay una diferencia significativa en la  $v^{1/2}$  ( $P= 0.0002$ ). En los demás experimentos a pesar de que la  $v^{1/2}$  varia con los diferentes iones, las diferencias no fueron significativas ( $P > 0.01$ ). En lo que respecta al valor de Z también hubo diferencia significativa con el ion litio ( $P = 0.002$ ) lo que indica que posiblemente el ion litio, que es el ion más pequeño, esta interactuando de manera más fuerte con el poro del canal.

Tabla 1. Promedios de conductancia maxima, carga y  $v^{1/2}$  para cada condición experimental.

	Na <sup>+</sup>	CH <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cs <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Rb <sup>+</sup>	Na	K	Na <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>
g <sub>max</sub> (S)	21.3E-9	18.0E-9	8.41E-9	10.1E-9	6.44E-9	9.53E-9	17.2E-9	13.4E-9	11.1e-9	13.6e-9	8.85E-9	5.17E-9
Z( e )	0.51	0.51	0.61	0.49	0.55	0.53	0.57	0.54	0.63	0.60	0.51	0.66
v <sup>1/2</sup> (mV)	-33.77	-54.02	-30.82	-26.23	-40.18	-49.63	-38.93	-10.81	-45.86	-23.08	-38.62	-95.70

Para visualizar los cambios de la  $v^{1/2}$  con los diferentes iones se cálculo la diferencia de la misma entre cada uno de los 6 iones estudiados y con sodio. Como se muestra en la figura 17 la diferencia de la  $v^{1/2}$  entre los iones y el sodio es muy similar excepto con el litio. Esto podria indicarnos que el litio esta intecactuando con el filtro selector.

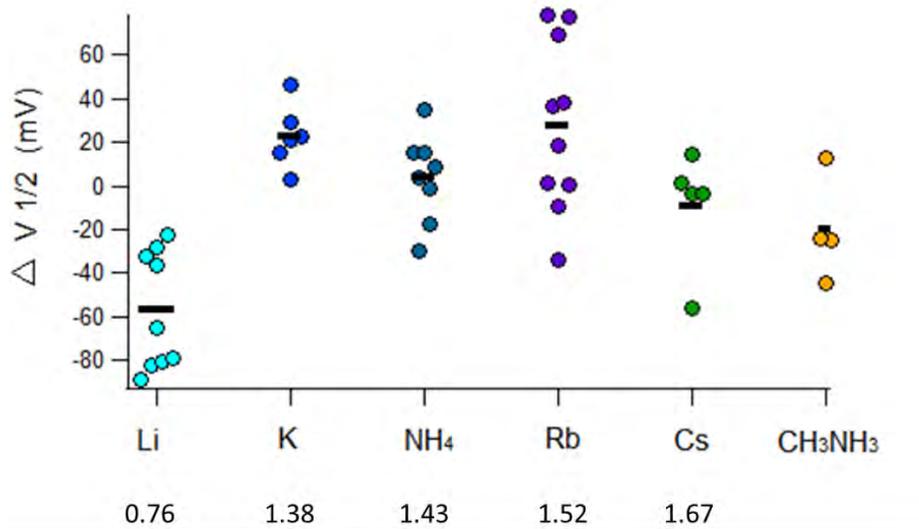


Figura 17. Comparacion de la diferencia de las  $V_{1/2}$  para cada experimento. Fueron calculadas como la  $v_{1/2}$  de cada ion menos la  $v_{1/2}$  con sodio, de cada experimento. En la parte inferior se indica el radio ionico en Angstroms.

Con los registros de corrientes macroscópicas, realizados variando el tipo de ion que permea por el canal se muestra que:

- La corriente saliente varia en todos los casos, siendo mayor con:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$  y  $\text{K}^+$  ; y menor con  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$
- La corriente entrante, que en principio se debe a la permeación de  $\text{Na}^+$  disminuye con  $\text{Rb}^+$  lo que puede indicar que este ion esta actuando como un bloqueador permeante o también afectando la probabilidad de apertura.
- La diferencia de la  $V_{1/2}$  y carga aparente con respecto a  $\text{Na}^+$ , solo son significativos para los experimentos con  $\text{Li}^+$  lo que sugiere que este ion esta interactuando con el filtro selector y que exista un componente dependiente de voltaje.

Las variaciones en la corriente y conductancia a nivel macroscópico podría deberse a que los iones permeen menos o mas a través del canal o a que el ion disminuya la probabilidad de apertura del canal, lo que indicaría un efecto en la compuerta del canal. Estas hipotesis se discuten mas adelante con los experimentos de canal unitario.

## **Las corrientes unitarias del canal TRPV1 son distintas al variar el tipo de ion permeante**

Para el registro de corrientes unitarias, fue necesario ajustar las condiciones de transfección y el tamaño de la pipeta, con la finalidad de crear condiciones en las que la membrana celular presente una menor cantidad de canales TRPV1 y la pipeta sea lo suficientemente pequeña para que nos permita aumentar la probabilidad de registrar un solo canal.

Las condiciones para el registro de canal unitario han sido modificadas, bajando la concentración de TRPV1 WT a 25 ng/ml y utilizando pipetas con una resistencia de 8 a 12 M $\Omega$  y las mismas concentraciones de Na<sup>+</sup> extracelular. Las células son registradas 22 horas después de haber sido transfectadas.

Los experimentos se realizaron siguiendo la misma secuencia experimental descrita para las corrientes macroscópicas (ver métodos).

## **Los iones Rb y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cambian la probabilidad de apertura del canal**

Como se muestra en la figura 18 la corriente unitaria en registros con rubidio es mayor que la registrada con sodio, lo cual es distinto a lo observado en corrientes macroscópicas, además, como se observa en los registros de la corriente unitaria con rubidio, disminuye la probabilidad de apertura del canal (tabla 2), lo cual sugiere un efecto en la compuerta del canal.

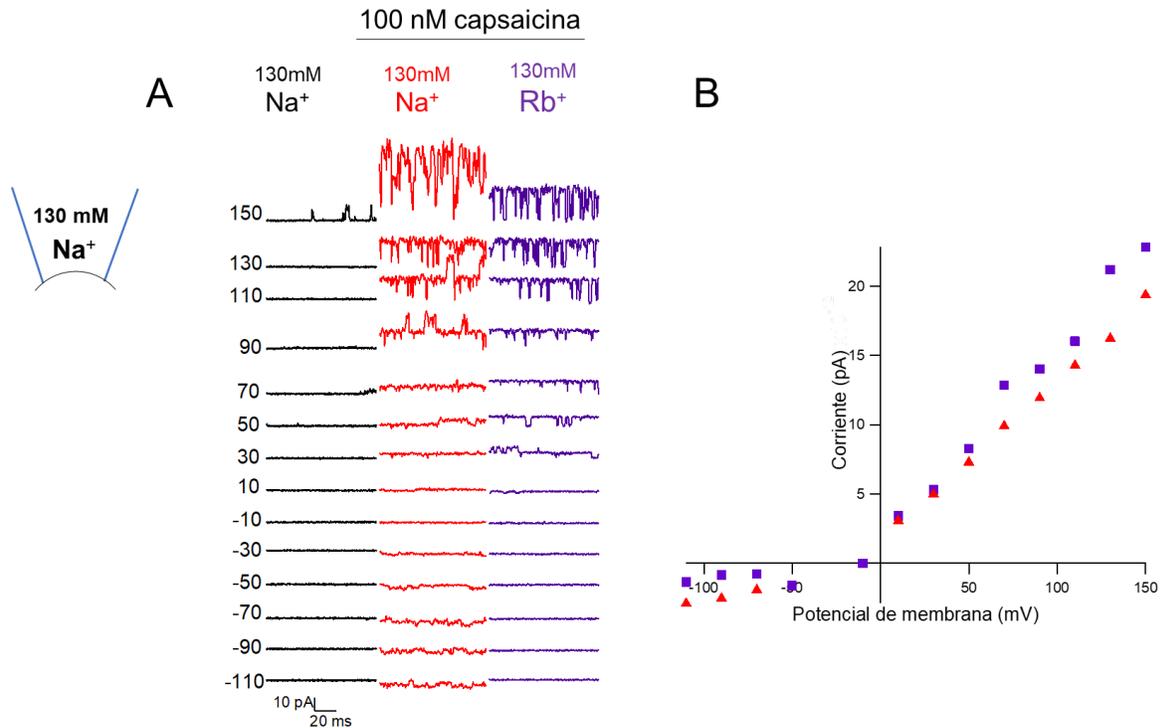


Figura 18. Registro representativo de la corriente unitaria de TRPV1 en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -110 a +150 mV con un incremento de 20mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. 130 mM NaCl (negro), 130 mM de NaCl + 100 nM de capsaicina (rojo), 130 mM de RbCl + 100 nM de capsaicina (morado). Derecha se muestra una gráfica representativa de la curva corriente-voltaje de la corriente unitaria Na<sup>+</sup> (rojo) Rb<sup>+</sup> (morado).

En la figura 19, se muestra un registro representativo, donde se observa que la corriente unitaria con amonio también tiene mayor amplitud respecto a la corriente con sodio.

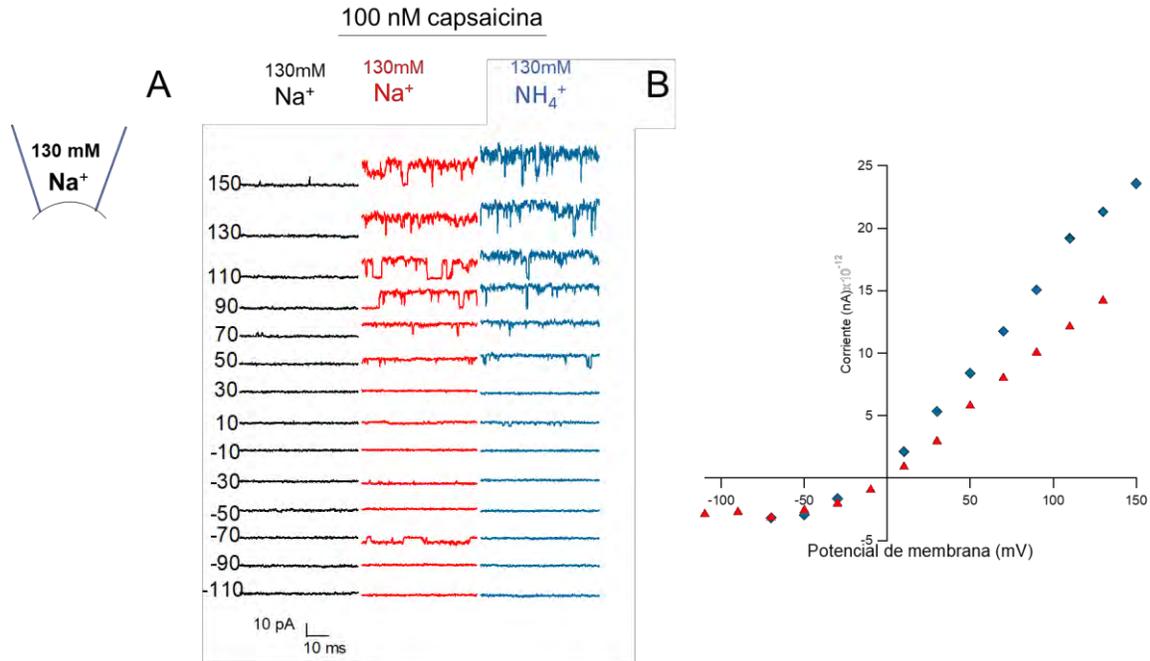


Figura 19. Registro representativo de la corriente unitaria de TRPV1 en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -110 a +150 mV con un incremento de 20mV entre cada pulso, Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. 130 mM NaCl (negro), 130 mM de NaCl + 100 nM de capsaicina (rojo), 130 mM de NH<sub>4</sub>Cl + 100 nM de capsaicina (Azul). Derecha se muestra una gráfica representativa de la corriente unitaria Na<sup>+</sup> (rojo) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (azul).

En ambos casos, se puede notar que la corriente a potenciales negativos es pequeña con relación a potenciales positivos, esta asimetría en la corriente puede deberse a que a potenciales negativos los iones permeen más lento, debido a una asimetría en los sitios de unión en el canal, o puede deberse a que existan transiciones muy rápidas entre el estado abierto y cerrado del canal, que no alcancen a ser resueltas y por ello, la corriente del canal se vea atenuada en los registros, para lo cual se requiere realizar un análisis que nos permita distinguir si existen o no estas transiciones.

## La conductancia unitaria con $\text{Li}^+$ es menor que con $\text{Na}^+$

En los registros de canal unitario utilizando litio (fig. 20), se observa que este ion no afecta la probabilidad de apertura del canal (tabla 2 ). En la grafica I/V se muestra que con litio disminuye la corriente saliente, lo cual es concordante con lo observado en registros de corrientes macroscopicas. Esto posiblemente se deba a que este ion esté interactuando fuertemente con el poro, lo que sugiere la existencia de una compuerta en el filtro de selectividad. Como se mostró anteriormente el litio cambia la  $V^{1/2}$  del canal, por lo que la interacción con el poro podría ser voltaje dependiente.

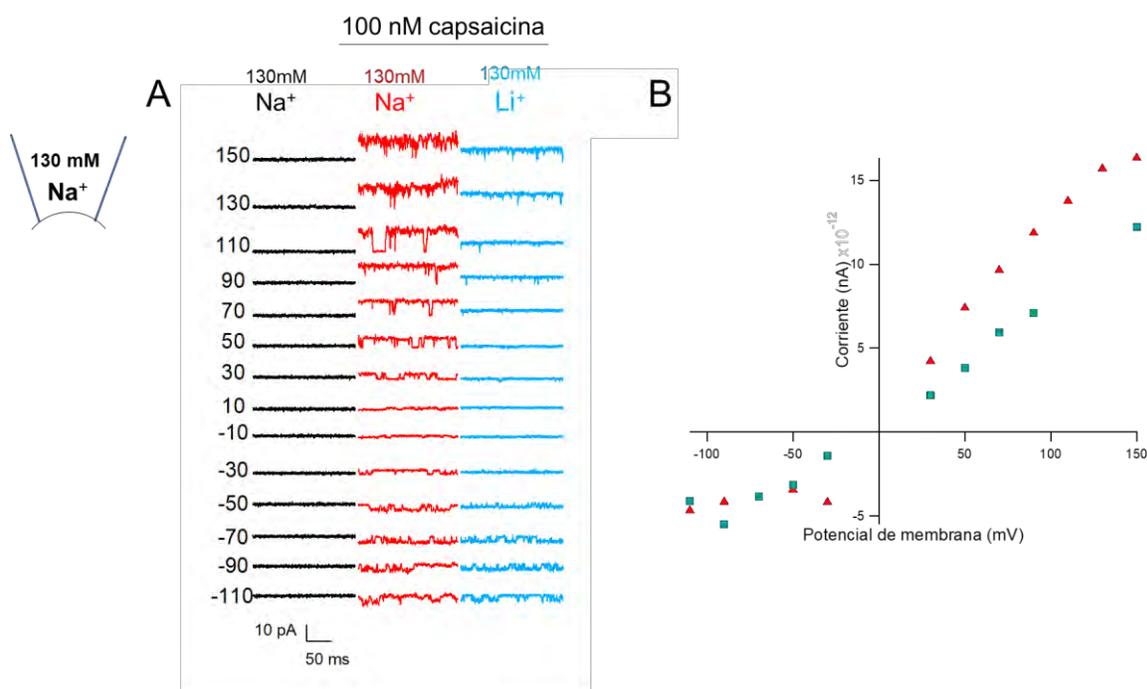


Figura 20. Registro representativo de la corriente unitaria de TRPV1 en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -110 a +150 mV con un incremento de 20mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. 130 mM NaCl (negro), 130 mM de NaCl + 100 nM de capsaicina (rojo), 130 mM de LiCl + 100 nM de capsaicina (Azul). Derecha se muestra una gráfica representativa de la corriente unitaria Na<sup>+</sup> (rojo) Li<sup>+</sup> (azul).

## La corriente unitaria es mayor con K<sup>+</sup> con respecto a Na<sup>+</sup>

En la figura 21, se muestra un registro representativo de la corriente unitaria del canal y la curva I/V del mismo, se observa que la corriente unitaria del canal es mayor tanto a potenciales negativos como positivos concordante a lo observado con corrientes macroscópicas.

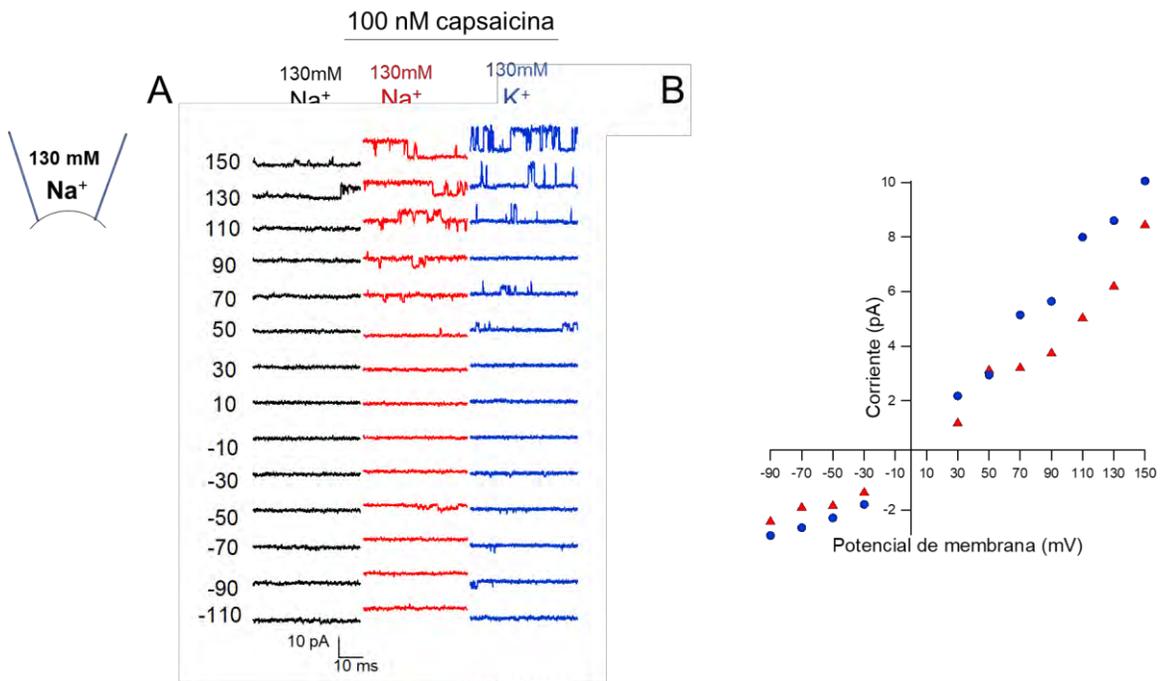


Figura 21. Registro representativo de la corriente unitaria de TRPV1 en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -110 a +150 mV con un incremento de 20mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. 130 mM NaCl (negro), 130 mM de NaCl + 100 nM de capsaicina (rojo), 130 mM de KCl + 100 nM de capsaicina (Azul). Derecha se muestra una gráfica representativa de la corriente unitaria Na<sup>+</sup> (rojo) K<sup>+</sup> (azul).

## La corriente unitaria con Cs<sup>+</sup> es mayor que con Na<sup>+</sup>

Los registros realizados con cesio se muestran en la figura 20, donde se observa que el ion no parece tener un efecto en la probabilidad de apertura del canal, sin embargo, las corrientes salientes tienen un incremento similar al que se mostró en registros de corrientes macroscópicas. Y se mantiene la asimetría en la amplitud de la corriente en voltajes positivos vs voltajes negativos.

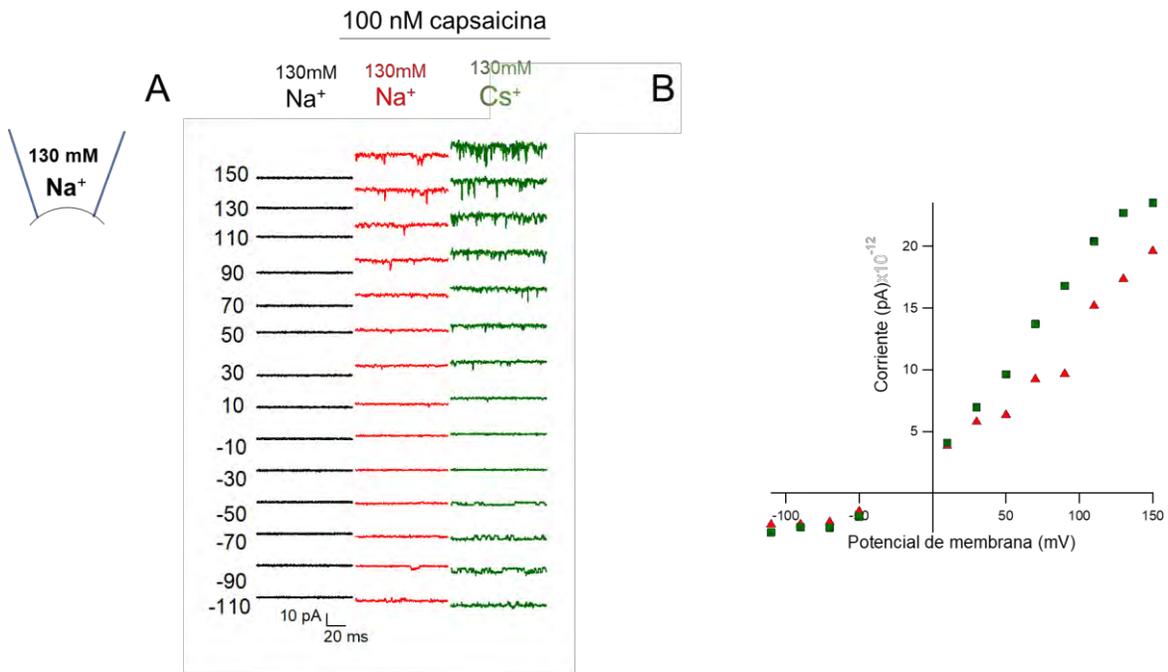


Figura 19. Registro representativo de la corriente unitaria de TRPV1 en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -110 a +150 mV con un incremento de 20mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. 130 mM NaCl (negro), 130 mM de NaCl + 100 nM de capsaicina (rojo), 130 mM de CsCl + 100 nM de capsaicina (verde). Derecha, se muestra una gráfica representativa de la corriente unitaria Na<sup>+</sup> (rojo) Cs<sup>+</sup> (verde).

## La corriente unitaria con $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ y $\text{Li}^+$ es menor que con $\text{Na}^+$

En los registros de corrientes unitarias con  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$  (Figura 20), se observa que la corriente entrante es igual con ambos iones, mientras la corriente saliente es menor con el ion metilamonio. Este ion no cambia la probabilidad de apertura del canal,

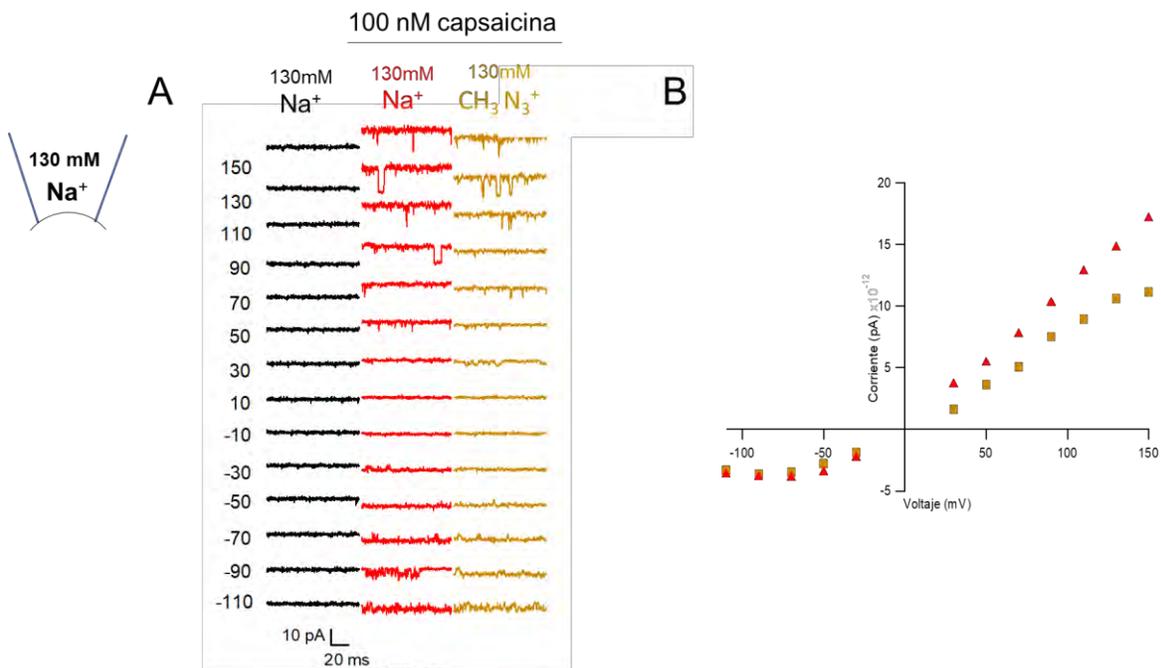


Figura 20. Registro representativo de la corriente unitaria de TRPV1 en respuesta a pulsos cuadrados de voltaje de -110 a +150 mV con un incremento de 20mV entre cada pulso. Registro realizado con 130 mM de NaCl en la pipeta y variando el tipo de ion en el medio intracelular. 130 mM NaCl (negro), 130 mM de NaCl + 100 nM de capsaicina (rojo), 130 mM de  $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$  + 100 nM de capsaicina (amarillo). Derecha, se muestra una gráfica representativa de la corriente unitaria  $\text{Na}^+$  (rojo)  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$  (amarillo).

## La probabilidad de apertura del canal TRPV1 con diferentes iones

Se realizó el cálculo de la probabilidad de apertura como el tiempo en estado abierto del canal entre el tiempo total del registro. Este análisis se realizó para cada ion probado en este trabajo, en los registros a 90 mV, ya que a este potencial la probabilidad de apertura parecía ser la más alta. Los resultados de este análisis se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 2. Probabilidad de apertura del canal TRPV1 con diferentes iones, calculada a partir de un registro de canal unitario a 90mV.

	Po Na <sup>+</sup>	Po X <sup>+</sup>
<b>K<sup>+</sup></b>	0.6298	0.6910
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0.7968	<b>0.4789</b>
<b>Li<sup>+</sup></b>	0.7226	0.7250
<b>Cs<sup>+</sup></b>	0.7994	0.7936
<b>CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	0.8033	0.6898
<b>Rb<sup>+</sup></b>	0.7256	<b>0.3779</b>

## La secuencia de permeabilidad relativa de TRPV1 coincide con la secuencia I de Eisenman

Para comparar la selectividad entre los diferentes iones (Fig. 21), al ser registros pareados, se realizó un cociente entre la corriente del ion X<sup>+</sup> y la corriente con Na<sup>+</sup> correspondiente.

En la figura 21, se muestran registros representativos de la corriente unitaria con los 6 diferentes iones en respuesta a un pulso cuadrado de voltaje a 90 mV. En la tabla de la figura 22, se observa la permeabilidad relativa para cada ion y en la parte inferior se encuentra la secuencia de permeabilidad propuesta a partir de los resultados de este trabajo.

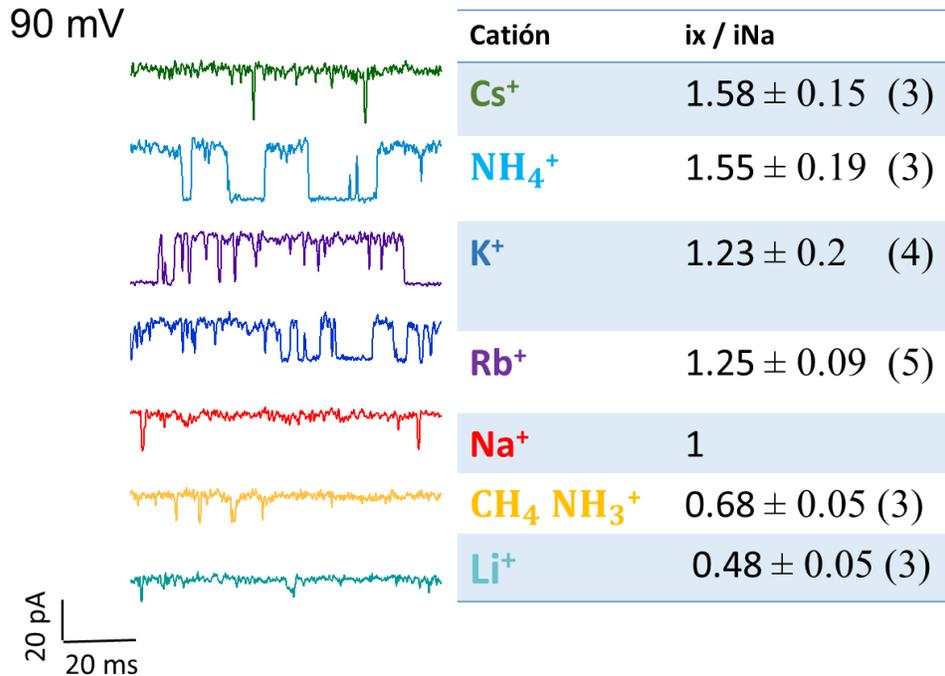


Figura 21. Registros de canal unitario, con la técnica patchclamp en su configuración inside-out. Utilizando 130 mM de  $Na^+$  variando el tipo de ion intracelular (130 mM de  $X^+$ ) a 90 mV. En la tabla se muestra la selectividad relativa para cada ion, calculada como el cociente de la corriente con el ion  $X^+$  entre la corriente con  $Na^+$ . En la parte inferior se muestra una secuencia de selectividad para el canal TRPV1.

La secuencia de selectividad realizada en este trabajo coincide mejor con la secuencia número uno de las secuencias propuestas por Eisenman, la cual muestra que los iones más grandes tienen una mayor permeabilidad, sin embargo, en nuestra secuencia de permeabilidad, el ion metilamonio que es el ion más grande probado en este estudio, tiene una permeabilidad baja, lo cual podría deberse a que, por su gran tamaño, permee con menor velocidad dentro del poro de selectividad.

Li > Na > K > Rb > Cs	Sequence	XI (at highest field strength)
Na > Li > K > Rb > Cs	Sequence	X
Na > K > Li > Rb > Cs	Sequence	IX
Na > K > Rb > Li > Cs	Sequence	VIII
Na > K > Rb > Cs > Li	Sequence	VII
K > Na > Rb > Cs > Li	Sequence	VI
K > Rb > Na > Cs > Li	Sequence	V
K > Rb > Cs > Na > Li	Sequence	IV
Rb > K > Cs > Na > Li	Sequence	III
Rb > Cs > K > Na > Li	Sequence	II
Cs > Rb > K > Na > Li	Sequence	I (at lowest field strength)



Figura 22. Secuencias de permeabilidad teóricas propuestas por Eisenman (parte superior) en rojo, la secuencia que coincide mejor con la secuencia propuesta en este trabajo. Secuencia de permeabilidad relativa de TRPV1, calculada a partir del cociente de la corriente de canales unitarios  $I_x/I_{Na}$ .

Con los registros de canal unitario realizados, variando el tipo de ion que permea por el canal se muestra que:

- La secuencia de permeabilidad de TRPV1 corresponde muy bien con la secuencia I de permeabilidad propuesta por Eisenman.
- La corriente unitaria con iones como  $NH_4^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Li^+$  y  $K^+$  tiene un comportamiento que concuerda con los registros de corrientes macroscópicas, realizados con estos iones.
- La corriente unitaria con rubidio es mayor que con sodio, lo cual es contrario a lo observado en corrientes macroscópicas.
- Los iones  $NH_4^+$  y  $Rb^+$  disminuyen la probabilidad de apertura del canal.

## **La corriente unitaria del canal TRPV1 explicada por un modelo con tres estados cerrados**

Para tratar de explorar la relación entre el ion permeante y la compuerta del canal, partimos de la hipótesis de la existencia de una segunda compuerta (localizada en el filtro selector), (Cao et al., 2013; Patapoutian et al., 2010), el cual podría tener cambios conformacionales que expliquen la voltaje dependencia observada, al variar el ion permeante en corrientes macroscópicas y amplitud de corriente unitaria.

En los registros de canal unitario se observa un cambio en la amplitud de la corriente a voltajes positivos, además, durante el registro del estado abierto del canal se nota una mayor cantidad de ruido que durante los estados cerrados, que podrían deberse a transiciones rápidas entre el estado abierto y un estado cerrado.

Una de las maneras de analizar estas transiciones rápidas, es a través de la creación de histogramas de todos los puntos a partir de los datos experimentales, en la figura 23a, se observan registros representativos de un mismo experimento con  $\text{Na}^+$  y posteriormente con  $\text{Cs}^+$ , se puede notar que con  $\text{Cs}^+$  la amplitud de la corriente es mayor que con  $\text{Na}^+$  a voltajes positivos, no siendo así a voltajes negativos y que durante el estado abierto del canal, la corriente se observa con fluctuaciones de mayor amplitud que el ruido del estado cerrado. Los histogramas (figura 23b) muestran que a voltajes negativos son prácticamente simétricos y superponibles para ambos iones, mientras que a voltajes positivos, se observa una asimetría en la distribución de amplitudes en cada histograma, la cual es marcadamente más grande con cesio que con sodio. Este fenómeno en el que la asimetría de los histogramas con diferentes iones cambia con el voltaje sucede con todos los iones estudiados, en mayor o menor grado.

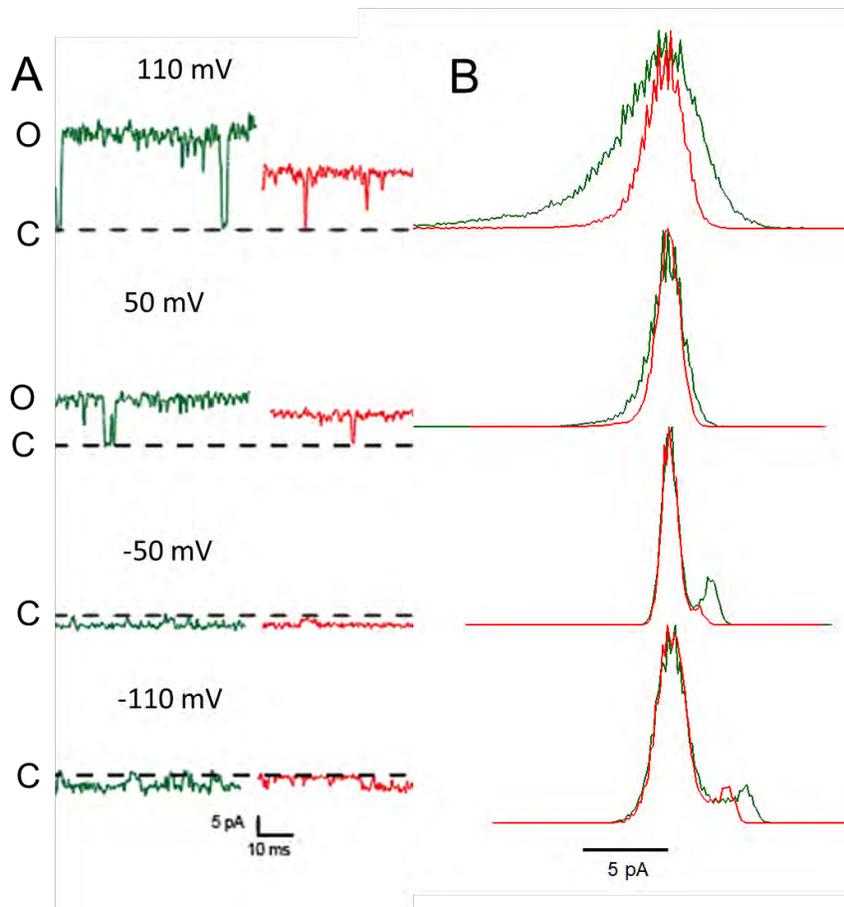


Figura 23. Asimetría de los histogramas a diferentes voltajes y con diferentes iones. A) Registros representativos de corrientes unitarias con cesio (verde) y con sodio (rojo). B) Histograma de amplitudes a estos voltajes con ambos iones.

Esta asimetría en los histogramas describe las transiciones rápidas que no son observadas en los registros, más que como un aumento de amplitud en el ruido durante el estado abierto del canal, como se mencionó antes. Estas transiciones podrían estar involucradas con la compuerta del canal, además, parecen ser más rápidas conforme incrementa el voltaje y dependientes del ion permeante.

Para poder explicar la asimetría presente en los histogramas, la cual se debe a las fluctuaciones observadas en la corriente unitaria, e investigar si existe un componente dependiente de voltaje en este comportamiento, se partió de un modelo (Fig. 24), que considera que el canal puede estar en un estado cerrado (C), que puede durar cierta cantidad de tiempo, pasar a un estado abierto (O), mantenerse y volver a cerrarse (C), lo cual correspondería al primer parte del modelo. La segunda

parte comprende que el estado abierto podría pasar a otro estado cerrado, llamémosle C', el cual comprende una serie de transiciones más rápidas entre O-C', las cuales no pueden ser resueltas con los registros electrofisiológicos y que explican parte de las fluctuaciones, registradas durante el estado abierto del canal y la tercera parte del modelo muestra un tercer estado cerrado (C'') que comprende un paso entre O-C'' más rápido que los anteriores, lo que complementaría las fluctuaciones registradas en las corrientes.

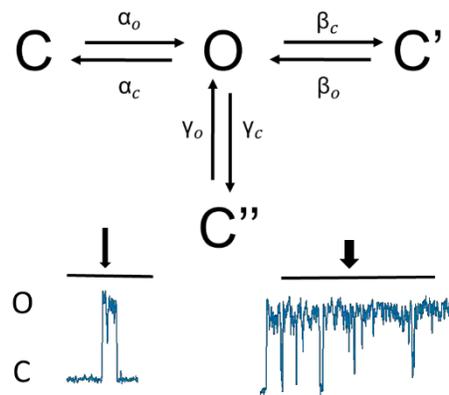


Figura 24. Representación del modelo que describe el comportamiento de las corrientes unitarias del canal TRPV1.

Para el análisis de los histogramas de las corrientes unitarias, se diseñó en el laboratorio un programa en lenguaje Python el cual genera una simulación de un registro de canal unitario ideal, es decir sin ruido y sin haber pasado por un filtro. Cuando en esta simulación se considera sólo un estado cerrado y uno abierto C-O, y que la probabilidad de pasar al estado abierto, es más grande que la de pasar o mantenerse en un estado cerrado, se obtiene un registro ideal, como el mostrado en la figura 23a, en donde, el tiempo de vida del estado cerrado, es menor que el tiempo de vida en estado abierto. Cuando a este registro ideal, se le agrega ruido simulado y los datos son filtrados, como sucede cuando se adquieren la corriente en un experimento real, se obtiene un registro que podría simular el comportamiento de un canal cuando es activado, por ejemplo, por un agonista (Fig. 23b). Sin embargo, cuando pasamos de este modelo donde tenemos un estado cerrado y un

estado abierto, a un modelo que considera más de un estado cerrado, se debe de agregar la probabilidad por unidad de tiempo de que el canal se mantenga en un estado, pase a otro estado o retroceda a uno previo.

Cuando se toman en consideración estos parámetros y se genera un registro ideal (Fig. 23c), observamos, que durante un tiempo en el registro, el canal permanece cerrado, mientras que en el tiempo en que en el modelo anterior el canal permanecía abierto, ahora vemos transiciones entre el estado abierto y uno o más estados cerrados diferentes, dichas transiciones son muy rápidas, y por eso, en la figura 23c, suelen observarse como franjas azules; cuando a este registro ideal, se le agrega ruido, y estos datos son filtrados, se obtiene una simulación de registro de corriente como la observada en la figura 23d, en la cual se aprecia un tiempo de vida cerrado y un tiempo de vida abierto, pero durante el tiempo de vida abierto, se observan fluctuaciones en la amplitud de la corriente, que corresponden a las transiciones rápidas que podíamos apreciar en el registro ideal, y que en esta simulación se encuentran atenuadas debido al filtro al que fue sometida la simulación. Esta simulación es muy parecida en forma, a los registros experimentales obtenidos en este trabajo, un ejemplo representativo, es el registro obtenido a 90 mV mientras el canal TRPV1 permeaba el ion amonio (Fig. 23e), donde puede observarse que las fluctuaciones de la simulación durante el aparente estado abierto son comparables con las fluctuaciones observadas en el registro experimental. Lo anterior indica que, estas fluctuaciones pueden ser explicadas por transiciones rápidas entre el estado abierto y varios estados cerrados, que no se pueden observar en el registro más que como un aumento en el ruido cuando el canal está en el estado abierto.

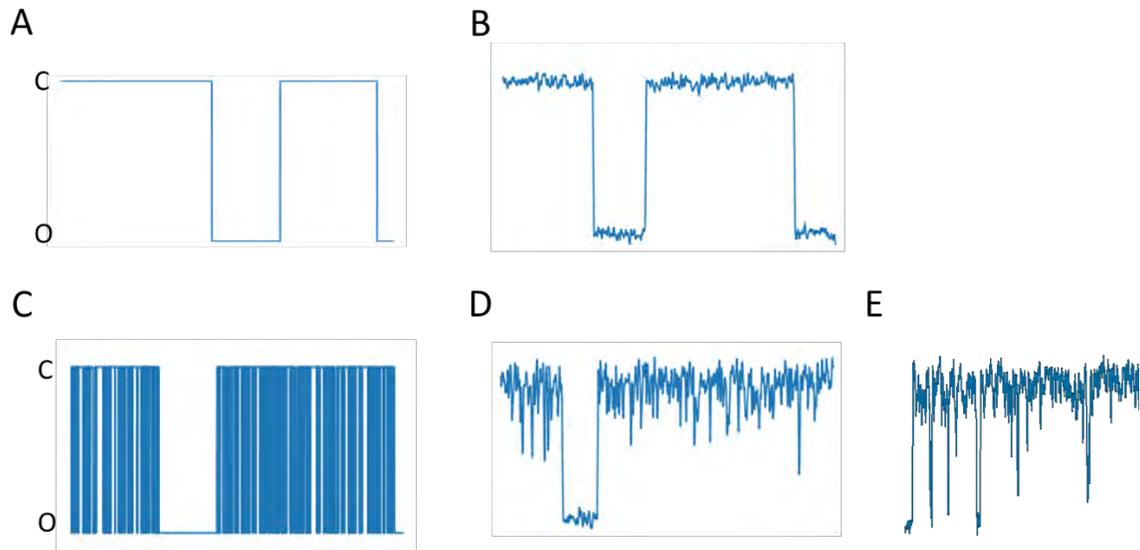


Figura 23. Registros de canal unitario simulados con el programa en Python son similares a los registros experimentales. A) Simulación de un registro ideal con un estado abierto y uno cerrado; B) Simulación de un registro filtrado con un estado abierto y uno cerrado; C) Simulación de un registro ideal con un estado abierto y tres estados cerrados; D) Simulación de un registro filtrado con un estado abierto y tres estados cerrados; E) Registro representativo de la corriente unitaria de TRPV1 a 90 mV con amonio como ion permeante.

Para calcular la probabilidad de pasar de un estado a otro se utilizará este programa en Python, que produce un histograma teórico partir de los registros simulados y lo ajusta a los histogramas experimentales, dando como resultado las 6 constantes de velocidad, mostradas en el modelo previamente descrito (figura 25), y que se denominaron como: alfa open ( $\alpha_o$ ), alfa close ( $\alpha_c$ ), beta open ( $\beta_o$ ), beta close ( $\beta_c$ ), gamma open ( $\gamma_o$ ), gamma close ( $\gamma_c$ ).

En dicho programa, puede observarse que, al modelar la apertura y cierre del canal, considerando solo un estado cerrado y crear el histograma correspondiente da como resultado un histograma simétrico que se ajusta muy bien a una función Gaussiana (figura 26a); mientras que al modelar considerando un segundo estado cerrado cuya probabilidad por unidad de tiempo de pasar de un punto a otro es más rápido, se obtiene un ajuste mejor al histograma experimental (figura 26b), pero que no termina de explicar la asimetría del mismo, lo que sugiere la existencia de un tercer estado cerrado, como se mencionaba anteriormente, al analizar el histograma

considerando un tercer estado cerrado con una probabilidad por unidad de tiempo de abrirse muy rápido, se obtiene un buen ajuste al histograma experimental.

Por lo que este análisis muestra que la asimetría observada en el histograma experimental describe las fluctuaciones rápidas entre el estado abierto y al menos dos estados cerrados del canal, dichas transiciones podrían tener una dependencia del voltaje y/o ser influenciados por el tipo de ion que permea por el canal.

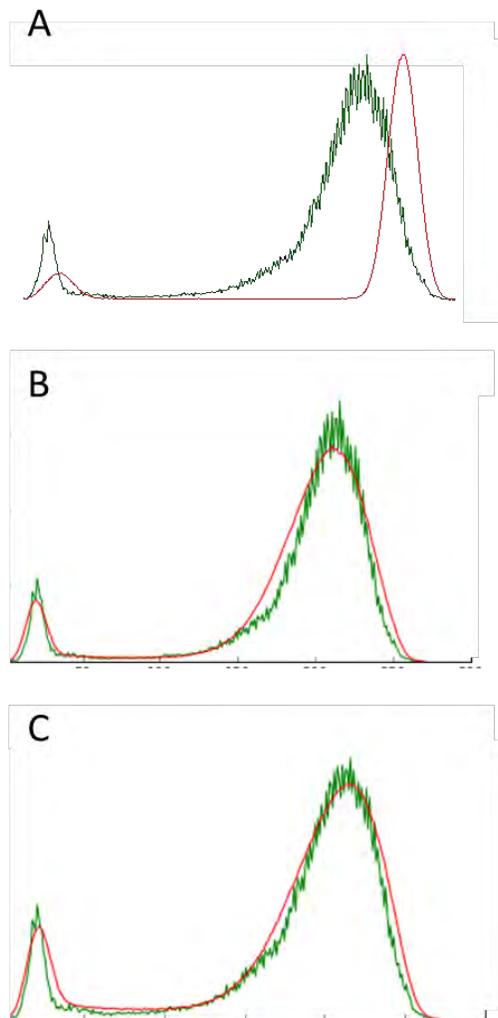


Figura 26 Ejemplo del resultado de un ajuste de un histograma simulado (rojo) a un histograma experimental (verde). Considerando: A) Un estado cerrado; B) Dos estados cerrados; C) Tres estados cerrados.

Sin embargo, aún debe trabajarse más en el programa, para poder obtener resultados más precisos en la determinación de las constantes de velocidad. A pesar de que no se cuenta aún con este análisis, parece que será una buena herramienta para caracterizar una posible relación entre la dependencia de voltaje y el tipo de ion permeante.

## Discusión

Para explorar la permeabilidad del canal TRPV1 a diferentes iones se realizaron registros de corrientes macroscópicas, con la idea de que, si la permeación de diferentes iones está involucrada en el comportamiento del canal y su dependencia de voltaje, al variar el tipo de ion que permea por el canal, se observaría un cambio evidente en los registros de corriente.

Con el registro de corrientes macroscópicas, variando el tipo de ion, podemos observar que, con los iones de  $K^+$ ,  $NH_4^+$  y  $Cs^+$  la corriente saliente es más grande que con  $Na^+$ , mientras que, con  $Li^+$ ,  $Rb^+$  y  $CH_3NH_3^+$ , la corriente saliente es más pequeña comparándola contra  $Na^+$ . Con respecto a la corriente entrante se vio que no se modifica con la mayoría de los iones, y solo existen cambios en el caso de  $Cs^+$  donde puede observarse que incrementa su amplitud y con el ion  $Rb^+$  donde disminuye con respecto a la de  $Na^+$ .

La permeabilidad a algunos de estos iones para TRPV1 se había reportado anteriormente (Caterina et al., 1997a; Samways and Egan, 2011b). Sin embargo, como puede observarse en la figura 5, se había reportado que la corriente saliente en este canal al permear  $K^+$  o  $Cs^+$  era menor que con  $Na^+$  como el ion permeante, resultado que contrasta con los datos obtenidos en este trabajo, lo cual puede explicarse, porque en los experimentos realizados por Caterina et al., la comparación entre la corriente con diferentes iones se realizó mediante experimentos no relacionados, es decir se probó la permeabilidad de cada ion en parches separados. Mientras que en este trabajo se realizaron todos los experimentos, tomando primero la permeabilidad del canal con  $Na^+$  y después intercambiando este ion en la cara intracelular del mismo parche, lo cual nos permite tener la permeabilidad de  $Na^+$  como referencia para todos los iones.

Respecto a la amplitud de la corriente cabe resaltar que el rubidio es el único ion que disminuye la corriente entrante del canal, la cual en principio es ocasionada en su totalidad por sodio extracelular, lo cual podría indicar que el Rb esté actuando

como un bloqueador permanente o un modulador del gating. Acerca de la permeabilidad de rubidio en el canal TRPV1, no se ha reportado nada, solo se ha mencionado que este ion puede atravesar la membrana de células que expresan el canal TRPV1 (Zicha et al., 2013), y esto se ha hecho a través de técnicas de cuantificación de él ion en la solución extracelular y después del lisado de las células.

Además, con el registro de corrientes macroscópicas se pudo medir el potencial de reversión, el cual es igual para todos los iones, lo que indica que el canal no está seleccionando entre ninguno de estos, tal como se había reportado (Caterina et al., 1997a).

En lo que respecta al cálculo de la conductancia, puede observarse en las gráficas de cada ion, que la conductancia a voltajes positivos es mayor con los iones  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Cs^+$ , con los dos últimos también es mayor a voltajes negativos, mientras que disminuye tanto a voltajes positivos como negativos con los iones  $Li^+$ ,  $Rb^+$  y  $CH_3NH_3^+$ . Lo cual en principio nos indica que la permeación de estos iones es distinta, y esto puede deberse en principio, a dos posibilidades: que los diferentes iones esten interactuando de manera distinta con el poro del canal, quizás permitiendo que tenga una mayor o menor probabilidad de apertura o que la cantidad de iones que permean por unidad de tiempo sea mayor ante el mismo estímulo.

Como ya habíamos mencionado, parece ser que el canal no esta seleccionando entre los diferentes iones (el potencial de reversión es igual para todos los iones). Sin embargo, la conductancia si varía, esto podría explicarse debido a que el paso del ion puede depender de la electrostática del poro y la interacción de esta con el ion, siendo que una interacción muy fuerte, podría disminuir la conductancia del ion y en una interacción débil la conductancia sería mayor, aun si el canal no tuviera selectividad para los diferentes iones.

Con el ajuste de una función Boltzman a las graficas de conductancia, podemos calcular la  $v_{1/2}$  y la carga aparente que se mueven por el poro del canal. Como puede observarse en la tabla 1. El único ion con el que la  $v_{1/2}$  varia drasticamente es con

Li, que resulta ser el ion mas pequeño de los que fueron probados, al ser un ion pequeño interactua fuertemente con el poro del canal y esto parece afectar la voltaje dependencia de TRPV1 ya que la carga aparente que fue calculada con el ajuste de una funcion Boltzmann a la conductancia, muestra un incremento cuando el ion permeante es  $\text{Li}^+$  lo cual sugiere que este ion se encuentra cambiando la dependencia de voltaje en el poro del canal.

Los resultados indican que con los registros de corriente macroscopica no es posible dilucidar la existencia de un componente relacionado con la interacción del ion que permea en el canal y la dependencia de voltaje del mismo, exceptuando los experimentos donde el  $\text{Li}^+$  era el ion permeante. Sin embargo, el registro de estas corrientes nos aportaron información acerca de como la corriente y la conductancia del canal varian dependiendo del ion permeante.

Para investigar si las variaciones en la corriente y conductancia, observadas en el registro de corrientes macroscópicas, se deben a que los iones permean menos o más, a través del canal o a que el ion cambie la probabilidad de apertura, lo cual podría indicar un efecto en la compuerta; se realizaron registros de corriente unitaria variando el tipo de ion que permea por el canal.

Los resultados de los registros de corriente unitaria muestran que prácticamente todos los iones producen una corriente mayor que la de  $\text{Na}^+$  en cada parche, exceptuando a los iones de litio y metilamonio, que representan al ion más pequeño y al más grande, respectivamente.

Si bien, este comportamiento es similar a lo observado en registro de corrientes macroscópicas, es de destacarse, que el ion de rubidio presenta una mayor corriente unitaria respecto al  $\text{Na}^+$ , mientras que en corrientes macroscópicas observábamos menor corriente con  $\text{Rb}^+$  respecto a  $\text{Na}^+$ . Esto es concordante con los cálculos de la probabilidad de apertura, mostrados en la tabla 2, donde es claro que el ion rubidio disminuye la probabilidad de apertura del canal de forma considerable, explicando porque, a pesar de registrarse una corriente unitaria mayor con rubidio, en registros de corriente macroscópica la corriente parece ser menor.

Con respecto a la probabilidad de apertura del canal con los diferentes iones, además del  $Rb^+$ , el ion  $NH_4^+$  también disminuye la probabilidad de apertura del canal, este resultado puede estar indicando que estos iones de un tamaño mayor, respecto a amonio, litio y potasio, estén interactuando con el filtro selector y estén involucrados en el comportamiento de la compuerta del canal. Sin embargo, hasta este punto no es posible demostrar que esta interacción esté relacionada a la dependencia de voltaje que presenta TRPV1.

Además, con los resultados obtenidos del registro de corrientes unitarias, se logró obtener una secuencia de permeabilidad relativa para el canal TRPV1, la cual fue calculada como el cociente entre la corriente del ion  $X^+$  y la corriente con  $Na^+$  de cada parche. La secuencia fue comparada con las secuencias teóricas de Eisenman, las cuales se han utilizado para explorar la permeabilidad de distintos canales.

En este caso, como se muestra en la figura 21, la secuencia de permeabilidad calculada en este trabajo se relaciona bien con la secuencia I propuesta por Eisenman, donde la permeabilidad a cationes grandes se ve favorecida. Estos resultados contrastan con lo reportado en la literatura donde a través de estudios enfocados en la permeabilidad de  $Ca^+$  han sugerido que la secuencia de permeabilidad para TRPV1 es la XI propuesta por Eisenman (Owsianik et al., 2006), o por la secuencia que puede inferirse del estudio de Samways et al., en donde la permeabilidad del canal correspondería con las primeras secuencias propuestas por Eisenman.

Sin embargo, estas diferencias, pueden deberse a que, nunca se había hecho un estudio experimental de la permeabilidad de TRPV1, y dichos estudios la abordan de manera secundaria, los experimentos son independientes, lo cual no contempla la variabilidad en el comportamiento del canal y, por último, solo se contemplan tres o cuatro iones, lo cual no caracteriza una secuencia específica de la permeabilidad de TRPV1, por lo que la secuencia de permeabilidad propuesta en este trabajo es la más completa hasta el momento para este canal.

Como ya se mencionó, el canal TRPV1 es activado por distintos estímulos, y se ha demostrado que existen cambios conformacionales en la parte inferior del canal que en principio responde a agonistas como la capsaicina. Sin embargo, a pesar de no existir evidencia clara de la existencia de una segunda compuerta, estudios en los que se han realizado mutaciones puntuales en el poro del canal las cuales sugieren que el filtro de selectividad es importante para la activación del canal (Patapoutian et al., 2010). Siguiendo este postulado, el filtro de selectividad podría tener cambios conformacionales que expliquen el voltaje dependencia observada, al variar el ion permeante en corrientes macroscópicas y amplitud de corriente unitaria.

Para tratar de explorar la relación entre el ion permeante y la compuerta del canal, partimos de la hipótesis de la existencia de una segunda compuerta, localizada en el filtro selector, la cual puede o no, tener un componente dependiente de voltaje.

Como puede observarse en los registros de canal unitario, durante el estado abierto del canal, existen una serie de fluctuaciones, que, al momento de realizar el histograma con registros a diferentes voltajes, se reflejan en una asimetría en los mismos, mostrado en la figura 23, la cual no está presente en histogramas de todos los puntos durante el estado cerrado del canal; por lo que la cola formada en uno de los lados del histograma describe un fenómeno propio del canal y no se refieren a inestabilidades en la membrana.

También se puede notar que la corriente a potenciales negativos es pequeña con relación a potenciales positivos, esta asimetría en la corriente puede deberse a que a potenciales negativos los iones permeen más lento, debido a una asimetría en los sitios de unión en el canal, o puede deberse a que existan transiciones muy rápidas entre el estado abierto y cerrado del canal, que no alcancen a ser resueltas en los registros y por ello, la corriente del canal se vea atenuada.

En otros estudios, para estudiar mecanismos que no pueden ser observados en los registros electrofisiológicos debido a su velocidad, se ha utilizado el ajuste de funciones a los histogramas de todos los puntos de registros de corriente unitaria, como herramienta para explicar los componentes rápidos de dichos mecanismos. Un ejemplo de esto es el ajuste de la distribución beta para el estudio de

bloqueadores rápidos de canales iónicos (Jara-Oseguera et al., 2008). Sin embargo, en este trabajo, debido al comportamiento de las fluctuaciones de la corriente unitaria, ha sido necesario diseñar un programa que se ajuste las necesidades del experimento.

El programa que ha sido desarrollado en el laboratorio, parece que podrá ayudarnos a resolver la existencia de variaciones rápidas entre un estado abierto y cerrado del canal, proporcionándonos la probabilidad por unidad de tiempo de que ocurra una transición entre un estado y otro, al realizar el cálculo de dichas probabilidades, para los histogramas experimentales que fueron obtenidos del registro de corriente con diferentes iones y a diferentes voltajes, podremos dilucidar la existencia de un componente que pueda relacionar las interacciones del ion permeante y la dependencia de voltaje del canal.

## Conclusiones

En este trabajo exploramos la permeabilidad de TRPV1 a diferentes iones y con ello se logró caracterizar una secuencia de permeabilidad para el canal TRPV1, de la cual no se tenía registro.

Con el registro de corrientes macroscópicas variando el tipo de ion que permea por el canal, observamos que la corriente saliente varia en todos los casos, es mayor con:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$  y  $\text{K}^+$  ; y menor con  $\text{Li}^+$  ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{CH}_3\text{NH}_3^+$  . En particular, la corriente entrante, que en principio se debe a la permeacion de  $\text{Na}^+$  disminuye con  $\text{Rb}^+$  lo que puede indicar que este ion este actuando como un bloqueador permeante.

Los iones rubidio y amonio, disminuyen la probabilidad de apertura del canal, pero aumentan la conductancia unitaria, lo cual podría indicar un efecto en la compuerta del canal.

El litio es el único ion que cambia la voltaje dependencia del canal, al ser un ion pequeño tiene mayor interacción con el poro del canal, por lo que el análisis detallado del efecto de este ion podría ayudar a entender mejor la voltaje dependencia de TRPV1.

Los histogramas de amplitudes a voltajes altos presentan una asimetría al ser comparados con los histogramas a voltajes más bajos y esta asimetría también varía dependiendo del tipo de ion permeante, por lo que, el análisis de estos resultados podría ayudarnos a encontrar la relación entre el ion permeante y la compuerta del canal.

## **Perspectivas**

Para poder dilucidar la existencia de un componente dependiente de voltaje relacionado a la compuerta del canal, es necesario refinar el análisis de los registros de canal unitario, con el diseño del programa en lenguaje Python se está muy cerca de lograr el ajuste a los datos experimentales, lo cual nos permitirá el cálculo de las constantes de velocidad en el paso de un estado a otro, con las que podremos determinar la existencia de un componente dependiente de voltaje.

Además, la realización de mutantes puntuales dentro del poro, podría ayudar (a través de su registro electrofisiológico, con los diferentes iones probados en este trabajo y su posterior análisis) a esclarecer la existencia de una segunda compuerta localizada en el poro del canal.

## Bibliografía

Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., and Julius, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal mechanisms of activation. *Nature* 504, 113–118.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997a). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997b). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.

DorothyM Kim, JasonG McCoy, and CrinaM Nimigean (2015). Ion Selectivity and Conductance. In *Handbook of Ion Channels*, (CRC Press), pp. 13–23.

Fanjul, M.L., and Hiriart, M. (1998). *Biología funcional de los animales (Siglo XXI)*.

Flockerzi, V. (2007). An Introduction on TRP Channels. In *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 1–19.

Hardie, R.C., and Minke, B. (1993). Novel Ca<sup>2+</sup> channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Trends Neurosci.* 16, 371–376.

Hill, R.W., Wyse, G.A., and Anderson, M. (2006). *Fisiología animal (Ed. Médica Panamericana)*.

Islas, L.D. (2016). Functional diversity of potassium channel voltage-sensing domains. *Channels Austin Tex* 10, 202–213.

Jara-Oseguera, A., Llorente, I., Rosenbaum, T., and Islas, L.D. (2008). Properties of the inner pore region of TRPV1 channels revealed by block with quaternary ammoniums. *J. Gen. Physiol.* 132, 547–562.

Jara-Oseguera, A., Nieto-Posadas, A., Szallasi, A., Islas, L.D., and Rosenbaum, T. (2010). Molecular Mechanisms of TRPV1 Channel Activation. *Open Pain J.* 3, 68–81.

Jara-Oseguera, A., Bae, C., and Swartz, K.J. An external sodium ion binding site controls allosteric gating in TRPV1 channels. *eLife* 5.

Julius, D., Cao, E., Liao, M., and Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107.

Liman, E.R., and Hess, P. (1991). Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K<sup>+</sup> channel. *Nature* 353, 752–756.

Marchesi, A., Mazzolini, M., and Torre, V. (2012). Gating of cyclic nucleotide-gated channels is voltage dependent. *Nat. Commun.* 3, 973.

Miceli, F., Soldovieri, M.V., Ambrosino, P., De Maria, M., Manocchio, L., Medoro, A., and Tagliatela, M. (2015). Molecular pathophysiology and pharmacology of the voltage-sensing module of neuronal ion channels. *Front. Cell. Neurosci.* 9.

Nilius, B., and Flockerzi, V. (2014). *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels* (Springer Science & Business).

Owsianik, G., Talavera Perez, K., Voets, T., and Nilius, B. (2006). Permeation and Selectivity of TRP Channels.

Patapoutian, A., Bursulaya, B., Grandl, J., Petrus, M., Bandell, M., Kim, S.E., and Uzzell, V. (2010). Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nat. Neurosci.* 13, 708.

Pingle, S.C., Matta, J.A., and Ahern, G.P. (2007). Capsaicin Receptor: TRPV1 A Promiscuous TRP Channel. In *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 155–171.

Salazar, H., Jara-Oseguera, A., and Rosenbaum, T. (2009a). [The TRPV1 channel as a target for the treatment of pain]. *Rev. Neurol.* 48, 357–364.

Salazar, H., Jara-Oseguera, A., Hernández-García, E., Llorente, I., Arias-Olguín, I.I., Soriano-García, M., Islas, L.D., and Rosenbaum, T. (2009b). Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 704–710.

Samways, D.S.K., and Egan, T.M. (2011a). Calcium-dependent decrease in the single-channel conductance of TRPV1. *Pflugers Arch.* 462, 681–691.

Samways, D.S.K., and Egan, T.M. (2011b). Calcium-dependent decrease in the single-channel conductance of TRPV1. *Pflugers Arch.* 462, 681–691.

Schewe, M., Nematian-Ardestani, E., Sun, H., Musinszki, M., Cordeiro, S., Bucci, G., de Groot, B.L., Tucker, S.J., Rapedius, M., and Baukrowitz, T. (2016). A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K<sub>2</sub>P K(+) Channels. *Cell* 164, 937–949.

Steinberg, X., Lespay-Rebolledo, C., and Brauchi, S. (2014). A structural view of ligand-dependent activation in thermoTRP channels. *Front. Physiol.* 5.

Swartz, K.J. (2008). Sensing voltage across lipid membranes. *Nature* 456, 891–897.

Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417.

Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* 251, 939–942.

Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2004). The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. *Sci. Signal.* 2004, re15.

Zicha, S., Radresa, O., Laplante, P., Morton, M., Jones, K., Main, M., Trivedi, S., Julien, R.P., Griffin, A., Labrecque, J., et al. (2013). Novel Methodology to Identify TRPV1 Antagonists Independent of Capsaicin Activation. *J. Biomol. Screen.* 18, 544–555.