



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

“MODULADORES DE LA ACTIVIDAD DE CANALES IÓNICOS TRP”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ana Elena López Romero

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Mauricio Díaz Muñoz  
[Instituto de Neurobiología, UNAM](#)

Dr. Francisco Fernández de Miguel  
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Junio, 2019



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**

Mi más grande agradecimiento para la Dra. Tamara Rosenbaum por permitirme una vez más ser parte de su grupo de investigación, por su tiempo y atención que nunca escatimó para resolver mis dudas y trabajar conmigo, por sus enseñanzas y brindarme las mejores herramientas para formarme como científica.

A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro, gracias por su apoyo, sus consejos y por su disposición al final del día para discutir y compartir ideas para mejorar los experimentos.

A la Biól. Alejandra Llorente Gil gracias por todo el apoyo técnico durante estos años, por la realización de las mutantes utilizadas en esta tesis, por enseñarme la parte de biología molecular y por siempre estar dispuesta a escuchar y ayudar.

Al Dr. León Islas Suárez gracias por su tiempo y paciencia para enseñarme a realizar el análisis de los canales únicos.

A Félix Sierra, gracias por el apoyo técnico y los consejos.

A mis compañeros del laboratorio BL-303, a los que estuvieron y a los que están, gracias por su apoyo, las risas, su compañía y su ayuda. Especialmente al Biól. Alan Medina por su colaboración y compañía durante los experimentos.

A los miembros de mi comité tutorial; Dr. Francisco Fernández de Miguel y Dr. Mauricio Díaz Muñoz, gracias por sus comentarios y sugerencias que me ayudaron durante la realización de mi tesis.

A los miembros del jurado de mi examen profesional: Dra. Marcia Hiriart, Dr. Arturo Hernández, Dr. Takuya Nishigaki, Dra. Stéphanie Thebault y Dr. Juan Carlos Gómora, gracias por sus observaciones y correcciones que mejoraron enormemente mi escrito.

A mis padres: Catalina y Luis Alberto, gracias por su apoyo, paciencia y cariño inagotables. Gracias por todo el esfuerzo que han hecho para que yo pueda lograr esto. En particular, a mi madre le agradezco su ayuda y consejos en la redacción de mi tesis.

A mis hermanos, gracias porque sin esforzarse o sin saberlo hacen mis días mejores.

A David, gracias por compartir conmigo los mejores momentos en estos años, y por estar cerca durante los peores. También por escucharme y aconsejarme en mi proyecto.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el proyecto **A1-S-8760**, otorgado a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir.

Asimismo, esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, con clave **IN200717**. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida para “Maestría/Obtención de Grado”.

Agradezco al CONACyT por la beca **464275** que se me otorgó con el número de becario 620365, para la realización de la maestría en el periodo del 1 de febrero de 2017 hasta el 31 de enero del 2019.

# Índice

	1
Resumen.....	
1. Introducción y antecedentes	
1.1. Los canales iónicos y la excitabilidad celular.....	2
1.2. Los canales iónicos de la superfamilia TRP.....	3
1.3. El canal iónico TRPV4: Estructura, expresión y función .....	5
1.4. La regulación endógena de la actividad del TRPV4 .....	8
1.5. Lisofosfolípidos y los canales TRP .....	10
2. Hipótesis .....	15
3. Objetivo General .....	15
4. Objetivos Particulares .....	15
5. Metodología	
5.1. Cultivo celular y transfección transitoria de las células HEK293.....	16
5.2. Electrofisiología .....	16
5.3. Experimentos de canal único.....	18
5.4. Mutagénesis .....	19
5.5. Análisis estadístico .....	21
6. Resultados	
6.1. La rectificación del canal TRPV4 depende de la presencia de calcio extracelular en la configuración de parche escindido .....	22
6.2. El LPA como agonista del canal TRPV4 .....	27
6.3. El LPA 18:1 actúa directamente sobre el canal hTRPV4 .....	30
6.4. El canal hTRPV4-R746K es activado por LPA .....	34
6.5. Efectos del LPA y del LPC en canales TRPV4 de humano que simulan mutaciones reportadas en bases de polimorfismos de un solo nucleótido.....	35
6.6. El LPA no modifica la conductancia de hTRPV4, pero la LPC la disminuye.....	38
6.7. Análisis de cinética de canales únicos .....	40
7. Discusión .....	42
8. Conclusiones .....	49
9. Bibliografía .....	50

## Abreviaciones

**2-AG** 2-Araquidonoilglicerol

**AA** Ácido araquidónico

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ARD** Repetición del dominio de anquirinas

**ATX** Autotaxina

**BrP-LPA** Bromometileno fosfonato LPA

**BSA** Albúmina de suero bovino

**CaM** Calmodulina

**cAMP** Adenosín monofosfato cíclico

**Cryo-EM** Criomicroscopía electrónica

**DMEM** Medio de cultivo, por sus siglas en inglés para *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DMSO** Dimetil sulfóxido

**EC<sub>50</sub>** Concentración efectiva media máxima.

**EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético

**EET** Ácido epoxieicosatrienoico, por sus siglas en inglés para *Epoxyeicosatrienoic acid*

**EGFP** Proteína verde fluorescente mejorada, por sus siglas en inglés para *Enhanced green fluorescent protein*

**g<sub>i</sub>** Conductancia unitaria

**GPCR** Receptor acoplado a proteínas G por sus siglas en inglés para *G protein-coupled receptors*

**HEK293** Línea celular de riñón de embrión de humano, por sus siglas en inglés para *Human embryonic kidney*

**K<sub>D</sub>** aparente Constante de disociación aparente

**LPA** Ácido lisofosfatídico 18:1, por sus siglas en inglés para *Lysophosphatidic acid*

**LPC** Lisofosfatidilcolina 18:1, por sus siglas en inglés para *Lysophosphatidylcholine*

**n<sub>H</sub>** Número de Hill

**pA** Pico-Amperes

**PA** Ácido fosfatídico, por sus siglas en inglés para *Phosphatidic acid*

**PC** Fosfocolina, por sus siglas en inglés para *Phosphocholine*

**PCR** Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés para *Polymerase chain reaction*

**Po** Probabilidad de apertura

**pS** Pico-Siemens

**PIP<sub>2</sub>** Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, por sus siglas en inglés para *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

**PKA** Proteína Cinasa A, por sus siglas en inglés para *Protein kinase A*

**PLA1 y 2** Fosfolipasas A1 y A2, por sus siglas en inglés para *Phospholipase*

**PLD** Fosfolipasa D, por sus siglas en inglés para *Phospholipase D*

**PUFA** Ácidos grasos poliinsaturados, por sus siglas en inglés para *Polyunsaturated fatty acids*

**TRP** Receptor del potencial transitorio por sus siglas en inglés para *Transient receptor potential*

**TRPV1** Receptor del potencial transitorio vaniloide 1

**TRPV4** Receptor del potencial transitorio vaniloide 4

## Resumen

El canal catiónico TRPV4 puede ser activado por condiciones hipo osmóticas, temperaturas alrededor de 27°C y algunos compuestos de origen vegetal. Sin embargo, se conocen pocos compuestos endógenos capaces de activarlo.

El ácido lisofosfatídico (LPA) y su precursor la lisofosfatidilcolina (LPC), anteriormente han sido reportados como agonistas de canales iónicos. Específicamente, el LPA fue reportado por nuestro grupo de trabajo como un agonista que interactúa con una lisina en la región carboxilo terminal del canal TRPV1.

En este trabajo se demuestra que, tanto el LPA como el LPC, interactúan con una arginina en la posición 746 del carboxilo terminal del canal TRPV4 para producir su activación. A nivel de canal unitario, el LPA no es capaz de promover una probabilidad de apertura máxima como la que se obtiene con el agonista GSK1016790A y la amplitud de la corriente unitaria se mantiene similar con ambos compuestos. Por su parte, la LPC promueve una probabilidad de apertura alta pero promueve una conductancia del canal aproximadamente 50% menor a la observada con GSK1016790A.

La disminución en la conductancia observada durante la activación con la LPC sugiere que este agonista promueve un estado conformacional distinto, lo cual es un fenómeno similar observado en TRPV1 pero con LPA.

## 1. Introducción y antecedentes

### 1.1 Los canales iónicos y la excitabilidad celular

Las células de todos los organismos poseen una membrana plasmática compuesta por fosfolípidos que le confieren hidrofobicidad y la capacidad de separar el medio extracelular del intracelular. En consecuencia, las membranas biológicas funcionan como barreras semipermeables que no podrían permitir el paso de moléculas grandes, de moléculas hidrofílicas o con carga si no fuera por la presencia de cierto tipo de proteínas transmembranales (Alberts *et al.*, 2002).

En particular, los iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$  no pueden atravesar la membrana por difusión debido a que poseen carga. Esto quiere decir que como la membrana separa dos medios con carga, se genera un voltaje, que es llamado «potencial de reposo o de membrana». Este voltaje es empleado en algunos tipos celulares, como las neuronas y las células endocrinas, para establecer comunicación eléctrica con otras células y para llevar a cabo otras funciones intracelulares (Alberts *et al.*, 2002).

Las células excitables se comunican por medio de señales eléctricas y químicas. Tanto para que se genere el potencial de reposo como para que este cambie, es necesario que haya movimiento de iones a través de la membrana. Este transporte es llevado a cabo por proteínas transmembranales llamadas **canales iónicos**, que poseen un poro hidrofílico a través del cual se lleva a cabo el transporte los iones. Estas proteínas pueden ser altamente selectivas a un ion particular gracias a que poseen un filtro de selectividad en la entrada del poro que permite discriminarlos (Alberts *et al.*, 2002; Hille 2001).

El transporte de iones es de suma importancia para las células, aún para las que no son excitables. Los canales iónicos son moléculas con comportamiento estocástico y que exhiben alta flexibilidad estructural, ya que su poro es dinámico y capaz de abrirse o de cerrarse ante diferentes estímulos. Este proceso de apertura y cierre de los canales iónicos, llamado *gating*, es modulado por diversos estímulos como cambios en el voltaje membranal, el estrés mecánico de la membrana plasmática,

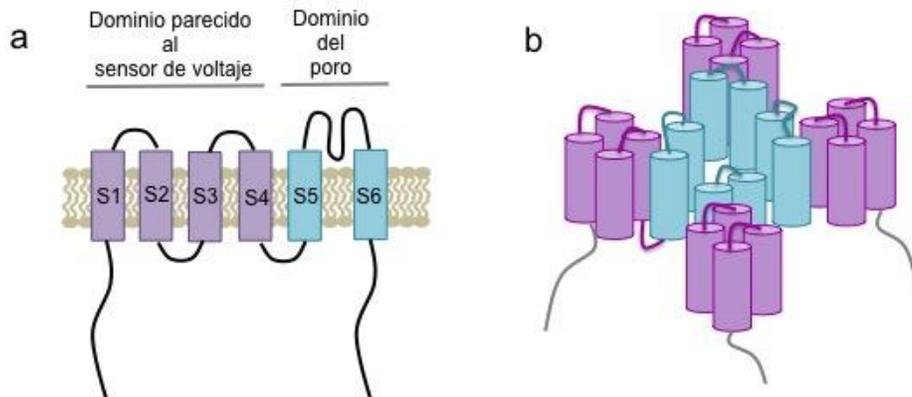
o bien por la unión de ligandos extra- o intra- celulares, dependiendo del tipo de canal iónico en cuestión (Alberts *et al.*, 2002; Hille, 2001).

En este trabajo, me he enfocado en el estudio de un canal miembro de la superfamilia de los Receptores del Potencial Transitorio (TRP) y la modulación de su activación por dos lisofosfolípidos con actividad biológica.

## **1.2 Los canales iónicos de la superfamilia TRP**

La familia de canales iónicos TRP fue descubierta en 1969 una mutante de *Drosophila melanogaster* con fenotipo de ceguera. En el electroretinograma de las moscas mutantes la respuesta a la luz era transitoria, en vez de sostenida, por lo cual a esta mutante se le denominó *trp* por sus siglas en inglés para «transient receptor potential» (Cosens & Maning, 1969). El gen fue clonado hasta 1989 y con ello se supo que codifica para una proteína transmembranal (Montell & Rubin, 1989).

Los TRP son una familia de canales catiónicos no selectivos formados por seis segmentos transmembranales ensamblados como homo- o hetero-tetrámeros. Cada subunidad está formada por seis segmentos transmembranales y sus extremos amino y carboxilo terminales son intracelulares. Entre el quinto y el sexto segmento se ubica un asa reentrante que, junto con dichos segmentos, forman al poro del canal. Los primeros cuatro segmentos, por su parte, forman un dominio parecido al sensor de voltaje típicamente encontrado en los canales de Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> sensibles a voltaje (Rosasco & Gordon, 2017).



**Figura 1. Representación de la estructura de los canales TRP.** **a)** Los miembros de la superfamilia de canales TRP son tetrámeros donde cada subunidad está constituida por seis pases transmembranales, los primeros cuatro segmentos (S1-S4) forman el dominio parecido al sensor de voltaje y los segmentos S5 y S6 forman el dominio del poro. **b)** Representación del tetrámero. El canal funcional es un hetero- u homo- tetrámero, en el que los dominios del poro de las cuatro subunidades forman en conjunto el poro central.

A pesar de guardar semejanza estructural, los canales TRP son diferentes entre sí en cuanto a los estímulos a los que responden, su selectividad iónica, los tejidos en los que se expresan y en las funciones que llevan a cabo (Pedersen et al., 2005).

Se han agrupado en diferentes subfamilias de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. Las subfamilias que se encuentran en mamíferos son: TRPC (Canónico), TRPV (Vaniloide), TRPA (Anquirina), TRPML (Mucolipina), TRPP (Policistina) y TRPM (Melastatina). En peces, nemátodos, insectos y anfibios también se encuentra la subfamilia TRPN (NOMPC, por sus siglas en inglés *no mechanoreceptor potential C*), que recibe su nombre por un canal activado por estímulos mecánicos en *Drosophila* (Startek et al., 2019; Pedersen et al., 2005).

Una característica importante de estos canales es que son polimodales, es decir que pueden ser activados por gran variedad de estímulos, tanto químicos como físicos. Entre estos estímulos a los que responden los TRP se encuentran cambios en la temperatura ambiental, presión osmótica, pH ácido o básico, radiación UV, así

como diversos ligandos intracelulares y extracelulares. Es así que los canales TRP son importantes receptores celulares ya que múltiples y variados estímulos convergen en su activación. Esto resulta en la transducción de dichos estímulos permitiendo que las células, y los organismos en los que se encuentran, puedan responder a ellos adecuadamente (Clapham, 2003; Taberner et al., 2015).

Varios canales iónicos responden a la presencia de lípidos exógenos o endógenos y los canales TRP no son la excepción, como se detallará más adelante (Hille *et al.*, 2015; Taberner *et al.*, 2015). Dado que la presente tesis se centra en el estudio del lisofosfolípidos sobre el canal TRPV4, a continuación, se detallan algunas características de este canal iónico y los antecedentes al trabajo.

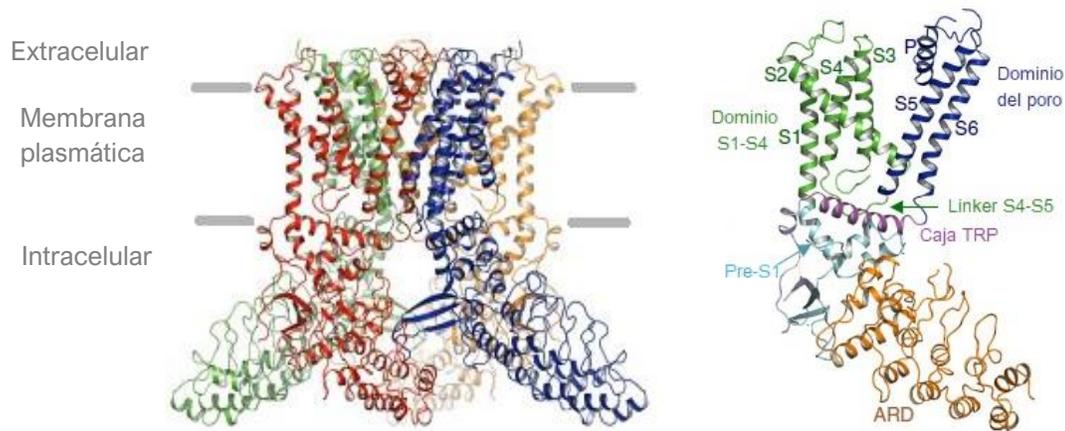
### **1.3 El canal iónico TRPV4: Estructura, expresión y función**

El TRPV4 (también conocido como VROAC, VRL-2, TRP12 u OTRPC4) es un canal catiónico no selectivo que es activado por estrés mecánico, condiciones hipo osmóticas (Strotmann *et al.*, 2000; Liedtke *et al.*, 2000), por temperatura (de ~24-27 °C) (Watanabe *et al.*, 2002a; Güler *et al.*, 2002) y por derivados del forbol (Watanabe *et al.*, 2002b). También es activado por sustancias que se encuentran en vegetales como el bisandrografólido que se encuentra en la planta *Andrographis paniculata* (Smith *et al.*, 2006) y la apigenina, una flavona presente en múltiples plantas (Ma *et al.*, 2012).

En 2018, Deng y colaboradores obtuvieron la estructura del canal TRPV4 de *Xenopus tropicalis* por medio de crio-microscopía electrónica (cryo-EM) (Figura 2). El canal funcional conserva la topología de otros canales TRP: se ensambla como tetrámero en el que cada subunidad está constituida por seis segmentos transmembranales (S1-S6); sus extremos carboxilo y amino terminales son citoplasmáticos, y el poro se forma por las subunidades S5-S6 junto con el asa reentrante que los conecta (Nilius & Voets, 2013).

En cada subunidad del TRPV4 destacan dominios característicos de los canales TRPV. En especial, el dominio o caja TRP (Figura 2) se encuentra en una posición

clave para provocar cambios conformacionales, ya que tiene contacto con el *linker* S4-S5 que comunica a los dominios S1-S4 y al poro, además de encontrarse cerca de los dominios transmembranales y citosólicos (Deng *et al.*, 2018).



**Figura 2. Estructura del canal TRPV4 de *Xenopus tropicalis* (PDB: 6BBJ).** A la izquierda se muestra el tetrámero de TRPV4. Cada subunidad se muestra con un color diferente. La separación entre las líneas grises representa el grosor de la membrana plasmática; se distinguen las hélices transmembranales y la región citoplasmática. A la derecha se muestra una sola subunidad del tetrámero. Se destacan el dominio S1-S4, el dominio del poro, el dominio de repetidos de anquirinas (ARD) y las hélices pre-S1, el *linker* S4-S5 y la caja TRP. Modificado de Deng *et al.*, 2018.

El TRPV4 se encuentra abundantemente en epitelios de los sistemas respiratorio, reproductivo y urinario, donde cumple con funciones de mecanotransducción y osmorregulación (Everaerts *et al.*, 2010; Garcia-Elias *et al.*, 2014; Pablo *et al.*, 2017). De igual manera se expresa en las células ciliadas de los mencionados sistemas (como tráquea, túbulos renales y trompas de Falopio) donde participa en el control de la frecuencia de batido ciliar (Andrade *et al.*, 2005; Lorenzo *et al.*, 2008)

En tipos celulares no ciliados, el TRPV4 participa principalmente en el control de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En el endotelio vascular regula la vascularización, en las células beta del páncreas donde contribuye en la citotoxicidad del péptido amiloide de los islotes (amilina) durante la diabetes tipo II,

dicho péptido se agrega en estructuras fibrilares que perturban mecánicamente a la membrana, lo cual activa al TRPV4 y, a su vez, se permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que finalmente induce la pérdida de las células beta (Casas et al., 2008). Asimismo, en osteoblastos y osteoclastos participa en la maduración y remodelación del esqueleto: contribuye a mantener los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares para la activación de factores de transcripción que inician la diferenciación en osteoclastos (Masuyama et al., 2008), y en condrocitos participa en la activación de Sox9 que promueve la condrogénesis (Muramatsu et al., 2007).

El TRPV4 también participa durante la nocicepción. En el sistema nervioso periférico, las neuronas del ganglio dorsal y del trigémino lo expresan, y en ellas participa en la detección de cambios osmóticos y en la nocicepción mecánica. En queratinocitos, actúa como generador de prurito histaminérgico y, posteriormente la señal se transduce a las neuronas sensoriales por algún mecanismo desconocido hasta el momento (Alessandri-Haber et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Chen et al., 2016; Moore et al., 2018).

El riñón es el órgano que expresa mayoritariamente al TRPV4, principalmente en los segmentos de la nefrona distal, es decir en los túbulos contorneado distal y en el túbulo colector. En estos segmentos, el canal forma parte del complejo mecanosensible, junto con el canal TRPP2, que al ser activado por los estímulos mecánicos inducidos por el flujo de la nefrona contribuye a aumentar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Tian et al., 2004; Berrout et al., 2012; Cabral et al., 2015).

A la fecha, se conocen algunas de las funciones fisiológicas que cumple el canal TRPV4 en los diferentes órganos en los que se expresa, pero se ha avanzado poco en el estudio e identificación de sus activadores, inhibidores y reguladores endógenos, así como de las relaciones que existen entre su estructura y su función. Por ende, en este proyecto se propone contribuir al conocimiento de las moléculas y los mecanismos de activación del canal TRPV4, por medio de herramientas biofísicas y de biología molecular. A continuación, se detalla la naturaleza de las pocas moléculas endógenas que se sabe que regulan al canal TRPV4.

#### 1.4 La regulación endógena de la actividad del TRPV4

Varios fosfolípidos bioactivos regulan la actividad de diversos canales iónicos, entre ellos destacan el colesterol, los metabolitos de las vías de la ciclooxigenasa y de la lipoxigenasa, fosfolípidos, lisofosfolípidos y ácidos grasos. Este campo de investigación es importante, especialmente para los miembros de la familia TRP, pues las moléculas lipídicas representan la mayoría de los reguladores endógenos conocidos para esta familia de proteínas (Hille *et al.*, 2015; Taberner *et al.*, 2015).

Nuestro laboratorio ha demostrado los efectos alostéricos de varias moléculas de este tipo sobre la actividad del canal TRPV1 (Morales-Lázaro *et al.*, 2013). Entre estas se encuentran el ácido oleico (Morales-Lázaro *et al.*, 2016), el colesterol (Picazo-Juárez *et al.*, 2011), el ácido lisofosfatídico (Nieto-Posadas *et al.*, 2012; Morales-Lázaro & Rosenbaum, 2015) y lisofosfolípidos estructuralmente semejantes a este último (Morales-Lázaro *et al.*, 2014). Incluso, se describió el papel de moléculas esteroideas derivadas de lípidos en la expresión del canal y su papel en el dolor (Ortiz-Rentería *et al.*, 2018).

Por su parte, como se mencionó anteriormente, se sabe poco acerca de las moléculas endógenas que regulan al canal TRPV4. Entre estas se encuentran las siguientes:

El fosfoinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) que se une al TRPV4 en dos diferentes sitios, cada uno con funciones distintas: Su unión al sitio 121-KRWRK-125 es necesaria para que el canal se active por temperatura y por hipotonicidad, mientras que su unión en el dominio de anquirinas en las argininas 269, 315 y 316 disminuye la actividad del canal (Takahashi *et al.*, 2014; García-Elías *et al.*, 2013, Fig. 3). De igual manera, el PIP<sub>2</sub> inhibe al TRPV4 en células endoteliales capilares del cerebro de ratón ya que, al hidrolizarse este lípido por vía de la fosfolipasa C (PLC), aumenta la actividad basal del canal (Harraz *et al.*, 2018, Fig. 3).

El ácido 5,6-epoxieicosatrienoico (5,6-EET), un metabolito del ácido araquidónico, activa al TRPV4 al unirse directamente en un sitio conformado por residuos en el *linker* S2-S3, S4 y el *linker* S4-S5. La lisina 535 es uno de los residuos que forman

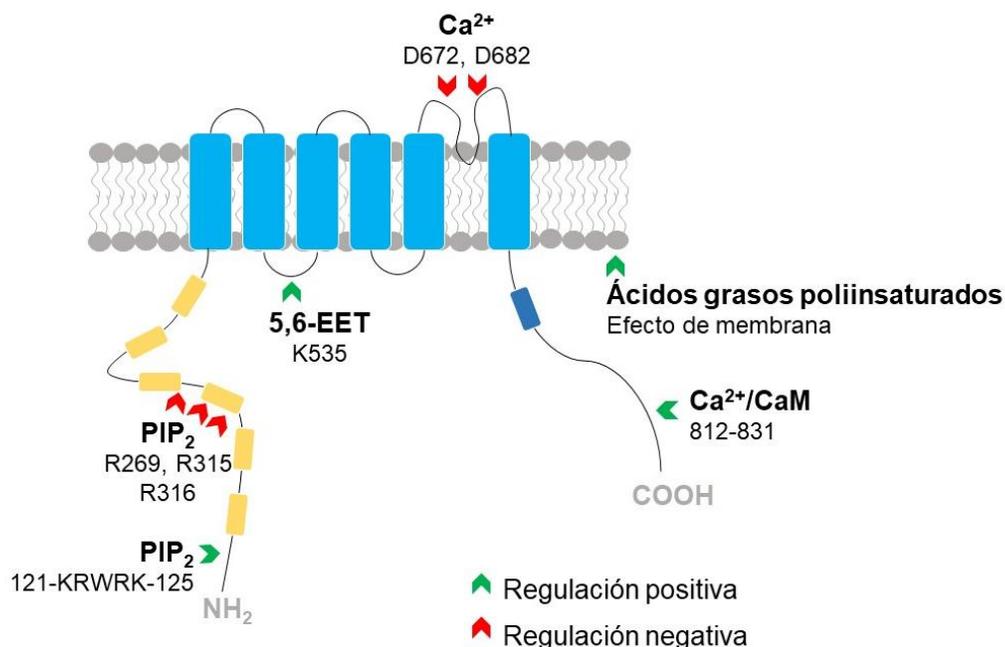
parte de este sitio, y al mutarse se pierde la unión del EET (Watanabe et al., 2003a; Berna-Erro et al., 2017, Fig. 3). También se ha demostrado que la activación por el ácido araquidónico (AA) es dependiente de la fosforilación de la serina 824 del canal por la proteína cinasa A (PKA) que permite que el AA acceda a su sitio de unión, posiblemente por un arreglo conformacional en la región carboxilo terminal (Cao et al., 2018).

Asimismo, el 5,6-EET actúa durante la activación por estrés mecánico de la membrana. La fosfolipasa 2 (PLA2) es una enzima sensible al estrés mecánico de la membrana que al activarse produce ácido araquidónico que después produce al 5,6-EET el cual, como recién fue mencionado, es un agonista directo del canal (Vriens et al., 2004; Startek et al., 2019)

Algunos otros agonistas activan al canal sin que exista una interacción directa con él, como ocurre con los ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3 (PUFA, por sus siglas en inglés), que activan al TRPV4 mediante la modificación de la fluidez de la membrana (Caires et al., 2017).

El TRPV4 es regulado fuertemente por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3). Por una parte, desde la cara extracelular, el  $\text{Ca}^{2+}$  bloquea al poro al unirse a los residuos D672 y D682 que se ubican en la entrada extracelular (Voets *et al.*, 2002). Desde la cara intracelular, el  $\text{Ca}^{2+}$  inactiva al canal (Watanabe *et al.*, 2003b) aunque también lo potencia a través de la calmodulina (CaM), una proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  y que posee un dominio de unión entre los sitios 812 y 831 del carboxilo terminal del TRPV4 (Strotmann *et al.*, 2003). El canal TRPV1 también es regulado por la CaM, pero al contrario que en el TRPV4, la CaM promueve la desensibilización del canal  $\text{Ca}^{2+}$  (Rosenbaum *et al.*, 2004).

Otros agonistas endógenos, cuyos mecanismos de acción se desconocen, son el endocannabinoide 2-Araquidonoilglicerol (2-AG) (Ho et al., 2015) y el pirofosfato de dimetilalilo, un intermediario de la ruta del mevalonato (Bang et al., 2012; García-Elías et al., 2014).



**Figura 3. Sitios de unión para algunos reguladores de la actividad del TRPV4.** Se muestran los segmentos transmembranales (azul cielo), los dominios de ARD (amarillo) y la caja TRP (azul marino), y los sitios descritos de interacción de algunos reguladores positivos o negativos del TRPV4 descritos en el texto. PIP<sub>2</sub> : Fosfoinositol 4,5-bifosfato, 5,6-EET: ácido 5,6-epoxieicosatrienoico, Ca<sup>2+</sup>/CaM: Calmodulina unida a calcio.

### 1.5 Lisofosfolípidos y los canales TRP

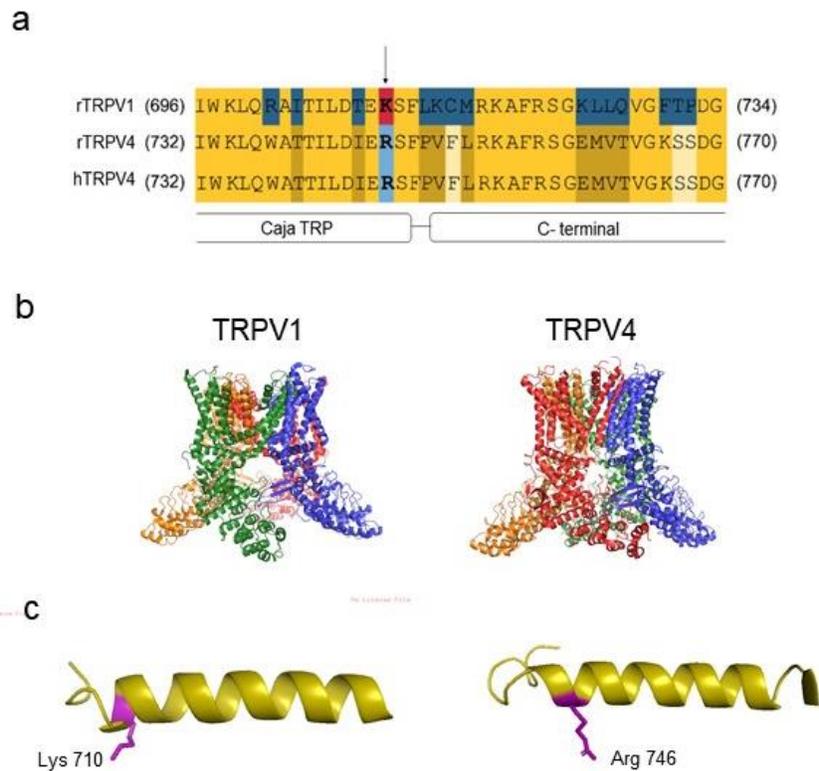
El ácido lisofosfatídico («LPA» por sus siglas en inglés), es un glicerofosfolípido implicado en numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Por ejemplo, participa en la proliferación y migración celular, en la extensión de neuritas y también contribuye en la generación y progresión del cáncer de hueso y durante enfermedades cardiovasculares, donde se ha visto que aumenta su concentración en las placas arteroescleróticas (Aikawa *et al.*, 2015).

Durante tres décadas, se pensó que el LPA actuaba exclusivamente a través de la activación de sus receptores acoplados a proteínas G (GPCR) llamados LPA<sub>1-6</sub>. Sin embargo, en nuestro laboratorio se describió que el LPA es capaz de unirse y activar directamente al TRPV1, determinando así que no actúa solo a través de los

receptores sino también a través de su interacción directa con canales iónicos (Aikawa *et al.*, 2015; Nieto-Posadas *et al.*, 2012; Hernández-Araiza *et al.*, 2018).

El TRPV1 fue clonado por el laboratorio de David Julius en 1997 y desde sus primeras descripciones se determinó su importante papel durante la transducción del dolor, pues es activado por estímulos nocivos como la capsaicina o altas temperaturas (Caterina *et al.*, 1997; Caterina *et al.*, 2000). Asimismo, el LPA se une al canal a través de la lisina 710 en su extremo carboxilo terminal proximal (en la caja TRP), activa al canal y esto ocasiona dolor. El LPA puede unirse con la proteína gracias a la carga negativa de su grupo fosfato, que puede interactuar con la lisina por su carga positiva (Nieto-Posadas *et al.*, 2012).

Los canales TRPV poseen una alta homología entre sus secuencias, para el caso del TRPV4, tiene una tasa de 60 % similitud/40 % identidad con el canal TRPV1 (Vriens *et al.*, 2007). Interesantemente, cuando realizamos el alineamiento de secuencias entre los canales TRPV1 y TRPV4, el sitio correspondiente a la lisina 710 en el TRPV4 es la arginina 746 (Fig. 4a, b y c), es decir, otro residuo con carga positiva, tanto en el canal de humano como en el de rata. Como la carga de este sitio permite la interacción con el lípido, entonces pensamos que también podría actuar como un agonista para el TRPV4.



**Figura 4. El residuo correspondiente a la lisina 710 del TRPV1 conserva la carga positiva en el TRPV4. a)** Alineamiento de secuencias del carboxilo terminal proximal de los canales TRPV1 de rata (rTRPV1, número de acceso en NCBI: NP\_114188), TRPV4 de rata (rTRPV4, número de acceso en NCBI: NP\_076460) y TRPV4 de humano (hTRPV4, número de acceso en NCBI: NP\_067638). Realizado con el programa Vector NTI. **b)** Estructuras de los canales TRPV1 (PDB: 3J5P) y TRPV4 (PDB: 6BBJ), cada subunidad se marca con un color diferente. **c)** Acercamiento de las cajas TRP de los canales TRPV1 y TRPV4. Se resalta en morado la lisina 710 para el TRPV1 y la arginina 746 del TRPV4.

El LPA puede ser producido intracelularmente, a partir del ácido fosfatídico (PA), al cual por vía de las fosfolipasas A1 y A2 (PLA1 y PLA2, respectivamente) se le elimina una cadena acilo, produciendo ácido lisofosfatídico (LPA). La fosfolipasa A1 (PLA1) y la fosfolipasa A2 (PLA2) liberan las cadenas acilo del ácido fosfatídico (PA) en las posiciones sn-1 o sn-2, respectivamente. Los ácidos grasos que se encuentran unidos en la posición sn-1 son principalmente saturados mientras que en la posición sn-2 son insaturados. Existen especies de LPA y de otros

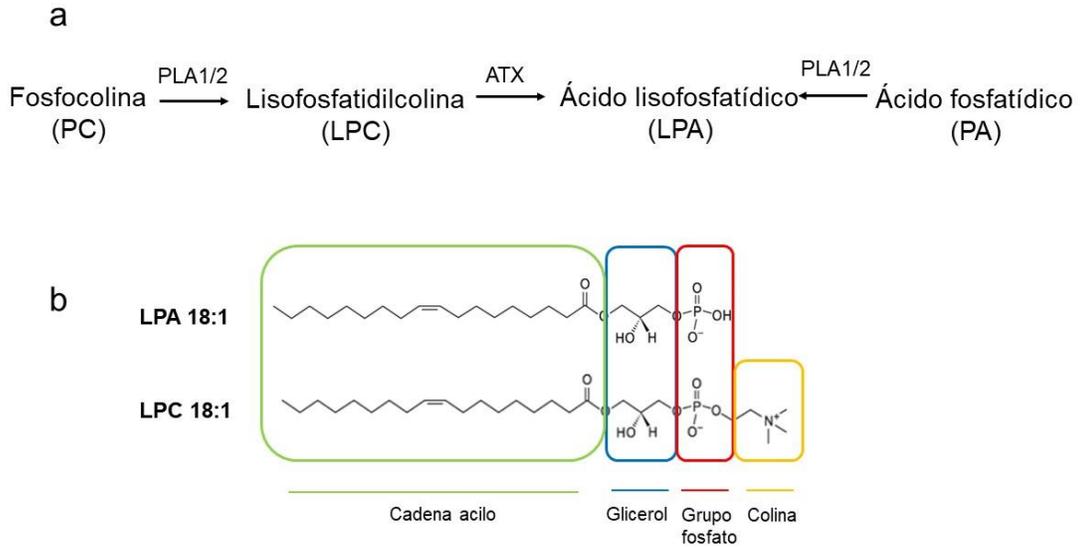
lisofosfolípidos tanto insaturadas como saturadas, lo cual sugiere que tanto la PLA1 como la PLA2 contribuyen durante la síntesis (Pagès et al., 2001; Aoki et al., 2008).

La vía extracelular involucra a la forma secretada de la fosfolipasa D (PLD), la autotaxina (ATX), que produce al LPA a partir de la lisofosfatidilcolina (LPC), que a su vez puede ser sintetizada a partir de la fosfocolina (PC) a través de fosfolipasas (Fig. 5a, Hernández-Araiza *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que la vía de producción de LPA a través de PLA1/2 ocurre principalmente en plaquetas y células cancerosas, mientras que en el plasma y suero sanguíneo predomina la producción a partir de otros lisofosfolípidos, es decir por la ATX (Aoki et al., 2008).

La LPC 18:1 es una de las especies de LPC más abundantes en el suero (Ojala *et al.*, 2007). Es otro lisofosfolípido capaz de regular la actividad de otros canales TRP como lo son el TRPM8, el TRPV2 y el TRPC5, aunque el mecanismo por el cual actúa sobre estos canales no ha sido determinado (Flemming *et al.*, 2006; Morales-Lázaro *et al.*, 2016). Particularmente, se demostró que la LPC no activa al canal TRPV1 (Canul-Sánchez *et al.*, 2018).

La LPC es un «zwitterion» porque posee un grupo colina con carga positiva unido al grupo fosfato, que le confiere su carga negativa. A excepción del grupo colina, estructuralmente, la LPC es similar al LPA (Fig. 5b). Por ello, en este estudio se decidió probar si estos dos lisofosfolípidos son capaces de activar al TRPV4 y si el sitio de unión es la arginina 746, que corresponde al sitio de unión del LPA en el canal TRPV1.



**Figura 5. Síntesis del LPA.** **a)** Representación simplificada de las vías de síntesis de los lisofosfolípidos. El LPA se puede sintetizar intracelularmente a partir del ácido fosfatídico (PA) por vía de las fosfolipasas A1 y A2 (PLA A1/A2), o a través de la lisofosfatidilcolina (LPC) como su precursora por acción de la autotaxina (ATX). La LPC se puede sintetizar de manera similar que el LPA a partir de la fosfocolina (PC) por vía PLA A1 y A2. **b)** Comparación de la estructura molecular entre el LPA 18:1 y la LPC 18:1. Modificado de Hernández-Araiza *et al.*, 2018.

## **2. Hipótesis**

La actividad del canal TRPV4 es regulada por LPA 18:1 y LPC 18:1 a través de su interacción directa con alguna región del canal.

## **3. Objetivo General**

Determinar si lisofosfolípidos como el LPA 18:1 y el LPC 18:1 pueden activar la actividad del canal TRPV4 y elucidar los mecanismos moleculares por medio de los cuales ocurre dicha regulación.

## **4. Objetivos Particulares**

- 1) Caracterizar los efectos del agonista sintético GSK1016790A y lisofosfolípidos sobre las propiedades biofísicas del canal TRPV4 a nivel de corriente macroscópica en la configuración de parche escindido en células HEK293.
- 2) Determinar si el mecanismo por medio del cual el LPA y LPC activa al canal TRPV4 es por interacción directa con la proteína.
- 3) Establecer los efectos de los lisofosfolípidos sobre el canal TRPV4 a nivel de corrientes unitarias.

## 5. Metodología

### 5.1. *Cultivo celular y transfección transitoria de las células HEK293*

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron en células de la línea HEK293 (Human Embryonic Kidney-293 cells) transfectadas transitoriamente con ADN que codificaba para el canal TRPV4 silvestre y para canales mutantes. Las células se cultivaron en la incubadora con 95 % O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, con medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal.

Las células utilizadas para registros electrofisiológicos fueron sembradas en cajas de Petri de 35 mm con cuadros de vidrio previamente tratados con poli-D-lisina y, después de 24 horas, fueron transfectadas con ADN del canal TRPV4 de humano fusionado con la proteína EGFP en el vector pEGFP que nos fue proporcionado por el Dr. Tim D. Plant (Universität: Philipps-Universität Marburg, Alemania). Para los experimentos de corrientes macroscópicas se transfectó 1 µg del ADN y 20 ng para los registros de corrientes unitarias. Se utilizó el JetPEI (3 µL, siguiendo las instrucciones del proveedor Polyplus Transfection) como agente de transfección. Las células fueron incubadas por 48 horas, tiempo en el cual se logró una expresión adecuada para los experimentos de electrofisiología. Las células que presentaron fluorescencia fueron las que se utilizaron para realizar los registros electrofisiológicos con el uso de un microscopio invertido con lámpara de epifluorescencia.

### 5.2. *Electrofisiología*

Se utilizó la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch-clamp* para el estudio de la actividad del canal TRPV4 (Hamill *et al.*, 1981). En particular, usamos las configuraciones de parche escindido en *inside-out* ya que permite aislar a los canales de los procesos que ocurren en las células, y controlar de forma más precisa las soluciones que entran en contacto con las caras intra o extracelular del canal.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (24 °C) y para las corrientes macroscópicas se utilizaron pipetas de borosilicato de 5 MΩ.

Para el TRPV1, trabajos del laboratorio han sugerido que la cadena acilo del LPA debe introducirse en la membrana y la cabeza fosfato debe de poder interactuar con el residuo positivamente cargado (Nieto-Posadas et al., 2012; Morales-Lázaro et al., 2014). Esto concuerda con tiempos más largos para la activación del canal. Por ende, las corrientes del TRPV4 fueron tomadas después de que se estabilizara la activación del canal (~3 min para LPA y LPC, ~1 min para GSK1016790A).

Para los experimentos de corrientes macroscópicas se aplicaron pulsos de -60 y +60 mV de 100 ms de duración o desde -120 mV hasta +120 mV en pasos de 10 mV por 100 ms para construir las gráficas de la corriente en función del voltaje. Se utilizó un filtro de paso bajo a 2 kHz y con una frecuencia de muestreo de 10 kHz con un amplificador EPC 10 (HEKA Elektronik).

Las soluciones utilizadas fueron:

**Solución 1)** 130 mM NaCl, 3 mM HEPES y 1 mM EDTA;

**Solución 2)** 130 mM NaCl, 3 mM HEPES y 1 mM CaCl<sub>2</sub>;

**Solución 3)** 130 mM NaCl, 3 mM HEPES y 5 mM CaCl<sub>2</sub>.

Cada una de estas soluciones se utilizó en experimentos específicos que serán mencionados en la sección de Resultados.

Las soluciones de reserva o «stock» de LPA (1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfato, Avanti Polar Lipids) y LPC (1-oleoil-2-hidroxi-glicero-3-fosfocolina, Sigma-Aldrich) fueron preparadas a una concentración de 10 mM en Dulbecco's Modified Eagle's Medium con L-glutamina (DMEM) + albúmina de suero bovino (BSA) 1 %. Se hicieron alícuotas del *stock* y éstas fueron congeladas y almacenadas a -70°C. Para los experimentos, una alícuota fue descongelada, incubada durante 1 hora a 37°C, agitada en *vórtex* y diluida a la concentración adecuada en la solución 1.

La solución *stock* del BrP-LPA (1-bromo-3-(S)-hidroxi-4-(palmitoiloxi) butil fosfonato, Echelon Biosciences) fue preparada a una concentración de 1 mM en agua y, de la misma manera que LPC y LPA, fue alicuotada, congelada y almacenada a -70 °C.

La solución *stock* de GSK1016790A (Sigma-Aldrich) fue preparada a una concentración de 15.25 mM en DMSO, alicuotada, congelada y almacenada a -20 °C. Para los experimentos, la alícuota del stock fue descongelada y preparada en la solución 1 a la concentración necesaria para cada experimento. Los experimentos controles sin GSK1016790A fueron realizados con soluciones que contenían la misma cantidad de DMSO que la solución con GSK1016790A.

El equipo para realizar los registros de electrofisiología consta de: un microscopio invertido (Nikon Eclipse T-S) con lámpara de epifluorescencia (Nikon Intensilight C-HGFI), un amplificador EPC10 (HEKA Elektronik), micromanipulador motorizado MP-225 (Sutter Instruments) y un sistema de recambio de soluciones RSC-200 (BioLogic, Science Instruments). Para obtener los registros se utilizó el programa Patchmaster (HEKA Instruments) y estos fueron analizados con Igor Pro (Wavemetrics Inc).

### 5.3. Experimentos de canal único

Para los experimentos de canal único se utilizaron pipetas de alta resistencia (>10 MΩ). Las células HEK293 fueron transfectadas con 20 ng del ADN del vector que contiene al canal TRPV4 de humano (hTRPV4) para aumentar la probabilidad de tomar un solo canal en el sello. Los registros se realizaron en la configuración de *inside-out* y se obtuvieron varios (entre 50-100) trazos a +60 mV con duración de entre 1 a 3 segundos. Las corrientes fueron filtradas a 2 kHz y con una frecuencia de muestreo de 50 kHz.

Los eventos de apertura del canal fueron determinados como aquellos eventos que atravesaran un umbral igual a la mitad de la amplitud de las corrientes unitarias, y fueron idealizados para su análisis con el programa IgorPro (Islas, 2015).

La probabilidad de apertura se calculó para cada pulso de voltaje como la suma del tiempo total que el canal permanecía abierto dividido entre la duración total del pulso.

La amplitud de la corriente se determinó con histogramas de la distribución de la amplitud de los eventos de apertura detectados y fueron ajustados a una distribución gaussiana (Colquhoun & Sigworth, 1985).

Para evaluar cuantitativamente las conductancias correspondientes a la activación del canal en presencia de los diferentes agonistas, se graficaron las amplitudes de cada evento detectado en función de su duración.

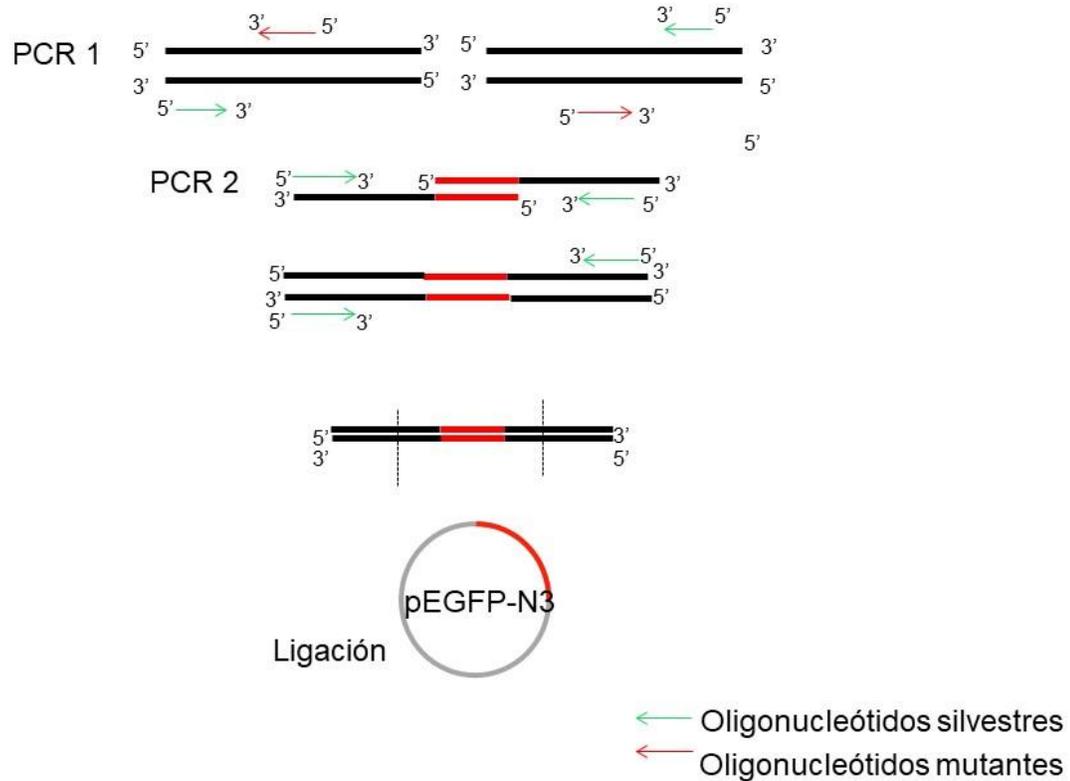
Los programas utilizados para todos los análisis de los canales únicos fueron proporcionados por el Dr. León Islas, Facultad de Medicina, UNAM.

#### 5.4. *Mutagénesis*

Se generaron mutantes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en dos pasos (Rosenbaum & Gordon, 2002). Brevemente: se identificó la secuencia de interés, se diseñaron oligonucleótidos que insertarán el cambio en la secuencia de aminoácidos, junto con un sitio de restricción nuevo y específico en la secuencia de ADN. En dos reacciones de PCR independientes, se utilizaron dos oligonucleótidos: uno que no portaba la mutación que delimita a la secuencia que se mutó junto con un sitio de restricción que se encuentra en la secuencia del canal, y un segundo que contenía la mutación y al nuevo sitio de restricción. El producto de ambas reacciones se utilizó para una tercera reacción de PCR en donde sólo se emplearon los oligonucleótidos silvestres y así se amplificó el ADN con la mutación. Finalmente, el *cassette* que porta la mutación se reintrodujo en el resto de la secuencia del canal silvestre. El ADN mutante se utilizó para transformar bacterias competentes y obtener suficiente material para los experimentos de electrofisiología.

Se decidió introducir mutaciones en el sitio R746 con base en un alineamiento de las secuencias (Vector NTI, Invitrogen) de los canales hTRPV4, rTRPV4 y rTRPV1,

ya que el sitio de interacción a LPA (K710) previamente descrito en rTRPV1 (Nieto-Posadas *et al.*, 2012) se conserva en el hTRPV4.



**Figura 6. Mutagénesis con PCR en dos pasos.** Los oligonucleótidos silvestres se representan en color verde y los que portan la mutación que se desea introducir en color rojo. Los silvestres delimitan la región que se desea mutar y contienen un nuevo sitio de restricción que permita diagnosticar la inserción de la mutación. En una primera reacción de PCR se inserta la mutación y en la segunda se amplifica el ADN mutante. El producto es cortado y ligado a un vector.

### 5.5. Análisis estadístico

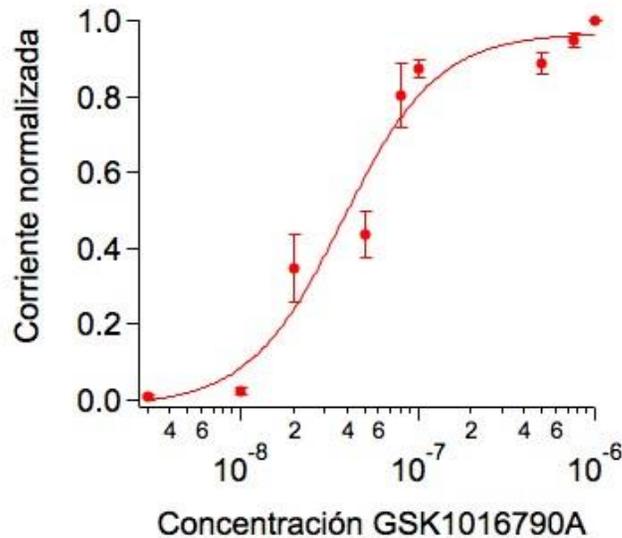
Los datos se analizaron con la prueba T de Student;  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  error estándar del promedio. Se realizaron histogramas de la distribución de los datos de cada uno de los grupos experimentales y se verificó que hubiera un ajuste a una distribución normal.

## 6. Resultados

### 6.1. La rectificación del canal TRPV4 depende de la presencia de calcio extracelular en la configuración de parche escindido

La mayoría de los estudios sobre la función del canal TRPV4 han sido realizados en la configuración de célula completa del *patch-clamp*. Sin embargo, con el fin de realizar un estudio más detallado de la actividad del canal, ha sido necesario aislarlo de su ambiente celular. Así, comenzamos por caracterizar la activación del canal TRPV4 por su agonista sintético GSK1016790A (Jin *et al.*, 2011), usando la configuración de parche escindido *inside-out*.

Primeramente, evaluamos la respuesta de activación del canal TRPV4 en función de la concentración de GSK1016790A usando parches de membrana escindidos en la configuración *inside-out*. El promedio de activación para cada concentración de GSK1016790A fue obtenido promediando los valores obtenidos en parches de membrana individuales para cada concentración usando una solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  (solución 1), tanto en el baño como en la pipeta. La corriente obtenida en determinada concentración a +100 mV para cada sello se normalizó con respecto a la corriente obtenida con una concentración saturante de 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A al mismo voltaje. Las concentraciones probadas para realizar la curva fueron seleccionadas para mejorar el ajuste de la curva. La curva para la activación del canal TRPV4 en función de la concentración de GSK1016790A se muestra en la Figura 7. Los datos fueron ajustados a la ecuación de Hill que arrojó un valor de  $K_D$  aparente o  $\text{EC}_{50} = 37 \pm 10$  nM y un número de Hill ( $n_H$ ) de 1.63.



**Figura 7. Curva de activación de hTRPV4 en función de la concentración de GSK1016790A.**

Se muestra la curva de respuesta del hTRPV4 en función de la concentración del GSK1016790A. Se utilizaron concentraciones de 3 nM (n = 5), 10 nM (n = 6), 20 nM (n = 6), 50 nM (n = 6), 80 nM (n = 6), 100 nM (n = 5), 500 nM (n = 5) y 750 nM (n = 5), los experimentos se realizaron con soluciones sin Ca<sup>2+</sup> (Solución 1). Para cada punto se realizaron experimentos independientes y se promedió la corriente obtenida a +100 mV después de normalizarla contra una concentración de 1 μM GSK1016790A. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill, EC<sub>50</sub>= 37 ± 10 nM y n<sub>H</sub>= 1.63.

A continuación, estudiamos el efecto del Ca<sup>2+</sup> sobre el TRPV4, ya que anteriormente se ha reportado que la rectificación de la corriente es dependiente de la concentración extracelular de dicho ion (Voets *et al.*, 2002). De igual manera en la configuración de parche escindido, se utilizó un protocolo de pulso cuadrado de voltaje (para registrar las corrientes macroscópicas) en el que se fijó un potencial de mantenimiento en 0 mV y se aplicaron pulsos de 100 ms de duración con voltajes en el rango de -120 mV hasta +120 mV, en pasos de 10 mV.

Observamos que en células transfectadas con TRPV4 de humano, el agonista activó corrientes macroscópicas (Fig. 8a y b). Cuando la solución sin Ca<sup>2+</sup> se utilizó en el baño y en la pipeta, observamos que la relación de la corriente en función del voltaje del canal presenta una rectificación débil (Fig. 8a) en comparación con la que se observa bajo las mismas condiciones para el canal TRPV1 (Jara-Oseguera *et al.*, 2008).

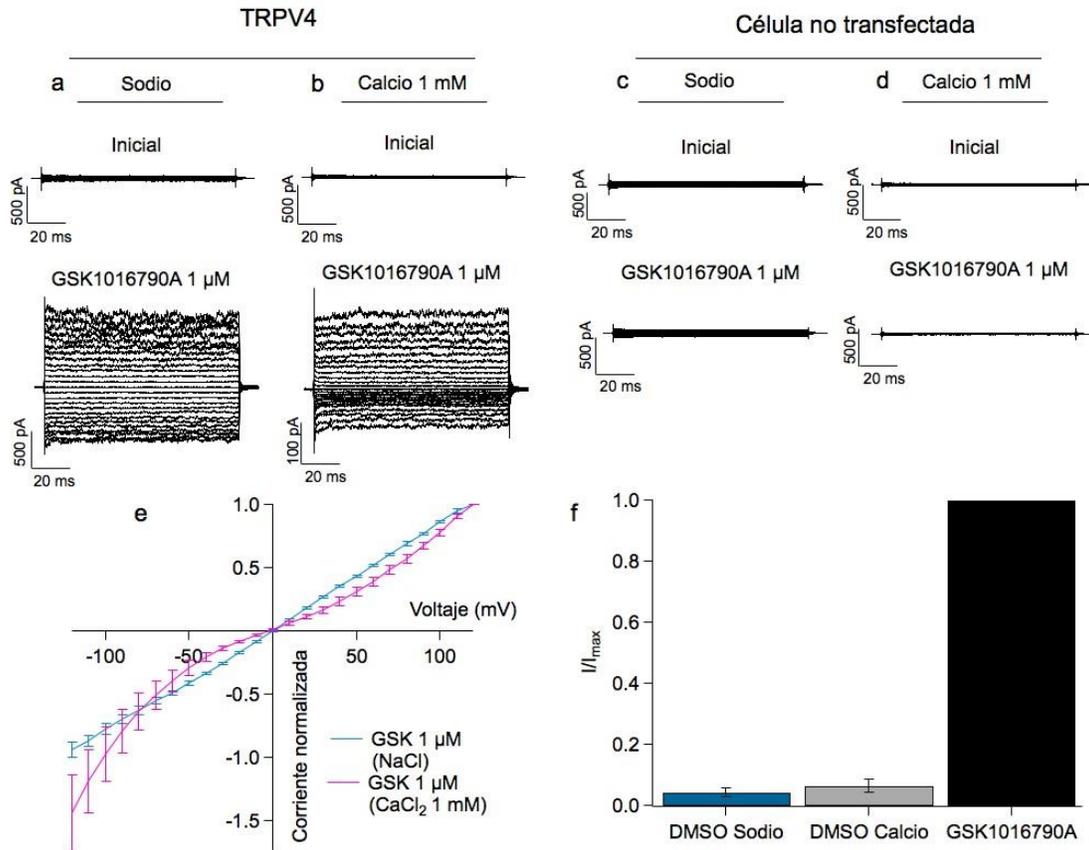
En cambio, cuando utilizamos la solución que contenía 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , observamos corrientes rectificantes como las que se muestran en el trazo representativo (Fig. 8b) y que son consistentes con una permeabilidad mayor al  $\text{Ca}^{2+}$ , similares a las que se han reportado por Voets et al., 2002, y son consistentes con un bloqueo del canal cuando se encuentra en presencia de concentraciones mayores de este ion.

A partir de estos experimentos observamos que la rectificación del canal TRPV4 depende de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, debido a un bloqueo dependiente del voltaje membranal, como anteriormente se había reportado en los registros de célula completa (Voets et al., 2002). De hecho, en la Fig. 8e se muestra que, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , la curva de corriente a voltaje en presencia de sodio es lineal, lo cual confirma las conclusiones generadas por otros grupos.

Para comprobar que las células HEK293 no expresan al canal TRPV4 de forma endógena, repetimos el experimento en células no transfectadas. Como se muestra, no hubo activación de canales endógenos por 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A (Fig. 8c y d) ( $n = 8$ , sodio y  $n = 4$ , calcio). Las corrientes a diferentes voltajes en cada sello fueron normalizadas contra la corriente máxima obtenida en 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A a +120 mV, promediadas y graficadas (Fig. 8e).

Se utilizó una concentración saturante de 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A para asegurar una activación máxima con el fin de poder comparar contra las corrientes activadas por los fosfolípidos. Cabe mencionar que activar al TRPV4 rápidamente, en vez de tener que esperar minutos (Jin et al., 2011) fue indispensable para poder mantener la integridad de los parches que habían sido expuestos a los fosfolípidos.

También fue importante corroborar que el vehículo en el que se disuelve el GSK1016790A no activa al canal, realizamos controles solo con DMSO 0.0065 %. Como se muestra en la Fig. 8f, el DMSO disuelto en soluciones con o sin  $\text{Ca}^{2+}$  no fue capaz de activar una corriente de amplitud comparable con la inducida por GSK1016790A ( $I/I_{\text{max}}$  sodio =  $0.04 \pm 0.014$ ,  $p = 0.003$  y  $I/I_{\text{max}}$  =  $0.06 \pm 0.02$ ,  $p < 0.001$ ).

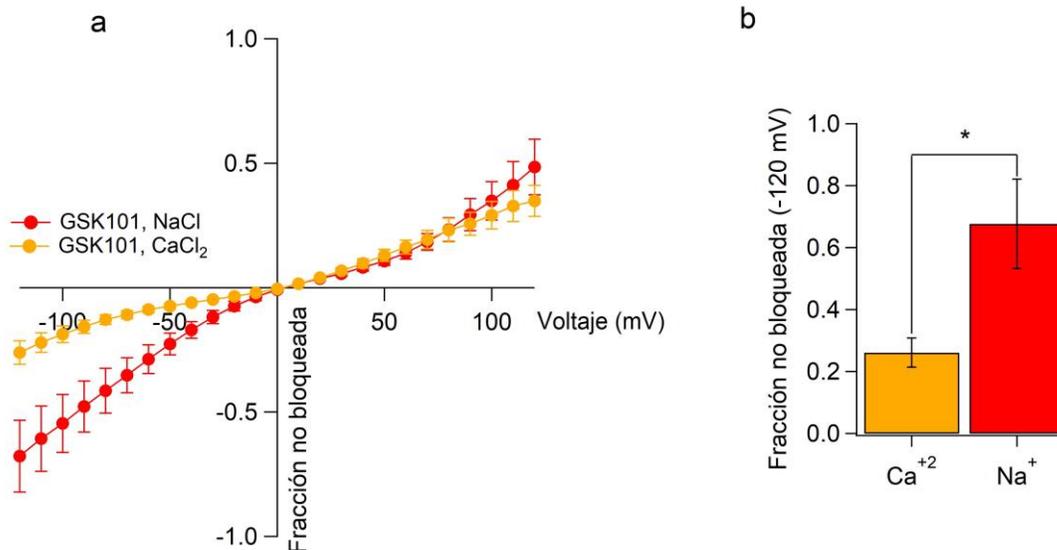


**Figura 8. Activación del canal TRPV4 por GSK1016790A en parches escindidos *inside-out*.** **a)** Trazo representativo de la activación con 1 μM GSK1016790A en células transfectadas con el TRPV4 en ausencia de calcio (solución 1) y **b)** con calcio (1 mM, solución 2). **c)** y **d)** Trazos representativos del mismo experimento con células no transfectadas. La ausencia de activación con ambas soluciones comprueba que en las células HEK293 no hay expresión endógena del TRPV4 (n = 8, Na<sup>+</sup> y n = 4, Ca<sup>2+</sup>). **e)** Corriente graficada con respecto al voltaje del TRPV4 activado con 1 μM GSK1016790A en solución 1, Na<sup>+</sup> (línea azul) (n = 12); con solución 2, Ca<sup>2+</sup> (línea rosa) (n = 10). Corriente normalizada contra la corriente máxima obtenida con 1 μM GSK1016790A a +120 mV. **f)** Promedio de la corriente obtenida en DMSO 0.0065 %, el vehículo del agonista, en la solución 1, Na<sup>+</sup> (n = 6, p = 0.003) y 2, Ca<sup>2+</sup> (n = 4, p < 0.001). La corriente a +120 mV en DMSO se normalizó contra la corriente obtenida en GSK1016790A a +120 mV.

Para caracterizar mejor el bloqueo del canal por el Ca<sup>2+</sup>, se tomaron pulsos de corriente a voltajes desde -120 hasta +120 mV con aumentos de 10 mV en presencia de 1 μM GSK1016790A preparado en solución de Na<sup>+</sup> (sin Ca<sup>2+</sup>) (Solución 1) y después en el mismo parche en presencia de 1 μM GSK1016790A preparado

en solución con 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Solución 2). La corriente a cada voltaje en GSK101 con  $\text{Ca}^{2+}$  se dividió con respecto a la corriente a +120 mV con GSK101 con  $\text{Na}^+$  para obtener la fracción de corriente que no fue bloqueada por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos experimentos fueron realizados en solución de  $\text{Na}^+$  dentro de la pipeta y en el baño (trazo rojo) así como en solución con 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  en pipeta y baño (trazo naranja) (Fig. 9a).

Observamos que a voltajes negativos en soluciones con 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  la fracción de la corriente que permanece es el  $0.26 \pm 0.04$  ( $n = 5$ ) y en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  es el  $0.67 \pm 0.14$  ( $n = 6$ ) a -120 mV (Fig. 9b). Esta diferencia es significativamente diferente ( $p < 0.001$ ), lo cual sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  bloquea la corriente del TRPV4. Como se mencionó anteriormente, debido a este bloqueo es que se observa la rectificación del canal en presencia del catión.

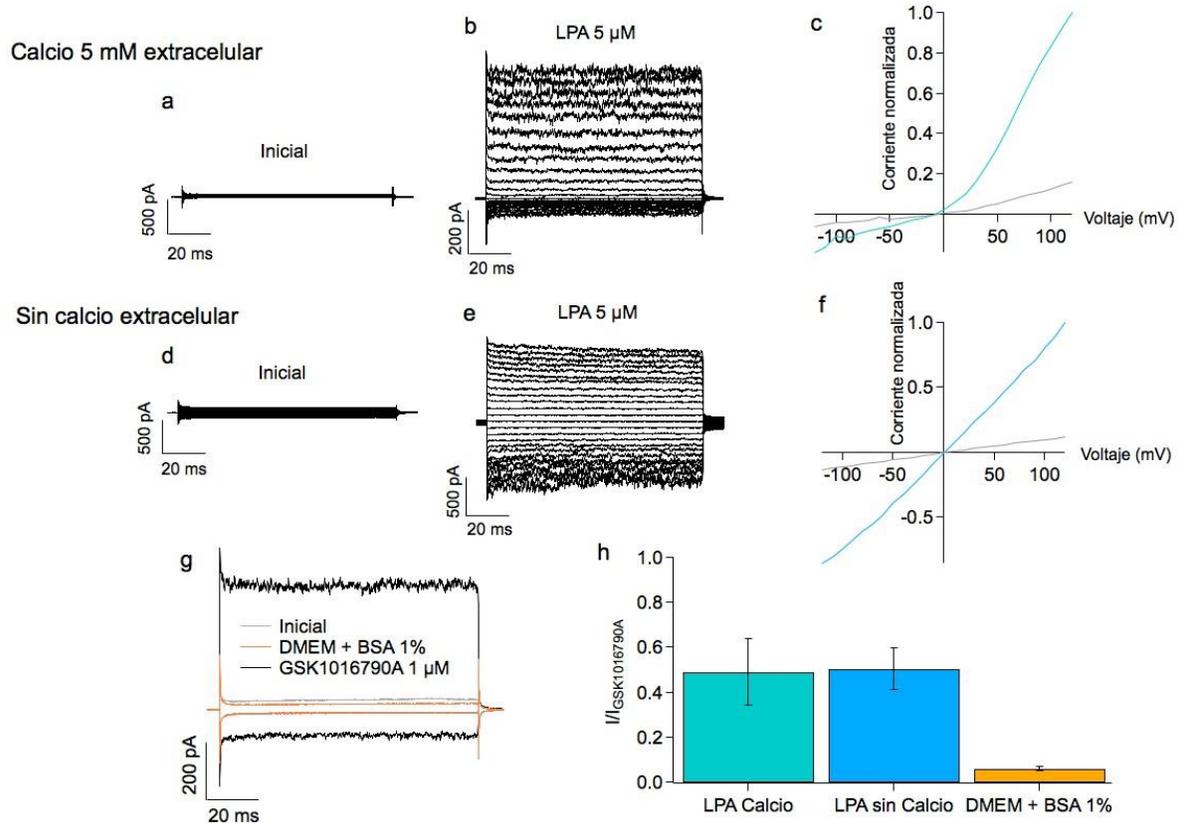


**Figura 9. La corriente del canal TRPV4 es bloqueada en presencia de calcio extracelular en parche escindido. a)** Relación entre la corriente no bloqueada a cada voltaje. Para ambos experimentos, la corriente fue activada con 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A en solución de  $\text{Na}^+$  y normalizada con respecto a la corriente a +120 mV en GSK1016790A en solución con  $\text{Ca}^{2+}$ . El experimento fue realizado en condiciones sin  $\text{Ca}^{2+}$  (trazo rojo) ( $n = 6$ ) y en soluciones con 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (trazo naranja) ( $n = 5$ ). **b)** Fracción de la corriente a -120 mV que es no es bloqueada en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Corriente en 1  $\mu\text{M}$  GSK101 en  $\text{Ca}^{2+}$  a -120 mV / Corriente en 1  $\mu\text{M}$  GSK101 en  $\text{Na}^+$  a +120 mV =  $-0.26 \pm 0.04$ ,  $n=5$ ) y en soluciones con  $\text{Na}^+$  (=  $-0.67 \pm 0.14$ ,  $n=6$ ) \* denota  $p < 0.001$ .

## 6.2. El LPA como agonista del canal TRPV4

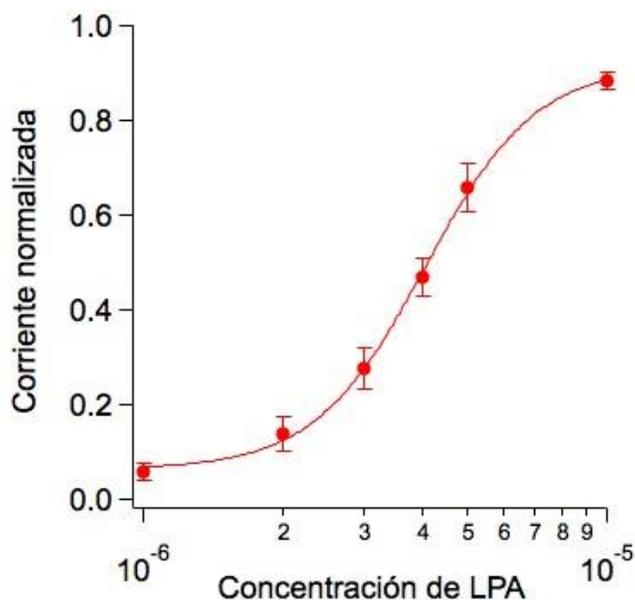
A continuación, probamos el efecto del LPA 18:1 sobre el canal TRPV4 de humano. Comenzamos por probar una concentración 5  $\mu$ M de LPA debido a que esta concentración es saturante y produce una probabilidad de apertura máxima para el canal TRPV1 (Nieto-Posadas et al., 2012). Después de incubar el sello en LPA (5  $\mu$ M) durante 3 minutos observamos activación del canal TRPV4 (Fig. 10). Al igual que la activación del TRPV4 por GSK1016790A, cuando expusimos a los canales a 5  $\mu$ M LPA en una solución que contenía 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (solución 3) en la pipeta, observamos rectificación saliente (Fig. 10a, b y c). No observamos rectificación cuando activamos al canal con LPA en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la pipeta (solución 1), (Fig. 10d, e y f). En promedio, la corriente activada por LPA fue igual en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 10h), con  $\text{Ca}^{2+}$  el promedio de activación fue de  $48 \pm 14$  % ( $n = 4$ ) y sin  $\text{Ca}^{2+}$  de  $50.4 \pm 9$  % ( $n = 4$ ), con respecto a la activación con 1  $\mu$ M GSK1016790A.

Para confirmar que la activación del canal TRPV4 se debe al LPA y no a un artefacto experimental, se realizaron controles con el vehículo, el DMEM + BSA 1 % (Ver Metodología). No hubo activación del TRPV4 después de incubar el sello por 3 minutos en la solución que contenía únicamente al vehículo (Fig. 10g), pues el promedio de la amplitud de la corriente que se obtuvo en el vehículo normalizada con respecto a la obtenida con 1  $\mu$ M GSK1016790A en el mismo sello fue de  $5.9 \pm 0.9$  % (Fig. 10h).



**Figura 10. El canal TRPV4 es activado por LPA 18:1.** Trazos representativos de **a)** la corriente inicial en un sello de una célula transfectada con hTRPV4 y **b)** su activación después de 3 minutos de incubación en LPA (5  $\mu\text{M}$ ). Se aplicaron pulsos de voltaje desde -120 hasta +120 mV en pasos de 10 mV para observar la rectificación. Se utilizó la solución 3 dentro de la pipeta y la solución 1, sin  $\text{Ca}^{2+}$ , en el baño. **c)** Gráfica de la corriente activada con LPA con respecto al pulso de voltaje para los experimentos con  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mM; trazo verde). La corriente fue normalizada contra la máxima corriente obtenida a +120 mV con LPA. **d)** y **e)** Trazos representativos del mismo experimento en ausencia de calcio, se utilizó la solución 1 dentro de la pipeta y en el baño. **f)** Gráfica de la corriente activada con LPA con respecto al voltaje para los experimentos sin  $\text{Ca}^{2+}$  (trazo azul). **g)** Trazo representativo de que el vehículo, DMEM + BSA 1%, (trazo naranja) no activa al canal TRPV4 después de 3 minutos de incubación y la corriente obtenida con GSK1016790A (trazo negro). **h)** Promedio de la corriente activada con LPA (5  $\mu\text{M}$ ) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (barra verde,  $I/I_{\text{GSK}} = 0.48 \pm 0.14$ ,  $n = 5$ ), sin  $\text{Ca}^{2+}$  (barra azul,  $I/I_{\text{max}} = 0.50 \pm 0.09$ ,  $n = 4$ ) y el vehículo (barra naranja,  $I/I_{\text{GSK}} = 0.06 \pm 0.01$ ,  $n = 5$ ) con el máximo de 1  $\mu\text{M}$  GSK1016790A a +120 mV.

Determinamos que la activación es dependiente de la concentración de LPA 18:1, de igual manera a como se determinó para el GSK1016790A (Fig. 11). Los experimentos para cada concentración de LPA fueron realizados independientemente con la solución 1 en el baño y dentro de la pipeta. Los sellos fueron incubados durante 3 minutos en cada concentración de LPA y después fueron activados con 1  $\mu$ M GSK1016790A para normalizar la corriente de cada sello. Se promediaron diferentes sellos para cada concentración y finalmente los datos se ajustaron a la ecuación de Hill que arrojó un valor de  $EC_{50} = 4.05 \mu$ M y un número de Hill ( $n_H$ ) = 3.6.



**Figura 11. La activación del TRPV4 de humano es dependiente de la concentración de LPA 18:1.** Se muestra la curva de respuesta del TRPV4 en función de la concentración del LPA. Se utilizaron concentraciones de 1 ( $n = 4$ ), 2 ( $n = 11$ ), 3 ( $n = 8$ ), 4 ( $n = 8$ ), 5 ( $n = 12$ ) y 10  $\mu$ M ( $n = 3$ ) y los experimentos se realizaron con soluciones sin calcio (Solución 1). Para cada punto se realizaron experimentos independientes y se promedió la corriente normalizada contra GSK1016790A (1 $\mu$ M), los puntos para cada concentración se ajustaron a la ecuación de Hill y se obtuvieron los siguientes resultados:  $EC_{50} = 4.05 \pm 0.1 \mu$ M y  $n_H = 3.6$ .

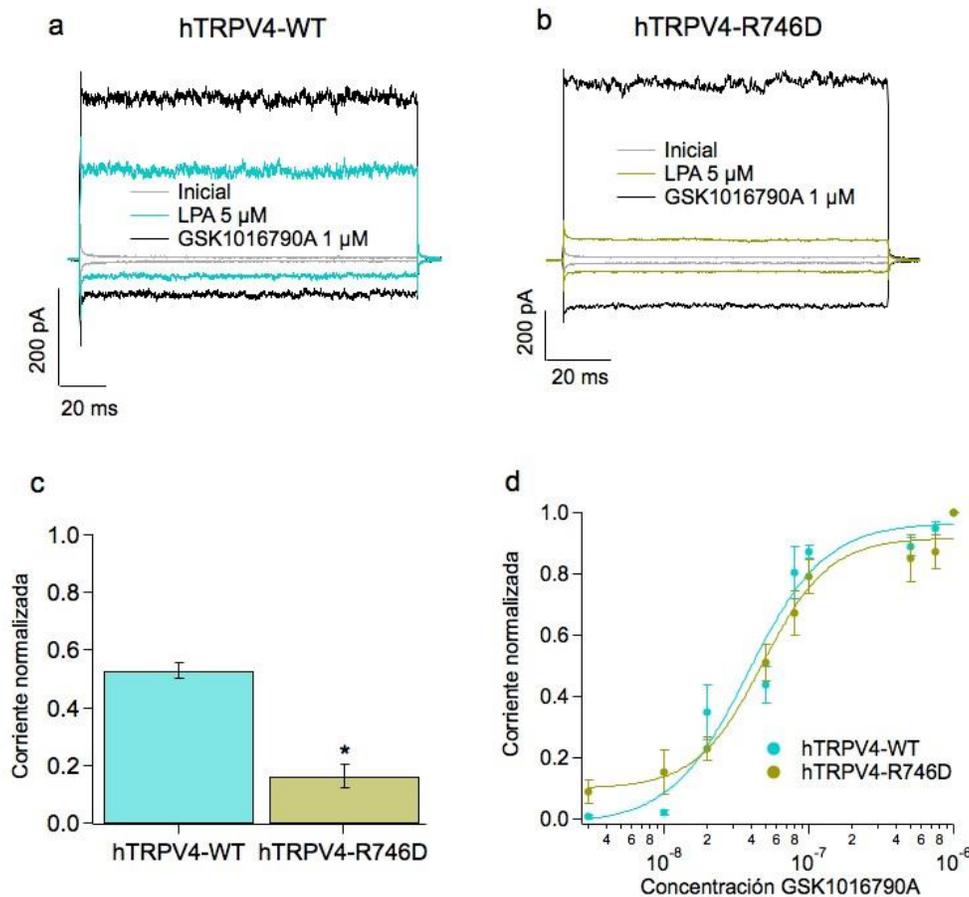
### 6.3. El LPA 18:1 actúa directamente sobre el canal hTRPV4

En resumen, estos resultados demuestran que el canal TRPV4 puede ser activado por el LPA 18:1 y sugieren que esta activación ocurre gracias a la unión del LPA con algún sitio de la estructura del canal, ya que otros datos obtenidos en el laboratorio indican que el LPA 18:0 no produce activación del canal. En este sentido para determinar el sitio de interacción nos basamos en nuestro estudio previo de los efectos y mecanismos de acción del LPA sobre el TRPV1 (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). El LPA establece interacciones electrostáticas con una lisina en la posición 710 (K710) ubicada en el extremo C-terminal proximal del canal TRPV1 de rata. Así, como se muestra en el alineamiento (Figura 4), se buscó el residuo en el sitio homólogo del canal TRPV4 e identificamos una arginina en la posición 746 (R746). Debido a que en el sitio homólogo entre los canales se conserva un aminoácido con carga positiva, surgió la hipótesis de que la unión del lípido al canal involucra la presencia de interacciones electrostáticas entre el LPA y la proteína a nivel de la arginina 746. Para corroborar esta idea, se generó una mutante utilizando la técnica descrita en la sección de métodos del canal hTRPV4 en el sitio 746 a un ácido aspártico (R746D) para cambiar la polaridad la carga.

Para determinar el porcentaje de activación de la mutante se comparó la corriente obtenida después de 3 minutos de incubación del sello en 5  $\mu$ M LPA con respecto a la máxima corriente obtenida con 1  $\mu$ M GSK1016790A en cada sello (Fig. 12a y b). Estos experimentos se realizaron al igual que las condiciones anteriores con solución de registro con  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mM) en la pipeta para observar rectificación de la corriente y poder asegurar que se mantuvo la integridad del sello, y las corrientes se obtuvieron con dos pulsos de voltaje a -60 mV y a +60 mV. Observamos que la activación de la mutante R746D por el LPA 18:1 disminuye significativamente con respecto al canal silvestre (Fig. 12c; hTRPV4 silvestre,  $I/I_{\text{max}} = 0.53 \pm 0.02$ ,  $n = 26$  y hTRPV4 R746D,  $I/I_{\text{max}} = 0.16 \pm 0.04$ ,  $n = 11$ ,  $p < 0.001$ ).

Fue necesario descartar que el efecto que observamos se debiera a que la mutación no necesariamente refleja la pérdida de unión del LPA, sino que por sí sola afecta a la función del canal. Por ello comparamos las curvas de corriente vs concentración

ante GSK1016790A. La curva del canal mutante fue realizada de la misma manera que la curva para la canal silvestre mostrada en la figura 8, con las mismas concentraciones de 3 (n = 3), 10 (n = 5), 20 (n = 5), 50 (n = 5), 80 (n = 5), 100 (n = 5), 500 (n = 6) y 750 (n = 8) nM de GSK1016790A. Al ajustar los datos a la ecuación de Hill, obtuvimos que los valores de  $EC_{50}$  y de  $n_H$  no son diferentes entre el canal silvestre y el mutante: Los valores de  $EC_{50}$  fueron de  $37 \pm 10$  nM y de  $48 \pm 6.8$  nM, y el  $n_H$  de 1.63 y 1.89 para hTRPV4-WT y hTRPV4-R746D, respectivamente (Fig. 12d). La menor respuesta a LPA observada en el canal hTRPV4-R746D sugiere que este residuo forma parte del sitio de unión en el canal, y que no se debe a que se hayan alterado ni la función ni las propiedades alostéricas del canal.



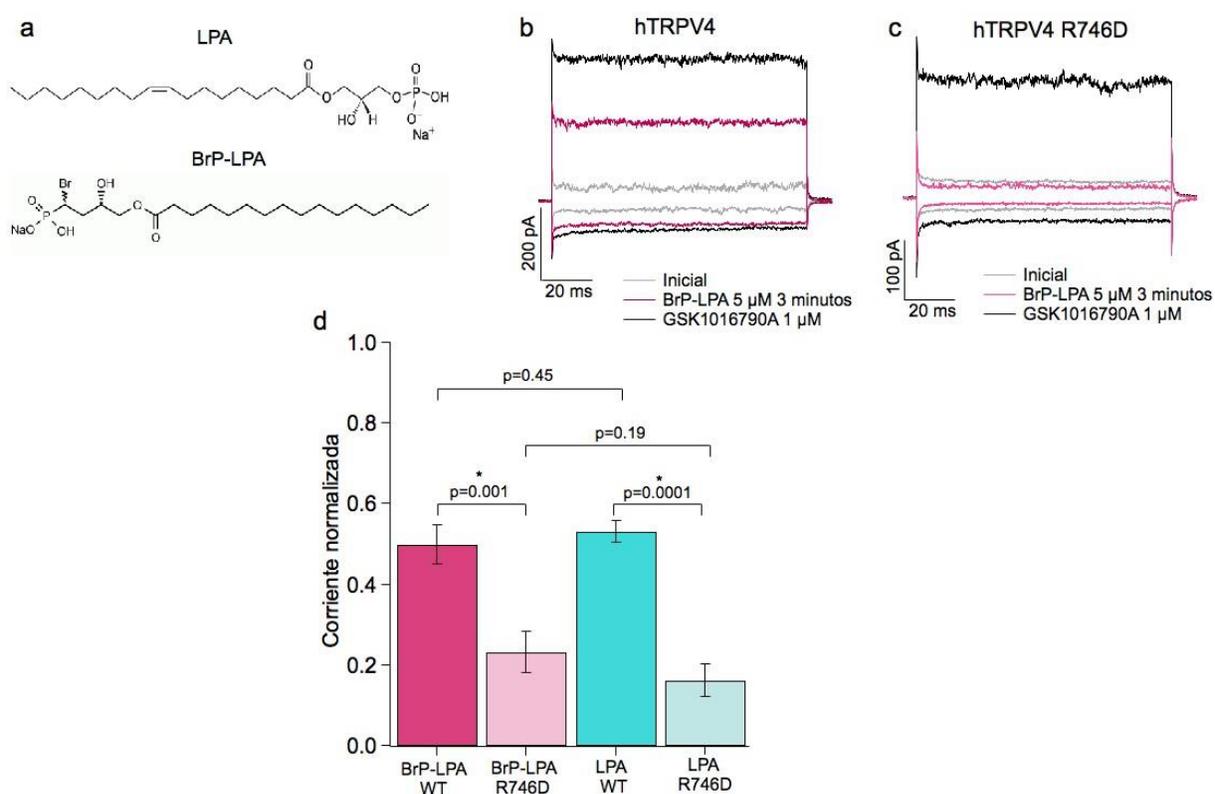
**Figura 12. El canal hTRPV4 R746D exhibe menor activación por LPA 18:1 que el canal silvestre.** **a)** Trazo representativos de la activación de hTRPV4 silvestre con LPA (5  $\mu$ M, trazo azul) después de 3 minutos de incubación del parche de membrana escindido. **b)** Trazo representativo de la activación de hTRPV4 R746D con LPA (5  $\mu$ M, trazo café). Después de incubar con LPA, los

parches fueron expuestos a GSK10161790A (1  $\mu$ M, trazos negros para ambos). La solución 3 fue utilizada dentro de la pipeta y la solución 1 fue utilizada en el baño. **c)** Promedio de la corriente activada por LPA (5  $\mu$ M) normalizada con respecto a la máxima corriente obtenida en 1  $\mu$ M GSK10161790A. hTRPV4  $I/I_{\max} = 0.53 \pm 0.02$ ,  $n = 26$  (azul); hTRPV4 R746D  $I/I_{\max} = 0.16 \pm 0.04$ ,  $n = 11$  (café) \* $p < 0.001$ . **d)** Curvas de la corriente a diferentes concentraciones de GSK10161790A de los canales hTRPV4 silvestre y hTRPV4-R746D. Los valores de  $EC_{50}$  para el canal silvestre fue  $37 \pm 10$  nM y para el canal hTRPV4-R746D fue  $48 \pm 6.8$  nM y los valores de  $n_H$  de 1.63 para el silvestre y 1.89 para el canal hTRPV4-R746D. Se utilizaron concentraciones de: 3, 10, 20, 50, 80, 100, 500 y 750 nM. Los experimentos se realizaron con soluciones sin calcio (Solución 1).

Dado que las células HEK293 expresan endógenamente al receptor LPA<sub>1</sub> (Alderton *et al.*, 2001), se utilizó un inhibidor de los receptores LPA<sub>1-4</sub>, el BrP-LPA, para descartar que la activación del TRPV4 que observamos fuera a través de la activación de los receptores de LPA endógenos de las células. Anteriormente, este inhibidor había sido utilizado para determinar que la activación del canal TRPV1 por el LPA fuera independiente de los receptores de LPA. Sin embargo, se observó también que el BrP-LPA activa al TRPV1 de manera similar al LPA, debido a que poseen una estructura química similar (Fig. 13a) y a que ambas moléculas actúan sobre el TRPV1, independientemente de los receptores de LPA (Nieto-Posadas *et al.*, 2012).

En este proyecto, observamos el mismo efecto del BrP-LPA sobre el canal TRPV4 que el que habíamos reportado para el TRPV1: En parches escindidos *inside-out* de células HEK293 transfectadas con TRPV4, se observaron corrientes después de incubar los sellos 3 minutos en solución con 5  $\mu$ M BrP-LPA (Fig. 13b). Para todos los sellos se utilizó solución con 5 mM de CaCl<sub>2</sub> dentro de la pipeta para observar que las corrientes rectificaran (para asegurarnos que no se estaba perdiendo el sello) y las corrientes se obtuvieron aplicando dos pulsos de voltaje a -60 y a +60 mV. Esta activación correspondió al  $49 \pm 4$  % ( $n = 18$ ) con respecto a la corriente máxima que obtuvimos con 1  $\mu$ M GSK10161790A en el mismo sello (Fig. 13b y d).

Si la activación del hTRPV4 por BrP-LPA ocurre porque este lípido comparte características estructurales con el LPA, entonces se espera que el mecanismo sea similar entre ellos. Para confirmarlo, analizamos la activación del hTRPV4-R746D por BrP-LPA (Fig. 13c). Observamos que el canal mutante es activado por BrP-LPA en menor proporción ( $0.49 \pm 0.04$  WT vs  $0.22 \pm 0.06$  hTRPV4-R746D) con respecto a  $1 \mu\text{M}$  GSK1016790A en comparación con el canal silvestre, similar a lo observado con LPA (Fig. 13d)



**Figura 13. El BrP-LPA activa al canal hTRPV4.** **a)** Estructura química del LPA 18:1 y del BrP-LPA. Trazos representativos de la activación del **b)** hTRPV4 silvestre (trazo morado) y **c)** hTRPV4 R746D (trazo rosa) por BrP-LPA ( $5 \mu\text{M}$ ). La corriente para BrP-LPA ( $5 \mu\text{M}$ ) fue tomada después de 3 minutos de incubación y fue inmediatamente expuesto a GSK 1016790A ( $1 \mu\text{M}$ ; trazo negro) a  $+60 \text{ mV}$  y  $-60 \text{ mV}$ . La solución 3 fue utilizada dentro de la pipeta y la solución 1 fue utilizada en el baño. **d)** Promedio de la corriente activada por BrP-LPA ( $5 \mu\text{M}$ ), normalizada con respecto a la máxima corriente obtenida en GSK1016790A ( $1 \mu\text{M}$ ). hTRPV4 silvestre  $I_{\text{BrP-LPA}}/I_{\text{max}} = 0.49 \pm 0.04$ ,  $n=18$  (rosa

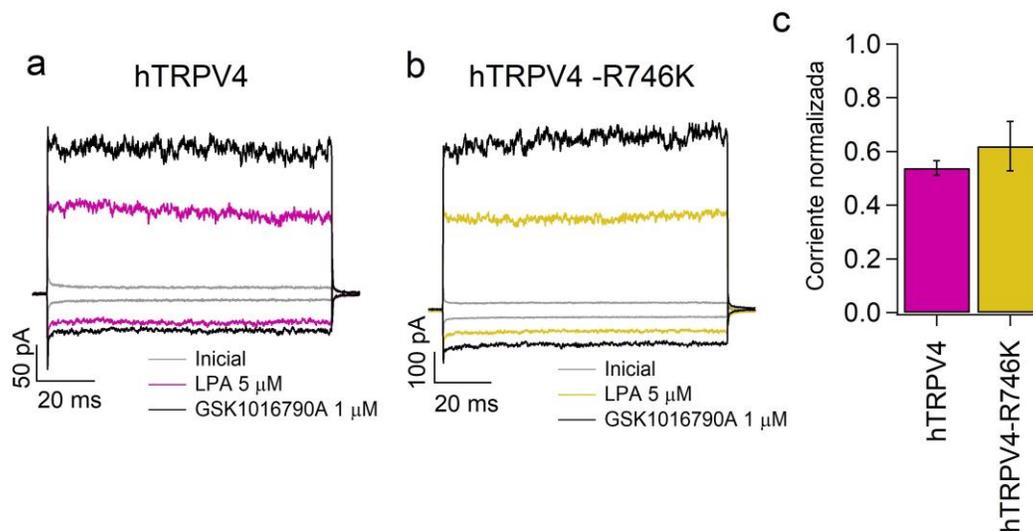
fuerte), hTRPV4 R746D  $I_{BrP-LPA}/I_{max} = 0.22 \pm 0.06$ ,  $n = 8$  (rosa pálido); y los datos mostrados en la Fig. 11: hTRPV4 silvestre  $I_{LPA}/I_{max} = 0.53 \pm 0.02$ ,  $n = 26$  (azul fuerte), hTRPV4 R746D  $I_{LPA}/I_{max} = 0.16 \pm 0.04$ ,  $n = 11$  (azul pálido).

#### **6.4. El canal hTRPV4-R746K es activado por LPA**

Para corroborar detalladamente que la unión del LPA al TRPV4 se establece gracias a la interacción electrostática entre el lípido y una arginina en la posición 746, se mutó la arginina endógena del hTRPV4 por lisina, otro residuo con carga positiva y que es el residuo correspondiente en el sitio del TRPV1. Probamos la activación de este canal mutante por LPA y comparamos la proporción de activación con respecto al canal silvestre.

Como se muestra en la Figura 14, el canal que tiene una lisina en la posición 746 puede ser activado por el LPA 18:1 de manera similar a la activación que observamos en el canal silvestre. El promedio de la fracción activada por 5  $\mu$ M LPA 18:1 con respecto a 1  $\mu$ M GSK1016790A del canal silvestre fue de  $57 \pm 4.3$  % ( $n = 7$ ), mientras que para el canal mutante fue de  $62 \pm 9.1$  % ( $n = 7$ ). Aunque el promedio de la activación del canal mutante tiende a ser mayor, no alcanza a ser estadísticamente diferente a la que se observa con el canal silvestre ( $p = 0.425$ ).

Con los resultados presentados hasta ahora, podemos concluir que el sitio 746 del TRPV4 es donde el LPA interacciona con el canal, y que en él es importante que haya un residuo con carga positiva -arginina en el canal TRPV4 silvestre o lisina imitando al TRPV1- para que se establezca la interacción electrostática con el LPA que posee carga negativa.



**Figura 14. El canal hTRPV4 se activa con LPA si hay una lisina en el residuo 746.** Trazos representativos de la activación por LPA 18:1 (5 μM) de **a)** hTRPV4 (trazo rosa) y **b)** hTRPV4-R746K (trazo amarillo). Para ambos canales inmediatamente después de observar activación por LPA, se pasó el sello a GSK1016790A (1 μM, trazos negros). Se utilizaron las mismas soluciones que en los experimentos anteriores y las corrientes fueron tomadas a los mismos voltajes. **c)** Promedio de la corriente activada por LPA 18:1 (5 μM) con respecto a la corriente en GSK1016790A hTRPV4 silvestre  $I_{LPA}/I_{max} = 0.53 \pm 0.02$  (n = 26) y hTRPV4 R746K  $I_{LPA}/I_{max} = 0.62 \pm 0.91$  (n = 7),  $p = 0.425$ .

### 6.5. Efectos del LPA y del LPC en canales TRPV4 de humano que simulan mutaciones reportadas en bases de polimorfismos de un solo nucleótido

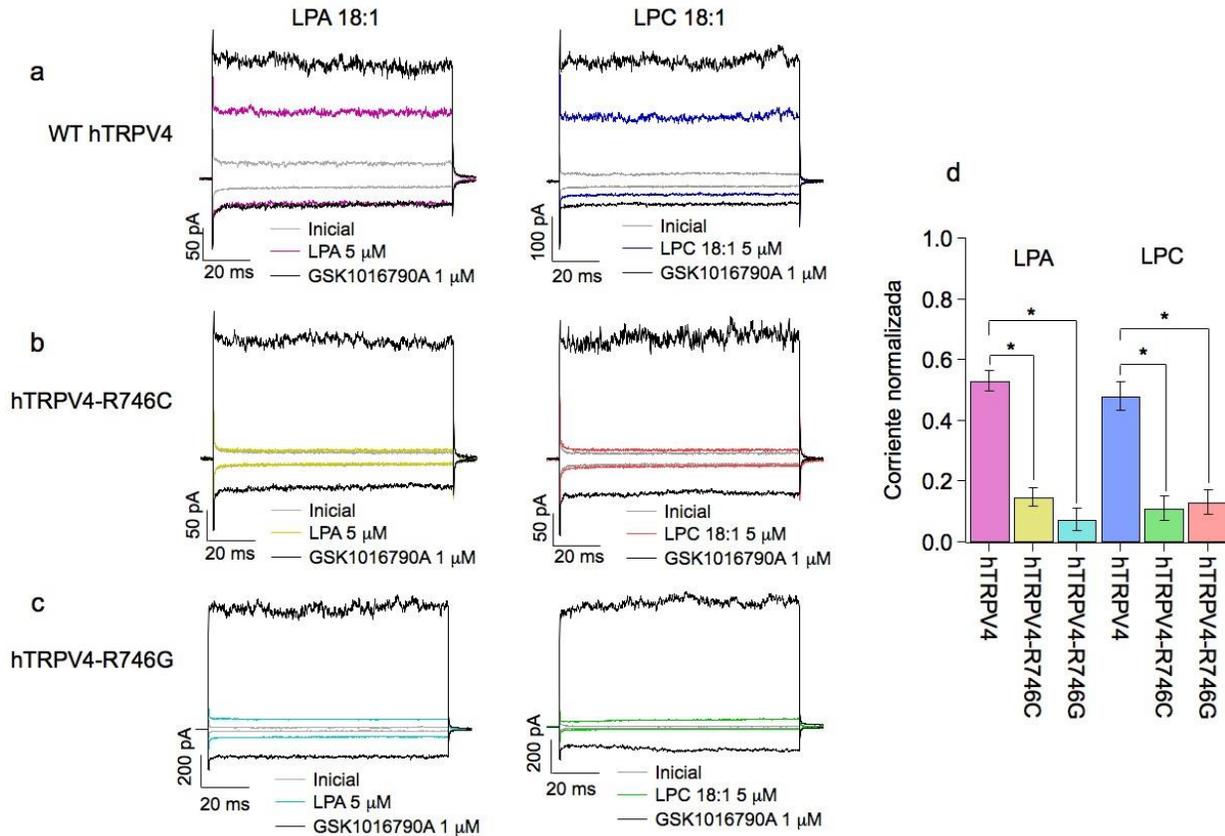
Una vez caracterizado el sitio para la unión del LPA en el canal TRPV4, decidimos buscar en la base de datos de polimorfismos de nucleótido único (**SNP** por sus siglas en inglés para *Single Nucleotide Polymorphism*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) mutaciones reportadas en humanos para el sitio 746 del TRPV4. Encontramos que existen dos mutaciones que cambian la arginina 746 por una cisteína o por una glicina. Interesantemente, hasta el momento no se ha determinado la relevancia clínica de estas mutaciones, y esto representa una posible línea de estudio futura para el laboratorio.

Así, probamos si la activación de los canales hTRPV4-R746C y hTRPV4-R746G por LPA 18:1 estuviera afectada (Fig. 15 a, b y c). Conforme con los resultados

anteriores, la activación con LPA 18:1 en ambos canales mutantes se ve significativamente disminuida con respecto al TRPV4 silvestre (Fig. 15 g), el canal hTRPV4-R746C es activado  $14 \pm 3 \%$ , ( $n = 6$ ), mientras que el canal hTRPV4-R746G únicamente  $7 \pm 4 \%$  ( $n = 9$ ), con respecto a la activación en  $1 \mu\text{M}$  GSK1016790A. Importantemente, no se modifica la activación por el GSK1016790A en ningún canal mutante (Fig. 15 b y c), lo cual demuestra que son canales funcionales.

En nuestro laboratorio anteriormente determinamos que la LPC 18:1, un precursor en la síntesis de LPA (Fig. 5a), es capaz de activar al hTRPV4 (Fig. 15d). En promedio la LPC activa  $48 \pm 5 \%$  de la corriente en  $1 \mu\text{M}$  GSK1016790A, lo cual no es diferente a la activación que observamos con LPA en proporción igual al LPA (LPA vs LPC,  $p = 0.14$ ). Asimismo, probamos la activación de las mutantes hTRPV4-R746C y hTRPV4-R746G por LPC 18:1. Obtuvimos que, al igual que el LPA, la activación disminuye en ellas, pues en la mutante R746G es activada en LPC tan solo el  $13 \pm 4 \%$  y en la R746C,  $11 \pm 4 \%$  de la corriente activada en  $1 \mu\text{M}$  GSK1016790A (Fig. 15e, f y g).

Con esto podemos concluir que la LPC y el LPA son agonistas endógenos del canal TRPV4 que comparten un sitio de unión. Explorar posibles cambios en la fisiología de organismos con las mutaciones descritas arriba, pudiera ser una línea de investigación interesante en un futuro próximo.



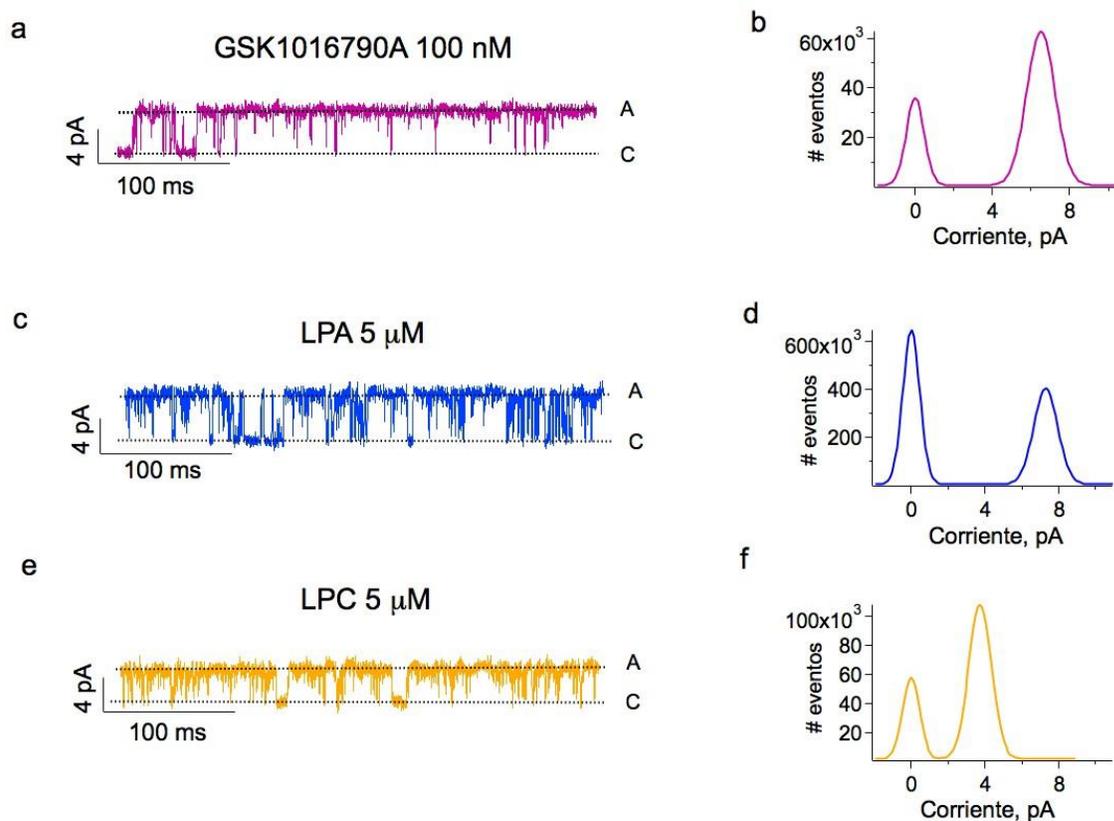
**Figura 15. Los canales TRPV4 de humano con polimorfismos en el sitio 746 no son activados por LPA 18:1 ni por LPC 18:1.** **a)** Trazo representativo de la activación del canal TRPV4 silvestre de humano con LPA 18:1 y LPC 18:1, **b)** del canal hTRPV4-R746C y **c)** del canal hTRPV4-R746G. Para cada uno se muestra su activación a -60 mV y +60 mV después de incubación en LPA (5  $\mu$ M) o LPC (5  $\mu$ M) durante 3 minutos. Para cada sello se tomó su activación en GSK1016790A (1  $\mu$ M, en negro). La solución 3 fue utilizada dentro de la pipeta y la solución 1 fue utilizada en el baño. Trazos representativos de la activación del canal. **d)** Promedio de la corriente activada con LPA 18:1 (5  $\mu$ M) y LPC 18:1 (5  $\mu$ M) normalizadas con la corriente obtenida en GSK1016790A (1  $\mu$ M) en cada sello a +60 mV. hTRPV4  $I_{LPA}/I_{max} = 53 \pm 3 \%$  (barra morada, n = 26), hTRPV4-R746C  $I_{LPA}/I_{max} = 14 \pm 3 \%$  (barra amarilla, n = 6) y hTRPV4-R746G  $I_{LPA}/I_{max} = 7 \pm 4 \%$  (barra azul claro, n = 9); hTRPV4  $I_{LPC}/I_{max} = 48 \pm 4 \%$  (barra azul fuerte, n = 13), hTRPV4-R746C  $I_{LPC}/I_{max} = 11 \pm 4 \%$  (barra rosa, n = 10) y hTRPV4-R746G  $I_{LPC}/I_{max} = 13 \pm 4 \%$  (barra verde, n = 5). \* denota  $p < 0.01$ .

## **6.6. El LPA no modifica la conductancia de hTRPV4, pero la LPC la disminuye**

Se realizaron experimentos para estudiar a fondo las propiedades de activación del TRPV4 por sus agonistas a nivel de canal único. En primer lugar, determinamos estos parámetros para la activación del hTRPV4 en presencia de 100 nM GSK1016790A a +60 mV (Fig 15a trazo rosa, n = 4), y se obtuvo una probabilidad de apertura ( $P_o$ ) de  $0.75 \pm 0.08$  y una corriente unitaria de  $6.45 \pm 0.55$  pA (Fig. 16b) que resulta en una conductancia de 107.5 pS.

Realizamos el mismo experimento, pero en presencia de 5  $\mu$ M LPA. Obtuvimos una  $P_o$  mucho menor que con el GSK1016790A ( $p = 0.01$ ), de  $0.34 \pm 0.06$  (Fig. 16c trazo azul, n = 2), es decir, a diferencia del GSK1016790A el LPA actúa como un agonista parcial del TRPV4. Sin embargo, la corriente unitaria fue de  $6.47 \pm 0.37$  pA (n = 4) que no es diferente de la observada en GSK1016790A ( $p = 0.48$ ) y que arroja una conductancia de 107.8 pS.

En cambio, cuando el canal es activado por la LPC (5  $\mu$ M), si bien la  $P_o$  no es diferente con respecto a GSK1016790A ( $P_o$  de  $0.75 \pm 0.07$  en LPC vs  $P_o$  de  $0.75 \pm 0.08$  en GSK1016790A,  $p = 0.49$ ), la corriente unitaria disminuye a  $3.3 \pm 0.41$  pA, que es distinta a la observada tanto para GSK1016790A como para LPA 18:1 (LPA vs LPC,  $p = 0.0006$ ; GSK1016790A vs LPC,  $p = 0.002$ ) (Fig. 16e y f trazo naranja, n = 4). Esta disminución en la corriente unitaria del canal resulta en una conductancia de 55 pS, que corresponde a aproximadamente el 50 % de la conductancia observada en GSK1016790A.



**Figura 16. El LPA no modifica la conductancia de hTRPV4, pero la LPC la disminuye.** Trazos de canal único del hTRPV4 silvestre activado por **a)** GSK1016790A (100 nM) o **c)** LPA (5 μM) o **e)** LPC (5 μM) a +60 mV. Las letras A y C representan la corriente cuando el canal está abierto y cerrado, respectivamente. **b), d) y f)** Histogramas de todos los puntos. El 0 en el eje de las abscisas corresponde al estado cerrado, el segundo pico corresponde al estado abierto. El promedio de la amplitud de la corriente cuando el canal está abierto fue de  $6.45 \pm 0.55$  pA con una  $P_o$  de  $0.75 \pm 0.08$  ( $n = 4$ ) para GSK1016790A y  $6.47 \pm 0.37$  pA ( $n = 4$ ) con  $P_o$  de  $0.34 \pm 0.06$  para LPA 18:1 ( $n = 2$ ). El promedio de la amplitud de la corriente cuando el canal está abierto con LPC fue de  $3.3 \pm 0.41$  pA ( $n = 4$ ) y su  $P_o$   $0.74 \pm 0.07$  ( $n = 3$ ).

## 6.7. Análisis de cinética de canales únicos

Aunque la probabilidad de apertura y la conductancia no cambian entre los registros de canal unitario de LPA y de GSK1016790A, notamos que los registros con LPA presentan más ruido, es decir, parecen haber más transiciones rápidas a un estado cerrado. Para poder observar con mayor claridad lo que ocurría, graficamos la amplitud de la corriente unitaria de cada uno de los eventos de apertura de un experimento (el eje de las ordenadas) con respecto a su duración en segundos (el eje de las abscisas). Graficar los datos así nos permite observar si hubiese más de un nivel de la corriente unitaria lo suficientemente estable (o sea suficientemente largo) para cada agonista, es decir, si hubieran estados de sub-conductancia.

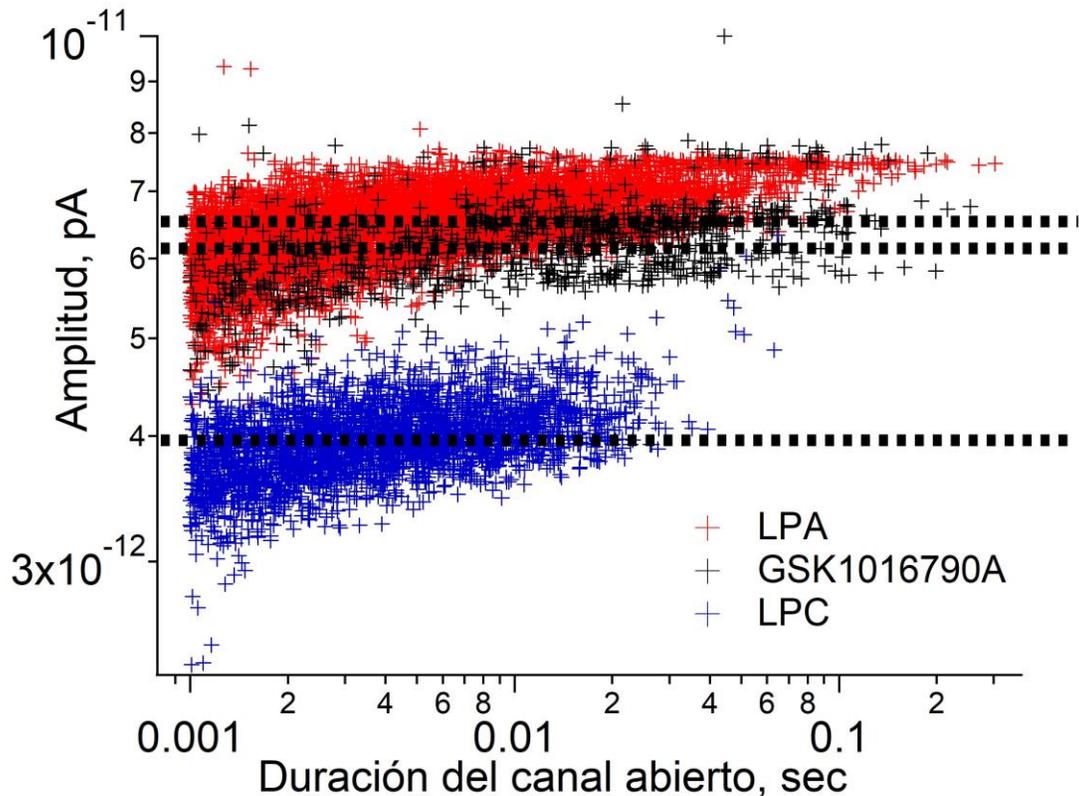
Así, se realizó un análisis de los datos como el que se muestra en la Fig. 17. No observamos más que un nivel de corriente unitaria predominante para cada uno de los agonistas, así que descartamos la posibilidad de que hubiesen sub-estados con conductancias menores dentro de cada agonista (Fig. 17).

Para el LPA (Fig. 17, color rojo) observamos que los eventos se distribuyen a un único nivel de conductancia, de aproximadamente 6.5 pA, y para el GSK1016790A (Fig. 17, color negro) fue de aproximadamente 6.19 pA. Asimismo, reiteramos que para el caso de la activación con LPC, la corriente unitaria fue menor a la que se obtuvo con LPA o con GSK1016790A, ya que en promedio fue de 3.99 pA (Fig. 17, color azul).

Es importante notar que en la Fig. 17 se observa que la distribución de los datos de LPA y GSK1016790A son superponibles y sus promedios similares, lo cual no ocurre con los datos para LPC, como ya se había determinado estadísticamente en la Fig. 16.

Aunque la corriente unitaria cuando el canal es activado con LPC es menor al de LPA y el GSK1016790A, es un estado duradero. Esto es importante puesto que nos sugiere que 1) Es dependiente del agonista, pues no se observó este mismo nivel de conductancia con GSK1016790A ni LPA y 2) Posiblemente sea un estado conformacional distinto. Esta última posibilidad es interesante pues en nuestro laboratorio se demostró que el TRPV1 presenta un cambio conformacional distinto

cuando es activado con LPA (Canul-Sánchez et al., 2018), y en ese reporte se observó un resultado similar utilizando este mismo análisis. Esto será discutido más adelante.



**Figura 17. Análisis de duración de los registros de canales unitarios.** Gráfica de la amplitud de la corriente (pA) de cada evento de canal único en función de su duración (s). Se grafican cientos de eventos para cada agonista para determinar que cada uno promueve una amplitud de corriente definida y no sub-estados distintos. Las líneas punteadas representan el promedio para cada amplitud de corriente unitaria. LPA = 6.5 pA, GSK1016790A = 6.19 pA y LPC = 3.99 pA. Es claro que la activación con GSK1016790A o con LPA producen estados abiertos con amplitudes que se superponen mientras que el LPC produce un estado abierto de menor amplitud.

## 7. Discusión

El canal TRPV4, al igual que los demás miembros de la superfamilia TRP, es un importante integrador de estímulos físicos, como temperatura o estrés mecánico; y químicos, como lípidos o algunos compuestos de origen vegetal. La mayoría de los estudios sobre el TRPV4 se han centrado principalmente en identificar mutaciones en su gen que causen enfermedades hereditarias, pues se han reportado alrededor de 50 mutaciones que ocasionan patologías como malformaciones o desproporciones del esqueleto, braquidactilia, artritis y múltiples neuropatías (Nilius & Voets, 2013). Sin embargo, los reportes sobre cuales compuestos endógenos son capaces de modular la actividad de este canal son pocos, o bien, la descripción sobre su efecto en el canal o el mecanismo de acción es escasa.

Con el presente trabajo hemos caracterizado al ácido lisofosfatídico y a su precursor, la lisofosfatidilcolina como nuevos agonistas endógenos para el canal TRPV4. En primer lugar, logramos expresar el canal en nuestro sistema para poder estudiarlo fuera de su ambiente celular, puesto que los escasos reportes electrofisiológicos anteriores sobre sus propiedades biofísicas habían sido realizados en la configuración de célula completa. Importantemente, en esta configuración observamos que el  $\text{Ca}^{2+}$ , al igual que en célula completa, causa la rectificación saliente de la corriente cuando es aplicado desde la cara extracelular (Figs. 6 y 8). De esta manera logramos establecer las condiciones de registro más convenientes.

Una vez establecido esto, caracterizamos el efecto del LPA sobre el canal. Determinamos que al igual que en el TRPV1, el LPA activa al TRPV4 y su efecto es dependiente de la dosis. El valor de  $\text{EC}_{50}$  fue de aproximadamente 4  $\mu\text{M}$ , similar a lo observado para TRPV1.

Asimismo, determinamos que la arginina 746 es un residuo responsable de establecer la unión del LPA al TRPV4 basándonos en que es el sitio correspondiente a la lisina 710 del TRPV1. Cuando la arginina 746 es mutada a un residuo con carga negativa, el ácido aspártico, entonces se pierde la activación, así como cuando el sitio se muta por una cisteína, un residuo más voluminoso, o por una glicina, un

residuo que causa torsión en la estructura de la proteína. Finalmente, si en el sitio se coloca una lisina, que conserva la carga y simula al sitio del TRPV1, el canal se activa como el canal silvestre, con una tendencia a una mayor activación, aunque no alcanza a ser significativamente distinta del silvestre. En conjunto nuestros resultados sugieren que la activación se debe a una interacción directa entre el LPA con el canal que depende de la carga del residuo.

Otra evidencia de la interacción del lípido y el canal es que el BrP-LPA, un lípido estructuralmente similar al LPA pero que inhibe a los GPCR, puede activar al canal silvestre pero el efecto se abate en el canal mutante.

Paralelamente a nuestra descripción del LPA y en colaboración con el grupo del Dr. Wolfgang Liedtke en Carolina del Norte, EE. UU., describimos que el precursor del LPA, la lisofosfatidilcolina, también es capaz de activar al TRPV4. Inicialmente el grupo del Dr. Liedtke observó que la LPC produce prurito en ratones y que esto era dependiente del TRPV4. Nosotros determinamos que la LPC en efecto es un agonista del canal, ya que de la misma manera que el LPA, lo activa cuando es aplicado desde la cara intracelular. Más aún, la LPC también se une a través de la arginina 746, probablemente a través de su grupo fosfato, pues al mutar el sitio la activación se vio significativamente reducida.

El valor de la  $EC_{50}$  previamente reportada para el GSK1016790A en el canal TRPV4 de humano es de 2.1 nM (Thorneloe et al., 2008). Bajo nuestras condiciones experimentales, se obtuvo un valor de  $37 \pm 10$  nM, mismo que se encuentra dentro del error normal puesto que se considera que hay un corrimiento significativo en la  $EC_{50}$  solo si cambia en un orden de magnitud, es decir si los valores hubieran alcanzado concentraciones en el rango micromolar. Más aún, se debe de considerar que en el trabajo de Thorneloe y colaboradores, los experimentos fueron realizados en la configuración de célula completa y además no se especifica el tiempo de aplicación del compuesto, que en otros artículos llega a ser de varios minutos (Jin et al., 2011).

También es importante mencionar que recientemente se reportó que después de un minuto de aplicación, el GSK1016790A aumenta transitoriamente el número de

canales TRPV4 en la membrana, pero si continúa la exposición al agonista, entonces los canales son endocitados (Baratchi et al., 2019). Para el caso de nuestros experimentos, realizados en la configuración de parche escindido del patch clamp, es poco probable que tuviéramos variaciones en el número de canales ocasionadas por el tráfico celular.

Asimismo, en los experimentos realizados por Thorneloe y colaboradores se utilizó una solución extracelular con  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se mencionó en la sección de Introducción, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede potenciar la actividad basal del TRPV4 (Strotmann et al., 2003), mismo que puede afectar la sensibilidad del canal al agonista. Nuestros experimentos de la dosis-respuesta fueron realizados en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y también esto podría influir en el valor de  $\text{EC}_{50}$  obtenido.

Finalmente, también se ha reportado que existen diferencias en la sensibilidad del TRPV4 ante sus agonistas dependiendo del sistema celular en el que se exprese, misma que puede deberse, en parte, a la composición de las membranas de las distintas células (Thorneloe et al., 2008; Chen et al., 2015; Narita et al., 2015).

El TRPV4 puede ser activado por el estiramiento de la membrana causado por cambios en la composición lipídica, por lo que algunos lípidos, como la lisofosfatidilcolina, pueden insertarse en la membrana y posteriormente modifican su forma y fluidez (Lundbaek & Andersen, 1994; Startek et al., 2019). Nuestros resultados descartan esta posibilidad, pues además de la evidencia de los canales mutantes, en el laboratorio determinamos que la LPC 18:0, cuya única diferencia es la insaturación de la cadena de carbonos, no es capaz de activar al canal. Esto nos indica que el efecto de los lisofosfolípidos es específico y que depende de la insaturación en su estructura y que la activación no se debe a la modificación de la membrana (Fig. 18).

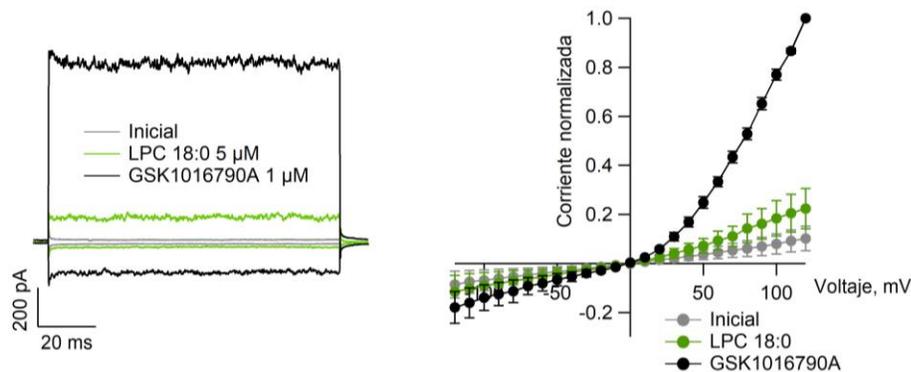


Figura 18. La LPC 18:0 no activa al canal hTRPV4. Tomado y modificado de la tesis de Alan Medina Arellano.

La insaturación de la cadena acilo permite a los lípidos adoptar diferentes conformaciones. Aunque el BrP-LPA no posee una insaturación, así como el LPA 18:0, sí activa al canal TRPV4. Esta aparente discrepancia fue evaluada para el caso del TRPV1. A través de un «alineamiento de flexibilidad» se observó que todos los compuestos capaces de activar al TRPV1 adoptan una conformación similar en la que sus colas acilo intersecan en dos llamados «puntos hidrofóbicos». La cadena acilo del LPA 18:0 adopta una conformación en la que no cubre a uno de dichos puntos, mientras que en el caso del BrP-LPA sí, aparentemente gracias a que su grupo bromofosfonato «empuja» a la parte hidrofóbica y ésta adopta la conformación de los compuestos activos como el LPA 18:1 (Morales-Lázaro *et al.*, 2014)

Para detallar la activación por estos lisofosfolípidos realizamos los experimentos de canal único, debido a que previamente en el laboratorio de la Dra. Rosenbaum se observó que cuando el canal TRPV1 es activado con LPA, la corriente unitaria aumenta aproximadamente 40 % con respecto a la corriente activada por capsaicina. Lo que se debe a que el LPA promueve un estado conformacional distinto al de la capsaicina (Canul-Sánchez *et al.*, 2018).

En el caso del TRPV4, no observamos que la corriente unitaria fuera diferente cuando el canal es activado con LPA o con GSK1016790A. Entre ambos agonistas

obtuvimos el valor típico de conductancia de este canal, que va de 90-100 pS a voltajes positivos (Nilius *et al.*, 2004). Por tanto, aunque el LPA parece conservar el sitio de unión entre los canales TRPV1 y TRPV4, no parece promover un estado conformacional distinto en el TRPV4.

Las corrientes macroscópicas pueden definirse por la suma de la probabilidad de apertura ( $P_o$ ), la conductancia unitaria ( $g_i$ ) y por el número de canales ( $N$ ). La probabilidad de apertura en LPA correspondió al 46 % de la obtenida con GSK1016790A, lo cual explica que la corriente macroscópica activada con el LPA corresponda aproximadamente al 50 % de la corriente de GSK1016790A. Debido a la baja probabilidad de apertura, podríamos sugerir que el LPA es un agonista parcial del canal TRPV4. En el caso de los canales iónicos un agonista parcial se podría considerar aquellos que son menos efectivos en mantener el canal abierto una vez que están unidos al mismo. Por ejemplo, se considera que la acetilcolina es un agonista parcial del receptor nicotínico del músculo porque produce una máxima respuesta de ~41 % (Colquhoun & Sivilotti, 2004; Sivilotti, 2010).

En contraste, con la LPC obtuvimos una alta probabilidad de apertura, pero observamos disminución en la corriente unitaria de aproximadamente el 50 %. Por lo que las corrientes macroscópicas pueden ser explicadas por diferencias en la conductancia. Dado que determinamos que la unión de la LPC es directamente a través de la arginina 746, y además observamos con el análisis de cinética que el estado abierto que tiene una amplitud de 4 pA es estable, sugerimos que la LPC podría inducir un cambio conformacional distinto, es decir un fenómeno similar al caso del TRPV1 con LPA (Canul-Sánchez *et al.*, 2018).

Existen pocos reportes en los que se describa que el LPA y otros lisofosfolípidos sean capaces de unirse directamente a un sitio en un canal iónico y modular su actividad. Si bien, el LPA es capaz de modular la actividad de múltiples canales iónicos a través de la activación de sus receptores canónicos acoplados a proteínas G, su capacidad de unirse directamente y activar a un canal iónico fue descrita por primera vez en el TRPV1, en el reporte realizado por el grupo de la Dra. Rosenbaum (Nieto-Posadas *et al.*, 2012).

Posteriormente, Kittaka y colaboradores (2017) demostraron que el LPA también es capaz de activar al canal TRPA1 mediante su sitio de unión intracelular en los extremos amino y carboxilo terminal y a su vez provocar prurito.

Asimismo, con este trabajo hemos identificado al TRPV4 como un canal que también es capaz de ser modulado directamente por el LPA. Esto es importante porque son pocos los agonistas endógenos descritos para este canal. Sabemos que, como se mencionó en la introducción, el LPA es un lípido bioactivo ampliamente vinculado con enfermedades crónicas, por lo que su capacidad de activar al TRPV4 sugiere que este canal puede ser un blanco terapéutico anteriormente ignorado en algunas patologías.

De igual manera, este trabajo resalta la versatilidad de los miembros de la subfamilia TRPV porque, que a pesar de que se encuentran conservados en su secuencia de aminoácidos, no responden de igual forma a los mismos agonistas. Por ejemplo, el laboratorio ha descrito que los canales TRPV2, TRPV3 y TRPA1 no se activan por LPA (Nieto-Posadas *et al.*, 2012). Cabe mencionar que Nieto-Posadas y colaboradores no observaron activación con el LPA en el canal TRPA1 debido a que se evaluó únicamente en la configuración *cell-attached* y, como se mencionó anteriormente, Kittaka y colaboradores determinaron que debido a que el sitio de unión es intracelular, el LPA solo es capaz de activar al TRPA1 en la configuración *inside-out*. De hecho, en este reporte Kittaka y colaboradores tampoco observaron activación cuando era aplicado desde la cara extracelular en la configuración de célula completa (Kittaka *et al.*, 2017).

Una de las funciones fisiológicas en las que se involucra al TRPV4 es en la generación de prurito en queratinocitos (Chen *et al.*, 2016). Aunque en este proyecto no evaluamos la importancia fisiológica de esta activación, en el grupo del Dr. Liedtke se determinó que la LPC genera prurito en ratones, por medio de la activación del canal TRPV4. Con el trabajo que realizamos como parte de la colaboración con este grupo, determinamos que LPC actúa directamente sobre TRPV4 y así es posible que se inicie la sensación de prurito. Aunque no se determinó que el LPA también produzca prurito a través de la activación del TRPV4,

esta sigue siendo una posibilidad que explorar, así como la de determinar que la activación del canal específicamente por LPA resulte en la generación de dolor.

## 8. Conclusiones

- ✧ El LPA 18:1 y la LPC 18:1 son agonistas endógenos del canal TRPV4.
- ✧ Se unen al canal a través de la arginina 746, en el «dominio TRP», el cual es el residuo correspondiente al sitio de unión del LPA en el TRPV1, la lisina 710.
- ✧ A diferencia del TRPV1, TRPV4 no presenta aumento de su conductancia por LPA.
- ✧ El LPA produce una probabilidad de apertura sustancialmente baja en comparación con GSK1016790A, por lo que se le considera un agonista parcial.
- ✧ La LPC, que no activa al TRPV1, disminuye la conductancia típica de TRPV4. Esto sugiere que se promueve un cambio conformacional distinto al que observamos cuando TRPV4 es activado con LPA.

## 9. Bibliografía

1. Aikawa, S., Hashimoto, T., Kano, K., & Aoki, J. (2015). Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *The Journal of Biochemistry*, 157(2), 81-89.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>
3. Alderton, F., Sambhi, B., Tate, R., Pyne, N. J., & Pyne, S. (2001). Assessment of agonism at G-protein coupled receptors by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid in human embryonic kidney 293 cells. *British journal of pharmacology*, 134(1), 6-9.
4. Alessandri-Haber, N., Yeh, J. J., Boyd, A. E., Parada, C. A., Chen, X., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2003). Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron*, 39(3), 497-511.
5. Andrade, Y. N., Fernandes, J., Vázquez, E., Fernández-Fernández, J. M., Arniges, M., Sánchez, T. M., Villalón, M. & Valverde, M. A. (2005). TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *J Cell Biol*, 168(6), 869-874.
6. Aoki, J., Inoue, A., & Okudaira, S. (2008). Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(9), 513-518.
7. Bang, S., Yoo, S., Yang, T. J., Cho, H., & Hwang, S. W. (2012). Nociceptive and pro-inflammatory effects of dimethylallyl pyrophosphate via TRPV4 activation. *British journal of pharmacology*, 166(4), 1433-1443.
8. Baratchi, S., Keov, P., Darby, W. G., Lai, A., Khoshmanesh, K., Thurgood, P., Vahidi, P., Ejendal, K. & McIntyre, P. (2019). The TRPV4 agonist GSK1016790A regulates the membrane expression of TRPV4 channels. *Frontiers in pharmacology*, 10.

9. Berna-Erro, A., Izquierdo-Serra, M., Sepúlveda, R. V., Rubio-Moscardo, F., Doñate-Macián, P., Serra, S. A., Castillo-García, J., Perálvez-Marín, A., González-Nilo, F., Fernández-Fernández, J.M. & Valverde, M. A. (2017). Structural determinants of 5, 6-epoxyeicosatrienoic acid binding to and activation of TRPV4 channel. *Scientific reports*, 7(1), 10522.
10. Berrout, J., Jin, M., Mamenko, M., Zaika, O., Pochynyuk, O., & O'Neil, R. G. (2012). Function of transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) as a mechanical transducer in flow-sensitive segments of renal collecting duct system. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 8782-8791
11. Blazer-Yost, B. L., Blacklock, B. J., Flaig, S., Bacallao, R. L., & Gattone, V. H. (2011). Lysophosphatidic acid is a modulator of cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(6), 1255-1264.
12. Cabral, P. D., Capurro, C., & Garvin, J. L. (2015). TRPV4 mediates flow-induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> in medullary thick ascending limbs. *Acta Physiologica*, 214(3), 319-328.
13. Caires, R., Sierra-Valdez, F. J., Millet, J. R., Herwig, J. D., Roan, E., Vásquez, V., & Cordero-Morales, J. F. (2017). Omega-3 fatty acids modulate TRPV4 function through plasma membrane remodeling. *Cell reports*, 21(1), 246-258.
14. Canul-Sánchez, J. A., Hernández-Araiza, I., Hernández-García, E., Llorente, I., Morales-Lázaro, S. L., Islas, L. D., & Rosenbaum, T. (2018). Different agonists induce distinct single-channel conductance states in TRPV1 channels. *The Journal of general physiology*, jgp-201812141.
15. Cao, S., Anishkin, A., Zinkevich, N. S., Nishijima, Y., Korishettar, A., Wang, Z., Fang, J., Wilcox, D.A., & Zhang, D. X. (2018). Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) activation by arachidonic acid requires protein kinase A-mediated phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M117.
16. Casas, S., Novials, A., Reimann, F., Gomis, R., & Gribble, F. M. (2008). Calcium elevation in mouse pancreatic beta cells evoked by extracellular

- human islet amyloid polypeptide involves activation of the mechanosensitive ion channel TRPV4. *Diabetologia*, 51(12), 2252-2262.
17. Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816.
  18. Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., & Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288(5464), 306-313.
  19. Chen, L., Kaßmann, M., Sendeski, M., Tsvetkov, D., Marko, L., Michalick, L., Riehle, M., Liedtke, W. B., Kuebler, W. M., Harteneck, C., Tepel, M., Patzak, A., & Gollasch, M. (2015). Functional transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential vanilloid 4 channels along different segments of the renal vasculature. *Acta Physiologica*, 213(2), 481-491.
  20. Chen, Y., Fang, Q., Wang, Z., Zhang, J. Y., MacLeod, A. S., Hall, R. P., & Liedtke, W. B. (2016). Transient receptor potential vanilloid 4 ion channel functions as a pruriceptor in epidermal keratinocytes to evoke histaminergic itch. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M116.
  21. Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517-524.
  22. Colquhoun, D. & F. J. Sigworth. (1985). Fitting and Statistical Analysis of Single-Channel Records, En: Sakmann, B. & E. Neher, *Single-Channel Recording*. Plenum Publishing Corporation, N.Y., USA. 191-263.
  23. Colquhoun, D., & Sivilotti, L. G. (2004). Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. *TRENDS in Neurosciences*, 27(6), 337-344.
  24. Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216), 285.
  25. Deng, Z., Paknejad, N., Maksaev, G., Sala-Rabanal, M., Nichols, C. G., Hite, R. K., & Yuan, P. (2018). Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal

- insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nature structural & molecular biology*, 1.
26. Everaerts, W., Nilius, B., & Owsianik, G. (2010). The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Progress in biophysics and molecular biology*, 103(1), 2-17.
  27. Flemming, P. K., Dedman, A. M., Xu, S. Z., Li, J., Zeng, F., Naylor, J., ... & Beech, D. J. (2006). Sensing of lysophospholipids by TRPC5 calcium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4977-4982.
  28. Garcia-Elias, A., Mrkonjić, S., Jung, C., Pardo-Pastor, C., Vicente, R., & Valverde, M. A. (2014). The TRPV4 channel. In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels* (pp. 293-319). Springer Berlin Heidelberg.
  29. Garcia-Elias, A., Mrkonjić, S., Pardo-Pastor, C., Inada, H., Hellmich, U. A., Rubio-Moscardó, F., Plata, C., Gaudet, R., Vicente, R., & Valverde, M. A. (2013). Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate-dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9553-9558.
  30. Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., & Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6408-6414.
  31. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European journal of physiology*, 391(2), 85-100.
  32. Harraz, O. F., Longden, T. A., Hill-Eubanks, D., & Nelson, M. T. (2018). PIP<sub>2</sub> depletion promotes TRPV4 channel activity in mouse brain capillary endothelial cells. *eLife*, 7.
  33. Hernandez-Araiza, I., Morales-Lázaro, S. L., Canul-Sánchez, J. A., Islas, L. D. & Rosenbaum, T. (2018). Role of lysophosphatidic acid in ion channel function and disease. *Journal of Neurophysiology*, 120(3), 1198-1211.

34. Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. Sunderland, MA. 814 pp.
35. Hille, B., Dickson, E. J., Kruse, M., Vivas, O., & Suh, B. C. (2015). Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), 844-856.
36. Ho, W. S. V., Zheng, X., & Zhang, D. X. (2015). Role of endothelial TRPV4 channels in vascular actions of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol. *British journal of pharmacology*, 172(22), 5251-5264.
37. Islas, L. D. 2015. Patch clamping and single-channel analysis. En: Zheng, J. & Trudeau, M., *Handbook of Ion channels*. 691 CRC Press. 69-78.
38. Jara-Oseguera, A., Llorente, I., Rosenbaum, T., & Islas, L. D. (2008). Properties of the inner pore region of TRPV1 channels revealed by block with quaternary ammoniums. *The Journal of general physiology*, 132(5), 547-562.
39. Jin, M., Wu, Z., Chen, L., Jaimes, J., Collins, D., Walters, E. T., O'Neil, R. G. (2011). Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS One* 6.2, e16713.
40. Kittaka, H., Uchida, K., Fukuta, N., & Tominaga, M. (2017). Lysophosphatidic acid-induced itch is mediated by signalling of LPA5 receptor, phospholipase D and TRPA1/TRPV1. *The Journal of physiology*, 595(8), 2681-2698.
41. Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Hudspeth, A. J., Friedman, J.M. & Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103(3), 525-535.
42. Lorenzo, I. M., Liedtke, W., Sanderson, M. J., & Valverde, M. A. (2008). TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), 12611-12616.
43. Lundbaek, J. A., & Andersen, O. S. (1994). Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *The Journal of General Physiology*, 104(4), 645-673.

44. Ma, X., He, D., Ru, X., Chen, Y., Cai, Y., Bruce, I. C., Xia, Q., Yao, X., & Jin, J. (2012). Apigenin, a plant-derived flavone, activates transient receptor potential vanilloid 4 cation channel. *British journal of pharmacology*, 166(1), 349-358.
45. Masuyama, R., Vriens, J., Voets, T., Karashima, Y., Owsianik, G., Vennekens, R., Lieben, L., Torrekens, S., Moermans, K., Vanden Bosch, A., Bouillon, R & Nilius, B. (2008). TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell metabolism*, 8(3), 257-265.
46. Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4), 1313-1323.
47. Moore, C., Gupta, R., Jordt, S. E., Chen, Y., & Liedtke, W. B. (2018). Regulation of pain and itch by TRP channels. *Neuroscience bulletin*, 1-23.
48. Morales-Lázaro, S. L., & Rosenbaum, T. (2015). A painful link between the TRPV1 channel and lysophosphatidic acid. *Life sciences*, 125, 15-24.
49. Morales-Lázaro, S. L., Llorente, I., Sierra-Ramírez, F., López-Romero, A. E., Ortiz-Rentería, M., Serrano-Flores, B., Islas, L. D., & Rosenbaum, T. (2016). Inhibition of TRPV1 channels by a naturally occurring omega-9 fatty acid reduces pain and itch. *Nature communications*, 7, 13092.
50. Morales-Lázaro, S. L., Serrano-Flores, B., Llorente, I., Hernández-García, E., González-Ramírez, R., Banerjee, S., Miller, D., Gududuru, V., Fells, J., Norman, D., Tigyi, G., Escalante-Alcalde, D., & Rosenbaum, T. (2014). Structural determinants of the transient receptor potential 1 (TRPV1) channel activation by phospholipid analogs. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M114.
51. Morales-Lázaro, S. L., Simon, S. A., & Rosenbaum, T. (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *The Journal of physiology*, 591(13), 3109-3121.
52. Muramatsu, S., Wakabayashi, M., Ohno, T., Amano, K., Ooishi, R., Sugahara, T., Shiojiri, S., Tashiko, K., Suzuki, Y., Nishimura, R., Kuhara, S., Sugano, S., Yoneda, T., & Matsuda, A. (2007). Functional gene screening

- system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32158-32167.
53. Narita, K., Sasamoto, S., Koizumi, S., Okazaki, S., Nakamura, H., Inoue, T., & Takeda, S. (2015). TRPV4 regulates the integrity of the blood-cerebrospinal fluid barrier and modulates transepithelial protein transport. *The FASEB Journal*, 29(6), 2247-2259.
54. Nieto-Posadas, A., Picazo-Juárez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lázaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L.D. & Rosenbaum, T. (2012). Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nature chemical biology*, 8(1), 78-85.
55. Nilius, B., & Voets, T. (2013). The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO reports*, 14(2), 152-163.
56. Nilius, B., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, J. & Voets, T. (2004). TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, C195-C205
57. Ojala, P. J., Hirvonen, T. E., Hermansson, M., Somerharju, P., & Parkkinen, J. (2007). Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 82(6), 1501-1509.
58. Ortíz-Rentería, M., Juárez-Contreras, R., González-Ramírez, R., Islas, L. D., Sierra-Ramírez, F., Llorente, I., Simon, S.A., Hiriart, M., Rosenbaum, T., & Morales-Lázaro, S. L. (2018). TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7), E1657-E1666.
59. Pablo, J. L., DeCaen, P. G., & Clapham, D. E. (2017). Progress in ciliary ion channel physiology. *The Journal of general physiology*, 149(1), 37-47.
60. Pagès, C., Simon, M. F., Valet, P., & Saulnier-Blache, J. S. (2001). Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 64(1-4), 1-10.
61. Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell calcium*, 38(3), 233-252.

62. Picazo-Juarez, G., Romero-Suarez, S., Nieto-Posadas, A., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Briggs, M., McIntosh, T.J., Simon, S. A., Ladrón-de-Guevara, E., Islas, L.D., & Rosenbaum, T. (2011). Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol-sensitivity to TRPV1. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M111.
63. Rosasco, M.G. & Gordon, S.E. (2017). TRP Channels: What do they look like? En: Rosenbaum, T.L. (Ed.). *Neurobiology of TRP Channels*. CRC Press/Taylor & Francis.
64. Rosenbaum, T., & Gordon, S. E. (2002). Dissecting intersubunit contacts in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Neuron*, 33(5), 703-713.
65. Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., & Gordon, S. E. (2004). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *The Journal of general physiology*, 123(1), 53-62.
66. Sivilotti, L. G. (2010). What single-channel analysis tells us of the activation mechanism of ligand-gated channels: the case of the glycine receptor. *The Journal of physiology*, 588(1), 45-58.
67. Smith, P. L., Maloney, K. N., Pothén, R. G., Clardy, J., & Clapham, D. E. (2006). Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* activates TRPV4 channels. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29897-29904.
68. Startek, J. B., Boonen, B., Talavera, K., & Meseguer, V. (2019). TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 371.
69. Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G., & Plant, T. D. (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature cell biology*, 2(10), 695-702.
70. Strotmann, R., Schultz, G., & Plant, T. D. (2003). Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a carboxy terminal calmodulin binding site. *Journal of Biological Chemistry*. 278(29), 26541–26549.

71. Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K., & Imai, M. (2003). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22664-22668.
72. Taberner, F. J., Fernández-Ballester, G., Fernández-Carvajal, A., & Ferrer-Montiel, A. (2015). TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(9), 1818-1827.
73. Takahashi, N., Hamada-Nakahara, S., Itoh, Y., Takemura, K., Shimada, A., Ueda, Y., Kitamata, M., Matsuoka, R., Hanawa-Suetsugu, K., Senju, Y., Mori, M. X., Kiyonaka, S., Kohda, D., Kitao, A., Mori, Y., & Suetsugu, S. (2014). TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P<sub>2</sub>. *Nature communications*, 5, 4994.
74. Thorneloe, K. S., Sulpizio, A. C., Lin, Z., Figueroa, D. J., Clouse, A. K., McCafferty, G. P., Chendrimada, T.P., Lashinger, E.S., Gordon, E., Evans, L., Misajet, B. A., Demarini, D.J., Nation, J.H., Casillas, L.N., Marquis, R.W., Votta, B.J., Sheardown, S.A., Xu, X., Brooks, D.P., Laping, N.J., & Westfall, T.D. (2008). N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[(2, 4-dichlorophenyl) sulfonyl] amino)-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl] carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(2), 432-442.
75. Tian, W., Salanova, M., Xu, H., Lindsley, J. N., Oyama, T. T., Anderson, S., Bachmann, S. & Cohen, D. M. (2004). Renal expression of osmotically responsive cation channel TRPV4 is restricted to water-impermeant nephron segments. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 287(1), F17-F24.
76. Tomilin, V., Mamenko, M., Zaika, O., & Pochynyuk, O. (2016). Role of renal TRP channels in physiology and pathology. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 38, No. 3, pp. 371-383). Springer Berlin Heidelberg.

77. Torres, V. E., & Harris, P. C. (2006). Mechanisms of disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases. *Nature clinical practice Nephrology*, 2(1), 40-55.
78. Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Bödding, M., Droogmans, G. & Nilius, B. (2002). Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33704-33710.
79. Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T., & Nilius, B. (2004). Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), 396-401.
80. Vriens, J., Owsianik, G., Janssens, A., Voets, T., & Nilius, B. (2007). Determinants of 4 $\alpha$ -phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12796-12803.
81. Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., & Nilius, B. (2002a). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47044-47051.
82. Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., Flockerzi, V., Droogmans, G., Benham, C.D., & Nilius, B. (2002b). Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13569-13577.
83. Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., & Nilius, B. (2003a). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*, 424(6947), 434-438.
84. Watanabe, H., Vriens, J., Janssens, A., Wondergem, R., Droogmans, G., & Nilius, B. (2003b). Modulation of TRPV4 gating by intra-and extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Cell calcium*, 33(5-6), 489-495.