



**Centro de Investigación de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**Papel del canal TRPV4 en el establecimiento y
regulación de las uniones estrechas de las células
de epitelio corneal RCE1(5T5)**

Presenta:

M. en C. Jacqueline Martínez Rendón

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

En la especialidad de:

Neurobiología Celular y Molecular

Directora de tesis:

Dra. María del Refugio García Villegas

Ciudad de México

Diciembre de 2016

Esta tesis se realizó en el laboratorio 38 del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. María del Refugio García Villegas. Este trabajo fue financiado en parte a través del donativo 219601 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al Dr. Federico Castro Muñoz Ledo.

Agradecimientos

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Jacqueline Martínez Rendón No. de Registro 209818.

A la Dra. Refugio García por su guía y apoyo durante la realización de este proyecto.

A los Drs. Federico Castro, León Islas, Gerardo Contreras, Javier Camacho, Marcelino Cerejido y José Luis Reyes, por sus recomendaciones y consejos en la elaboración de esta tesis.

A la Química Erika Sánchez-Guzmán y a la M en C. Penélope Magaña Hernández por su apoyo técnico en la realización de los experimentos con cultivos celulares, así como por su invaluable amistad.

A Ismael y Rafael por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A mi familia por estar siempre a mi lado, así como por el amor y confianza que me han mostrado siempre.

A mis amigas y compañeras de laboratorio: Gaby T, Gaby E y Susy por los buenos momentos que compartimos juntas, así como por sus consejos y observaciones en la realización de este trabajo.

INDICE

Resumen.....	4
Abstract.....	6
Introducción.....	8
Células de epitelio corneal de conejo RCE1(5T5).....	8
Canales de la familia TRP.....	11
El canal TRPV4.....	11
Características electrofisiológicas del canal TRPV4.....	15
Activación polimodal del canal TRPV4.....	15
Modulación por calcio.....	17
Modulación por fosforilación.....	18
Interacción del canal TRPV4 con otras proteínas.....	18
Funciones celulares asociadas a la actividad del canal TRPV4.....	19
TRPV4 en la regulación de la diferenciación.....	20
Uniones Estrechas.....	21
Componentes de las uniones estrechas.....	22
Claudinas.....	23
Ocludina.....	24
Modulación de las uniones estrechas por TRPV4.....	25
Canales de la familia TRP expresados en el epitelio corneal.....	28

Objetivo general	31
Objetivos particulares.....	31
Materiales y métodos	32
Resultados	46
Efecto de activadores y bloqueadores de canales TRPs en la proliferación y diferenciación de células RCE1(5T5).....	46
TRPV4 en la diferenciación de las células RCE1(5T5).....	59
Identificación de canales TRPs expresados en células RCE1(5T5).....	62
Cinética de expresión de los mRNA de los canales TRPV1, TRPV4 y TRPV6 en células RCE1(5T5).....	64
Inmunolocalización de canales Kv1.1, TRPV1, TRPV4 y TRPV6 en células RCE1(5T5).....	67
Cambio de localización subcelular del canal TRPV4 en células RCE1(5T5) durante la diferenciación.....	71
Cinética de expresión de TRPV4 en células RCE1(5T5)	74
Expresión funcional de TRPV4 en células RCE1(5T5).....	75
La función de TRPV4 es necesaria para el establecimiento y modulación de las uniones estrechas en el epitelio corneal.....	83
La activación de TRPV4 aumenta la cantidad de Claudina-4 en las TJ....	87
La activación de TRPV4 con GSK101 modifica su localización subcelular...	89
La actividad del canal TRPV4 es necesaria para la modulación de la TER ejercida por EGF en las células de epitelio corneal RCE1(5T5).....	91
La regulación de las uniones estrechas en epitelio corneal es específica	

del canal TRPV4.....	93
Expresión de TRPP2 en células RCE1(5T5) y colocalización con TRPV4.....	95
Expresión de receptor a EGF en células RCE1(5T5) y colocalización con el canal TRPV4.....	98
Discusión.....	101
Anexo.....	110
Construcción de plásmidos de expresión de shRNA de los canales TRPV1 y TRPV6 de conejo	110
Clonación del DNAc completo del canal TRPV4 de conejo.....	112
Clonación del canal Kv1.1.....	113
Expresión del canal EYFP-Kv1.1.....	115
Expresión funcional del canal EYFP-Kv1.1.....	116
Bibliografía.....	118

RESUMEN

En este proyecto realizamos la búsqueda farmacológica y molecular de canales iónicos de la familia TRPV involucrados en la regulación de la proliferación y la diferenciación de células epiteliales, para lo cual utilizamos la línea celular RCE1(5T5), derivada de epitelio corneal de conejo, que tiene la ventaja de reproducir *in vitro* la diferenciación de este epitelio.

Encontramos que las células RCE1(5T5) expresan los canales TRPV1, TRPV4, y TRPV6, siendo TRPV4 el más abundante. Este canal tiene un notable cambio de localización subcelular, en células proliferativas se expresa de forma homogénea en núcleo y citoplasma, mientras que en células diferenciadas se encuentra mayoritariamente en la membrana apical de la capa celular más externa del epitelio corneal.

TRPV4 es un canal catiónico, que se activa por temperaturas superiores a los 25°C, cambios hiposmóticos y mecánicos. Inicialmente evaluamos la funcionalidad del canal TRPV4 en las células RCE1(5T5), con indicadores de calcio fluorescentes, Demostramos que TRPV4 es funcional e induce un incremento de calcio intracelular en presencia de su activador específico GSK1016790A (100nM), el cual es abatido en presencia de RN-1734 (30 μ M) un inhibidor específico de este canal o bien por la presencia del quelante de calcio EGTA (2mM).

Una vez confirmada la expresión funcional del canal TRPV4, analizamos su posible participación en la diferenciación de las células RCE1(5T5) midiendo el desarrollo de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) del cultivo como una

forma de evaluar la formación de las uniones estrechas. El tratamiento con RN-1734 o con un shRNA específico contra el canal TRPV4 evita el incremento normal de la TER, demostrando que TRPV4 es necesario para el correcto establecimiento de las uniones estrechas. Adicionalmente, en el epitelio maduro, cuando el canal se localiza en la membrana apical de la capa de células más externa del epitelio, la activación de TRPV4 aumenta los valores de TER e incrementa la expresión de claudina-4 en las uniones estrechas indicando que TRPV4 es capaz de modular las uniones ya establecidas.

Se ha reportado que TRPV4 y TRPP2 forman un canal heteromérico, activado por EGF, por otro lado, la ausencia de EGF reduce la TER de cultivos de células de epitelio corneal RCE1(5T5). En este trabajo encontramos que la actividad de TRPV4 es necesaria para observar la regulación de la TER mediada por EGF y además colocaliza con TRPP2 en la región apical de la capa celular más externa del epitelio. En conclusión, nuestros resultados demuestran que la actividad del canal TRPV4 regula la diferenciación terminal de las células de epitelio corneal RCE1(5T5), ya que es requerida para el correcto establecimiento de las uniones estrechas, así como para la modulación de su función de barrera y respuesta a EGF.

ABSTRACT

In this project, we carried out the molecular and pharmacological screening for ionic channels belonging to the TRPV family involved in proliferation and differentiation. We used the spontaneously immortalized cell line RCE1(5T5), derived from rabbit corneal epithelium, because it reproduces *in vitro* the differentiation of this tissue.

We found that RCE1 cells expressed TRPV1, TRPV4 and TRPV6 channels, observing that TRPV4 showed a remarkable change of subcellular localization. In proliferative cells it is homogeneously expressed in nucleus and cytoplasm, whereas in differentiated cells it is found mainly in the apical membrane of the outermost cellular layer of the corneal epithelium.

TRPV4 is a cationic channel, activated by hypotonic cell swelling, heat, endogenous agonists like arachidonic acid and endocannabinoids. Initially we demonstrate by calcium imaging that TRPV4 is functional in RCE1(5T5) cells and it provokes an increment of intracellular calcium in the presence of its specific activator GSK1016790A (100 nM), which is avoided by treatment with RN1734 (30 μ M) a specific blocker of TRPV4 or EGTA (2mM).

Once the functional expression of the TRPV4 channel was confirmed, we analyzed its possible participation in the differentiation of the RCE1 cells (5T5) by measuring the development of Tight Junctions (TJ) by the recording of the Transepithelial Resistance (TER) of RCE1(5T5) cultures. The presence of RN1734 or shTRPV4 avoid the normal increment of TER demonstrating that TRPV4 is necessary for the

establishment of TJ. Additionally, in the mature epithelium, when the channel is localized to the apical membrane of the outermost layer of epithelial cells, activation of TRPV4 increases TER values and increases expression of claudin-4 in the tight junctions indicating that TRPV4 is able to modulate the established junctions.

It has been reported that TRPV4 can form a functional heteromeric channel with TRPP2, which can be activated by EGF. On the other hand, EGF depletion reduces the TER in RCE1(5T5) cells. In this study we found that TRPV4 is necessary for the EGF modulation of TER and also colocalizes with TRPP2 in the apical region of the outermost cell layer of the epithelium.

In conclusion, our results demonstrate that the activity of TRPV4 channel regulates the terminal differentiation of corneal epithelial cells RCE1 (5T5), since it is required for the correct establishment of the tight junctions, as well as for the modulation of its barrier function and response to EGF.

INTRODUCCION

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que regulan el flujo de iones a través de la membrana plasmática, su función se ha estudiado principalmente en células excitables, como las neuronas en donde se sabe que se encargan de generar y propagar los potenciales de acción, o bien en las células musculares donde se encargan de transmitir los estímulos eléctricos que regulan la contracción muscular (Catterall, 2010). Sin embargo en los últimos años se ha descrito que los canales iónicos se expresan prácticamente en todos los tipos de células y que participan en la regulación de diferentes procesos como: migración, proliferación, y diferenciación, entre otros (Clapham, 2003).

Células de epitelio corneal de conejo RCE1(5T5)

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar canales iónicos que podrían estar involucrados en la regulación de la proliferación y la diferenciación de células epiteliales, para lo cual utilizamos como modelo de estudio a la línea celular RCE1(5T5) derivada de epitelio corneal de conejo.

La línea celular RCE1(5T5) fue obtenida mediante la realización de cultivo serial, el cual, en el pasaje 14 sufrió una crisis que llevó al establecimiento de una población heteroploide, de crecimiento regulado, que reproduce *in vitro* la diferenciación del epitelio corneal (Castro-Munozledo, 1994). Adicionalmente por estudios realizados en colaboración por la Dra. García-Villegas y el Dr. Castro-MunozLedo sabemos que esta línea celular expresa de manera secuencial los marcadores de diferenciación Pax6, lactato deshidrogenasas (LDH) y la

citoqueratina K3 (Garcia-Villegas et al., 2009; Hernandez-Quintero et al., 2002), lo que permite seguir molecularmente el grado de diferenciación del cultivo, por lo que es un buen modelo para el estudio de los procesos de proliferación y diferenciación epitelial.

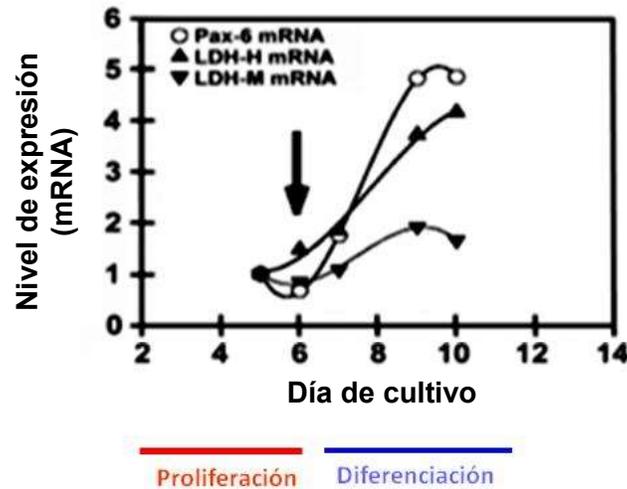


Fig. 1. Expresión de los marcadores de diferenciación Pax 6 y LDH en células RCE1(5T5). Las células RCE1(5T5) expresan de manera secuencial los marcadores Pax 6 y LDH, en la gráfica se puede observar que una vez que las células alcanzan la confluencia (sexto día de cultivo) entran en el proceso de diferenciación donde Pax 6 es el marcador de diferenciación más temprano identificado. Modificado de García-Villegas *et al.*, 2009.

Las células RCE1(5T5) crecen en forma de colonias, las cuales, al llegar a confluencia al sexto día de cultivo, inician la expresión del programa de diferenciación, este proceso se ve evidenciado por el aumento de la expresión de Pax 6, el gen maestro de la diferenciación del ojo, (figura 1); posteriormente las células comienzan a estratificar hasta formar un epitelio diferenciado de 3 a 5 capas de células, al décimo día de cultivo. En este epitelio se puede observar un gradiente de diferenciación, donde en el estrato basal se encuentran las células

proliferativas y el estrato superior es el que contiene las células con mayor grado de diferenciación (Garcia-Villegas et al., 2009).

Inicialmente se evaluó la expresión de canales iónicos de la familia Kv1 en las células RCE1(5T5) así como su posible participación en la proliferación celular, observando que las células RCE1(5T5) expresan los RNA mensajeros de los canales Kv1.1, Kv1.4 y Kv1.6. Adicionalmente se observó que el bloqueador general de canales de potasio Tetraetilamonio (TEA) a concentración de 10 mM, disminuye la proliferación de las células RCE1(5T5), sugiriendo así la posible participación de alguno de los canales de la familia Kv en la proliferación de las células RCE1(5T5). (González, 2009) Posteriormente se analizó el efecto de otros bloqueadores farmacológicos que actúan sobre algunos grupos de específicos de la familia de canales Kv1 como (margatoxina 100 nM, dendrotoxina 1 μ M y 4-AP 5 mM). No se observaron efectos sobre la cinética de crecimiento de cultivos de células RCE1(5T5) descartando así la participación de los canales Kv1.1, Kv1.3, o Kv1.6 en la proliferación de esta línea celular. (Martínez-Rendón, 2009)

En cuanto a canales de calcio expresados en este modelo de epitelio corneal, experimentos adicionales descartaron la expresión de los canales de calcio dependientes de voltaje Cav1.1, 1.2, 1.3 y 1.4 en las células RCE1(5T5) (Aquino-Jarquín, G., resultados no publicados). Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la expresión de canales TRPV y su participación en la proliferación y/o diferenciación del epitelio corneal.

Canales de la familia TRP

Los canales iónicos de la familia TRP son proteínas transmembranales que regulan la entrada de cationes a las células, (Nilius and Flockerzi, 2014). Hasta el momento se han descrito en mamíferos 28 genes de esta familia, los cuales están distribuidos en 6 subfamilias: TRPC (canónicos), TRPV (vaniloides), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) y TRPA (anquirina) (Venkatachalam and Montell, 2007).

La subfamilia de canales TRPV se ha dividido en cuatro grupos, con base en su estructura y función; TRPV1/TRPV2, TRPV3, TRPV4 y TRPV5/TRPV6. Los canales TRPV1 a TRPV4 se caracterizan por ser canales termosensibles, de activación polimodal y son considerados canales catiónicos no selectivos ya que son modestamente permeables a calcio, con un ratio de permeabilidad de P_{Ca}/P_{Na} entre 1 y 10 (Clapham, 2003). TRPV5 y TRPV6 son los únicos canales de la familia TRP altamente selectivos a Ca^{2+} con un ratio $P_{Ca}/P_{Na} > 100$ (Everaerts et al., 2010a)

El canal TRPV4

El gen que codifica para el canal TRPV4 de humano se encuentra localizado en el cromosoma 12q23-24q.1. La región codificante contiene 15 exones, que codifican para una proteína de 871 aminoácidos. Hasta el momento se han reportado 5 isoformas producto del procesamiento alternativo del RNA mensajero, denominadas TRPV4-A a TRPV4-E.

TRPV4A es la isoforma más larga y junto con TRPV4D (caracterizada por la delección de parte del exón 2, $\Delta 27-61$ aa) son las únicas que se insertan en la membrana plasmática. Las demás variantes codifican para proteínas más cortas con delecciones en el extremo amino: TRPV4B no contiene el exón 7 ($\Delta 384-444$ aa), la TRPV4C carece del exón 5 ($\Delta 237-284$) y la isoforma TRPV4E no cuenta con los exones 5 y 7 ($\Delta 237-284$ y $\Delta 384-444$), ver figura 2. Estas delecciones modifican la oligomerización y localización subcelular del canal (Arniges et al., 2006; Everaerts et al., 2010a).

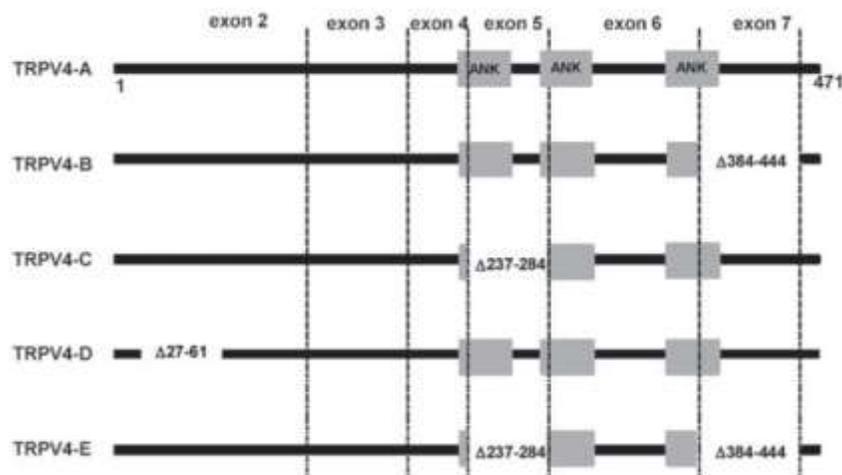


Fig 2. Representación esquemática de las isoformas del canal TRPV4. Hasta el momento se han descrito 5 isoformas producto del procesamiento alternativo del mensajero del canal TRPV4, denominadas TRPV4 A a E, la isoforma TRPV4A es la más larga. TRPV4B tiene deletado el exón 7 ($\Delta 384-444$ aa), la TRPV4C carece del exón 5 ($\Delta 237-284$), TRPV4D se caracteriza por la delección de parte del exón 2, $\Delta 27-61$ aa, y la isoforma TRPV4E no cuenta con los exones 5 y 7 ($\Delta 237-284$ y $\Delta 384-444$) Tomado de Arniges et al., 2006.

El canal TRPV4 se encuentra formado por 4 subunidades, las cuales se pueden agrupar formando homo y/o heterotetrámeros, cada una de estas subunidades está constituida por 6 pases transmembranales, denominados TM1 a TM6, donde

el asa localizada entre los dominios TM5 y TM6 es la encargada de formar el poro de selectividad mientras que los dominios TM3 y TM4 constituyen el sitio de unión de agonistas, principalmente los derivados del forbol como 4- α PDD (Nilius and Voets, 2013). Los extremos amino y carboxilo se encuentran dirigidos hacia el citoplasma, y cuentan con diversos sitios funcionales de unión a varias proteínas.

En el extremo amino se localiza un dominio rico en prolinas (PRD), implicado en la mecano sensibilidad del canal, en la interacción con PACSINA 3 (D'Hoedt et al., 2008), así como en la modulación de la actividad del canal por PKC (de sus siglas en inglés protein kinasa C). La delección del dominio PRD vuelve al canal TRPV4 insensible a la activación por estimulación mecánica, osmótica así como a la activación por 4 α PDD (Garcia-Elias et al., 2013).

Posterior a la región rica en prolinas, se localizan 6 repetidos de anquirina, los cuales son importantes para la tetramerización (Gaudet, 2008), la modulación de la actividad eléctrica del canal (Auer-Grumbach et al., 2010) así como para su interacción con el citoesqueleto de actina (Denker and Barber, 2002).

En el extremo amino también se encuentra un sitio de unión de PIP2 (fosfatidilinositol-4,5 bifosfato) conocido como sitio PIBS. Al interactuar el PIP2 con el dominio PIBS del canal TRPV4, los extremos del canal toman una configuración extendida, lo que favorece su activación por hipoosmolaridad y calor; la delección de este sitio funcional, favorece que los extremos del canal tomen una configuración compacta, lo que evita la activación del canal (Garcia-Elias et al., 2013).

En el extremo carboxilo se encuentran: la caja TRP; el sitio de interacción con calmodulina, que es importante para la modulación del canal por calcio intracelular (Strotmann et al., 2003); el sitio de interacción con proteínas de unión a citoesqueleto como MAP7 (Suzuki et al., 2003), actina y tubulina (Goswami et al., 2010); el sitio de fosforilación Ser-824 que participa en la modulación de la actividad del canal, en su localización en la membrana y en su interacción con actina y tubulina (Chun et al., 2012); así como un dominio PDZ-like que le permite interactuar con una gran variedad de proteínas (Garcia-Elias et al., 2013) (figura 2). Un canal funcional se encuentra constituido por 4 subunidades, las cuales pueden ser idénticas (homotetrámeros), o bien subunidades pertenecientes a otras subfamilias de canales TRP (heterotetrámeros) (Hofmann et al., 2002). Por ejemplo, puede formar heterotetrámeros con subunidades de los canales TRPP2 (Kottgen et al., 2008) y TRPC1 (Ma et al., 2011; Ma et al., 2010) (figura 3).

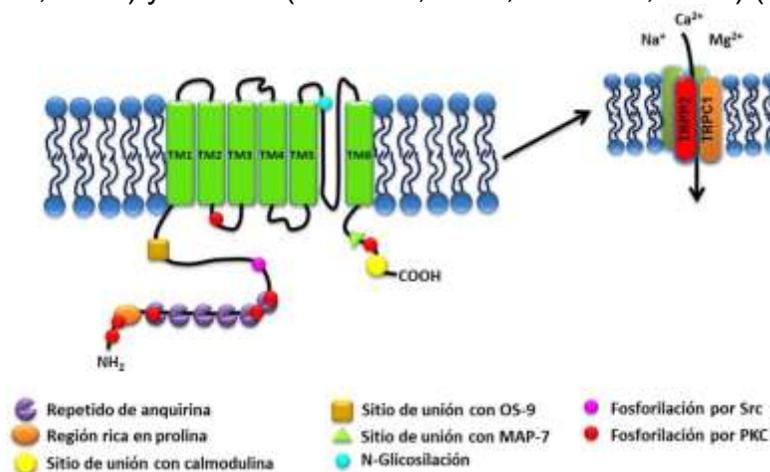


Fig.3. Representación esquemática del canal TRPV4. El canal TRPV4 se encuentra constituido por 4 subunidades transmembranales, formadas cada una de ellas por 6 dominios transmembranales (TM1-TM6), con los dominios amino y carboxilo hacia la parte citoplasmática y contiene en ellos diversos sitios funcionales que le permiten interactuar con otras proteínas que regulan su localización subcelular (OS-9 y MAP7), o bien que modulan su actividad eléctrica (fosforilaciones por Src y PKC). El asa localizada entre los dominios TM5 y TM6 forma el poro de selectividad.

Características electrofisiológicas del canal TRPV4

TRPV4 es un canal catiónico no selectivo con permeabilidad a Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^{+} tiene una conductancia unitaria de 80-100 pS en corriente entrante y de 30-60 pS en la corriente saliente, además en una curva I/V (corriente-voltaje), en configuración de célula completa se puede observar rectificación en ambas corrientes, la cual es dependiente de la concentración extracelular de calcio, ver figura 4 (Voets et al., 2002; Watanabe et al., 2002a).

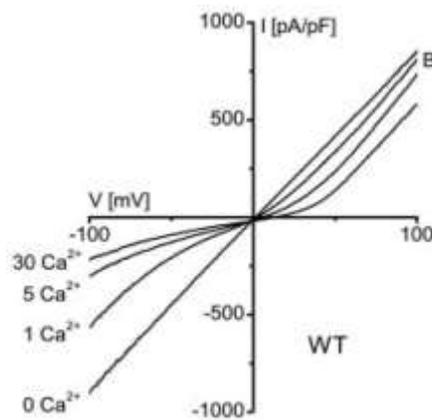


Fig.4. Curva I/V del canal TRPV4. Relación corriente voltaje del canal TRPV4 en presencia de las diferentes concentraciones de calcio indicadas, en las que se puede observar la presencia de rectificación entrante y saliente dependiendo de la concentración de calcio extracelular. Tomado de Voets et al., 2002

Activación polimodal del canal TRPV4

TRPV4 fue descrito en primera instancia como un canal activado por hipoosmolaridad (Liedtke et al., 2000; Liedtke and Friedman, 2003; Liedtke et al., 2003; Strotmann et al., 2000), actualmente se conoce que es un canal de activación polimodal (Everaerts et al., 2010a; Nilius et al., 2004), el cual puede ser activado por diversos estímulos relacionados principalmente con la percepción del

medio ambiente como lo son: calor moderado (24-27°C) (Nilius et al., 2001; Watanabe et al., 2002b), estimulación mecánica (Liedtke et al., 2003), disminución en el volumen celular (Nilius et al., 2001), incremento en la concentración de calcio intracelular (Strotmann et al., 2003) así como por la interacción con otras proteínas.

El canal TRPV4 también puede ser activado por: ligandos endógenos como endocannabinoides y metabolitos del ácido araquidónico (Watanabe et al., 2003b). Como la mayoría de los TRP el canal TRPV4 puede ser activado por compuestos naturales como; bisandrographoline A (BAA), extractos de la planta *Andrographis paniculata*, planta tradicional de la herbolaria china (Smith et al., 2006); así como por los agonistas sintéticos específicos 4 α -PDD (Watanabe et al., 2002a) y GSK1016790A, (figura 5), (Jin et al., 2011; Thorneloe et al., 2008).

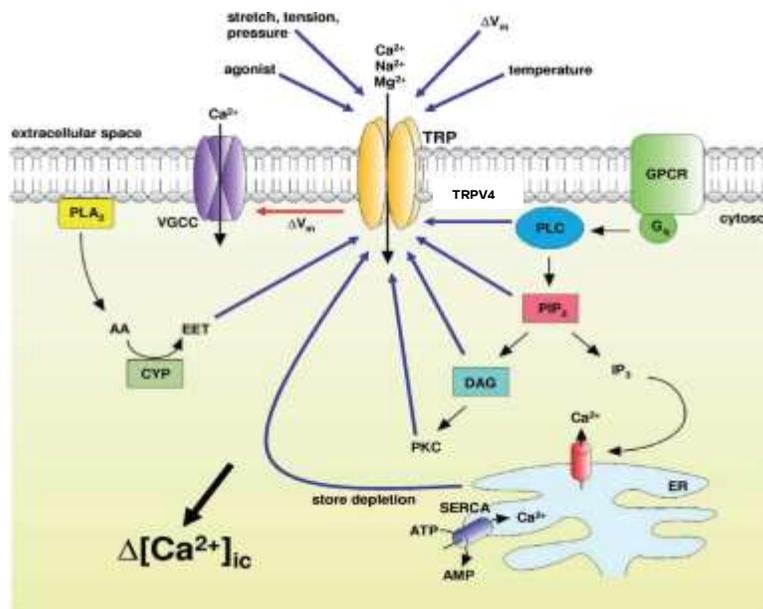


Fig. 5. TRPV4 canal catiónico de activación polimodal. La actividad del canal TRPV4 puede ser modulada por diversos estímulos intra o extracelulares, los cuales están relacionados a la percepción del medio ambiente. Tomado de Boesmans, et al., 2011

Entre los inhibidores o antagonistas para este canal, se encuentran los antagonistas específicos RN-1734 y RN-1747 (Vincent et al., 2009; Vincent and Duncton, 2011). así como el rojo de rutenio bloqueador general de canales TRP, el cual actúa bloqueando el poro del canal TRPV4.

Modulación de la actividad del canal TRPV4 por calcio

Otro importante modulador de la actividad del canal TRPV4 es el Ca^{2+} , tanto intra como extracelular. Se sabe que el calcio extracelular es el responsable de la rectificación, observada en las curvas I/V de las corrientes de TRPV4, en configuración de célula completa (figura 4) (Watanabe et al., 2002a). El efecto del Ca^{2+} intracelular depende de su concentración, ya que puede potenciar o disminuir la actividad eléctrica del canal. Por ejemplo, durante la activación de TRPV4 con 4 α -PDD se genera una corriente entrante de calcio, la cual disminuye a través del tiempo; esta disminución de la corriente es debida a la desensibilización del canal, mediada por el incremento de calcio intracelular y se ha propuesto que depende de la interacción de la calmodulina con el extremo carboxilo de TRPV4. Adicionalmente se ha reportado que el sitio de unión a calmodulina también es importante para la activación constitutiva del TRPV4 (Strotmann et al., 2003), por lo que el incremento de calcio intracelular, podría ser responsable, al menos en parte, de la actividad espontánea del canal (Watanabe et al., 2003a).

Modulación por fosforilación.

El canal TRPV4 puede ser activado y/o modulado por fosforilación de diversas cinasas como; PKC (Watanabe et al., 2003a; Xu et al., 2003a) y PKA (de sus siglas en inglés protein kinasa A). En ambos casos la fosforilación por estas enzimas incrementa la actividad eléctrica del canal a través de la interacción con la proteína de andamiaje AKAP79 (Fan et al., 2009).

Adicionalmente se ha reportado que la fosforilación de TRPV4 por PKA favorece la localización del canal en la membrana de células de túbulo colector (Mamenko et al., 2013).

Src (tirosina quinasa) es otra de las cinasas que pueden modular la actividad del canal TRPV4 (Alessandri-Haber et al., 2008; Xu et al., 2003b). Se ha reportado que la fosforilación de TRPV4 por Src es necesaria para la activación del canal bajo diferentes estímulos. Uno de los sitios de fosforilación más relevantes es la tirosina 110 (Y110) la cual modula la activación por calor, estimulación mecánica e hipoosmolaridad (Wegierski et al., 2009).

Interacción del canal TRPV4 con otras proteínas.

La interacción del canal TRPV4 con PACSIN3, es uno de los ejemplos de la modulación del canal TRPV4 por la interacción con proteínas, PACSIN3 es una proteína que regula endocitosis (Modregger et al., 2000). Al interactuar con el canal TRPV4 incrementa la cantidad de canal localizado en membrana plasmática inhibiendo su activación por hipoosmolaridad y por temperatura (Cuajungco et al., 2006; D'Hoedt et al., 2008)..

Otra proteína importante en la regulación del canal TRPV4 es OS-9, una proteína residente del retículo endoplásmico encargada de seleccionar las proteínas que van a ser degradadas. Al interactuar OS-9 con monómeros de TRPV4, ocasiona su retención en el retículo endoplasmático, reduciendo la cantidad de canal presente en membrana plasmática, (Wang et al., 2007).

Funciones celulares asociadas a la actividad del canal TRPV4

Se ha reportado que TRPV4 está involucrado en varias funciones celulares como la mecanosensación (Gao et al., 2003; Nilius et al., 2001); la termorregulación (Lee et al., 2005; Todaka et al., 2004) la nocicepción y la neuroinflamación (Alessandri-Haber et al., 2008; Alessandri-Haber et al., 2003),

Por otro lado, el canal TRPV4 ha sido involucrado en la regulación de diferentes funciones celulares como la liberación de ATP a través de hemicanales de conexinas y panexinas, y la modulación de la actividad de la bomba Na-K-ATPasa (Shahidullah et al., 2012), en la diferenciación de fibroblastos y osteoclastos (Adapala et al., 2013; Masuyama et al., 2008), en la remodelación de F-actina (Shin et al., 2012), migración (Martin et al., 2012), así como también participa en las vías de dolor producido por daño inducido por radiación UV en la piel (Moore et al., 2013), y adicionalmente se ha visto asociado a la regulación de la formación de las uniones adherentes y uniones estrechas en epitelio epidermal (Sokabe et al., 2010).

TRPV4 en la regulación de la diferenciación

Masumaya *et al.*, en 2008 reportaron que la entrada de calcio por el canal TRPV4 es necesaria para la diferenciación terminal de osteoblastos, en los cuales en un estadio temprano de diferenciación, la interacción de RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B) con RANK (receptor activador para el factor nuclear κ B) induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico produciendo, oscilaciones de la concentración de calcio intracelular y la activación de calcineurina (serina-treonina fosfatasa dependiente de calcio), la cual activa y favorece la translocación del factor de transcripción NFATc1 (de sus siglas en inglés Nuclear factor of activated T-cells) al núcleo, induciendo la transcripción de genes que participan en la fase temprana de la diferenciación de los osteoclastos. Adicionalmente en un estadio tardío de la diferenciación es necesaria la entrada de calcio por el canal TRPV4 para la activación de calcineurina y NFATc1 así como su translocación al núcleo, induciendo la transcripción sostenida de genes involucrados en la diferenciación terminal de los osteoclastos, ver figura 6.

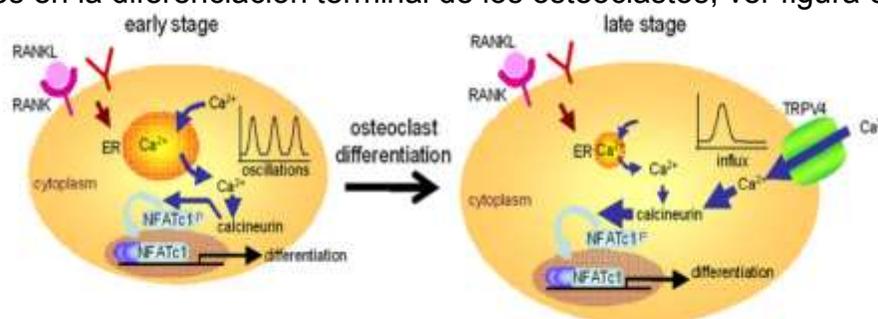


Fig. 6. La entrada de calcio por el canal TRPV4 modula la diferenciación terminal en osteoclastos. En la imagen se puede observar durante la primera etapa de diferenciación de los osteoclastos la interacción de RANKL con su receptor induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico, generando oscilaciones de calcio la cual induce la translocación de NFAT al núcleo y la transcripción mediada por NFAT. En la segunda etapa, al interactuar RANKL con su receptor, es necesaria la entrada de calcio por el canal TRPV4 para la activación de calcineurina la cual activa al factor NFATc1, favoreciendo su translocación al núcleo y la transcripción sostenida de genes involucrados en la diferenciación terminal de los osteoclastos. Tomado de Masumaya *et al.*, 2008

Uniones estrechas

La diferenciación es uno de los procesos celulares más estudiados debido a que confiere a la célula las características fenotípicas y funcionales que le permitirán tomar un papel específico en un determinado órgano y/u organismo. En las células epiteliales el desarrollo y establecimiento de las uniones estrechas (TJ por sus siglas en inglés) es un proceso clave en la regulación de la diferenciación (Aijaz et al., 2006; Balda and Matter, 2009; Cereijido et al., 1989; Kirschner et al., 2012; Tsukita and Furuse, 2002), debido a que además de sellar el espacio entre las células (Farquhar and Palade, 1963), le confieren la polaridad a las células, regulan el flujo paracelular de iones, agua y algunas macromoléculas (Colegio et al., 2002; Rosenthal et al., 2010; Tsukita et al., 2001) manteniendo la homeostasis en el organismo y formando una barrera contra posibles agentes agresores (Cereijido et al., 2000). El sellado de estas uniones celulares puede ser evaluado mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TER), cuyo valor es directamente proporcional a la hermeticidad de las TJ (Cereijido et al., 1978).

Las TJ son estructuras anatómicas constituidas por lípidos y proteínas. En un epitelio simple las uniones estrechas se encuentran localizadas en la región apical de los contactos celulares, mientras que en un epitelio estratificado se encuentran en la región apical de los contactos celulares de la capa de células más externa (Tsukita and Furuse, 2002), figura 7. Mediante el análisis por microscopía electrónica con la técnica de criofractura, las TJ se observan como fibras o cinturones que rodean a las células y sellan el espacio célula-célula (Anderson and Van Itallie, 2009).

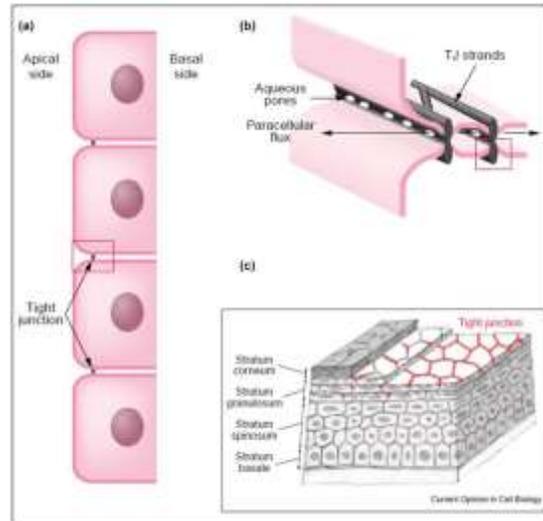


Fig. 7. Representación esquemática de las uniones estrechas. Las uniones estrechas se encuentran localizadas en la parte apical de los contactos celulares en las células epiteliales (a) sellando el espacio célula-célula y formando una barrera que regula el flujo de iones, agua y algunas macromoléculas a través de la vía paracelular (b) En epitelios estratificados las uniones estrechas se localizan en la capa celular más externa del tejido. Modificado de Tsukita y Furuse 2002

Componentes de la unión estrecha

Las uniones estrechas se encuentran constituidas por dos tipos de moléculas: las proteínas integrales de membrana que son las que forman propiamente las uniones entre las que se encuentran las claudinas y la ocludina; y las proteínas adaptadoras que se encargan de unir a las proteínas integrales de membrana con el citoesqueleto de actina entre ellas encontramos a las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (Gonzalez-Mariscal et al., 2007)

Claudinas

Las claudinas son el componente principal de las uniones estrechas (Furuse et al., 2002; Tsukita and Furuse, 1998). Hasta el momento se han identificado 27 miembros de esta familia en células de mamífero; su peso molecular oscila entre los 20 y los 34 kDa (Lal-Nag and Morin, 2009).

Las claudinas son proteínas con cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares que son las que determinan la permeabilidad a iones, agua y diferentes solutos. Los dominios amino y carboxilo terminal se encuentran orientados hacia el citoplasma, y en la región carboxilo terminal contiene dominios PDZ con los que puede interactuar directamente con proteínas de andamiaje como ZO-1,-2 y -3 (Findley and Koval, 2009) (figura 8).

La localización de las claudinas, así como su inserción en las uniones estrechas puede ser regulada por la fosforilación de residuos de serina o treonina de la región carboxilo terminal. Esta fosforilación puede ser mediada por PKC, sin embargo hasta el momento su modulación por PKC es aún controversial, pues se han observado efectos diferenciales dependiendo de la línea celular así como de la isoforma de la PKC de la que se trate (Banan et al., 2005; D'Souza et al., 2007; Kojima and Sawada, 2012; Sjo et al., 2010).

La expresión de las claudinas es tejido específica, las uniones estrechas están constituidas por una mezcla de diferentes isoformas de claudinas, la combinación de claudinas expresadas determina las propiedades de barrera de un determinado epitelio (Furuse, 2010).

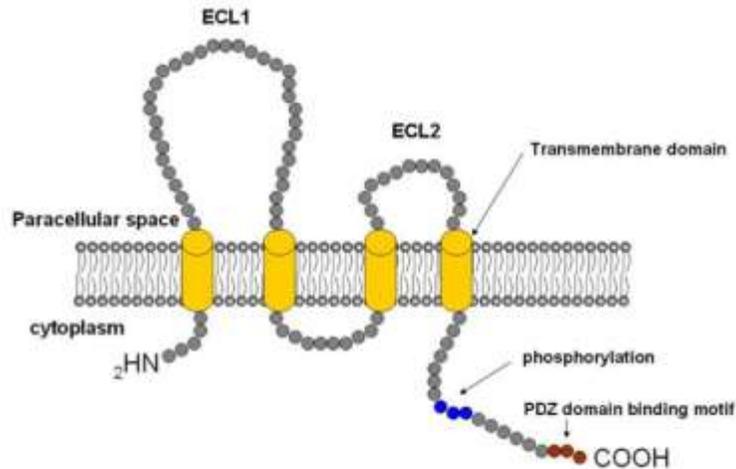


Fig. 8. Representación esquemática de las claudinas. Las claudinas son los componentes principales de las uniones estrechas ya que forman parte de la barrera que regula el flujo de iones, agua y algunas macromoléculas a través de la vía paracelular. Se encuentran constituidas por cuatro dominios transmembranales, 2 asas extracelulares (ECL1 y 2) y sus dominios amino y carboxilo terminal se encuentran orientados hacia el citoplasma (Hu et al., 2013).

Ocludina

Es uno de los principales componentes de la unión estrecha, fue descrita en 1993 por Furuse *et al.*, pesa aproximadamente 65 kDa, contiene cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares y los dominios amino y carboxilo terminales localizados en el citoplasma. En la región carboxilo terminal contiene un dominio coiled-coil con el que interactúa con los dominios PDZ de ZO-1,-2 y -3; adicionalmente en este segmento contiene múltiples residuos de serina y treonina susceptibles a ser fosforilados, lo cual es importante para la regulación de las uniones estrechas, ya que la ocludina fosforilada se localiza selectivamente ensamblada en las uniones estrechas (Furuse et al., 1993; Sakakibara et al., 1997), ver figura 9.

Estudios *in vivo* ponen de manifiesto que la expresión de ocludina no es esencial para la formación de las uniones estrechas (Saitou et al., 1998), ya que su ausencia no modifica la morfología de las TJ. Sin embargo, el ratón deficiente en ocludina presenta diferentes anomalías como inflamación crónica, calcificación cerebral y atrofia testicular, lo que sugiere que el gen de ocludina es indispensable durante el desarrollo del organismo (Saitou et al., 2000).

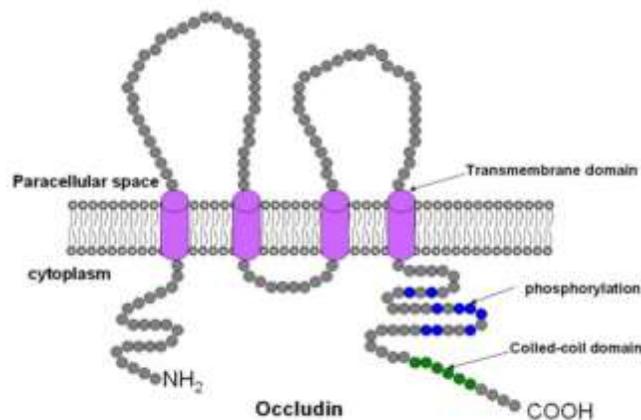


Fig. 9. Representación esquemática de ocludina. La ocludina es uno de los componentes de las uniones estrechas. Se encuentra constituida por cuatro dominios transmembranales, dos asas extra celulares, con los dominios amino y carboxilo terminales localizados en el citoplasma, en el extremo carboxilo cuenta con un dominio coiled-coil. Tomado de Hu et al., 2013

Modulación de las uniones estrechas por TRPV4.

Se ha reportado que el canal TRPV4 participa en la regulación de la formación de los contactos celulares así como en la modulación de la función de barrera tanto de células endoteliales (Cioffi et al., 2009; Everaerts et al., 2010b; Wu et al., 2009) como de células epiteliales (Akazawa et al., 2013; Kida et al., 2012; Reiter et al., 2006; Sokabe et al., 2010).

En queratinocitos epidermales se ha visto que el canal TRPV4 contribuye a la formación y mantenimiento de la función de barrera de la piel. En este epitelio la activación del canal TRPV4 incrementa la concentración de calcio intracelular, lo que induce la activación de Rho (pequeña GTPasa relacionada con la regulación de control del ciclo celular, y en la organización del citoesqueleto) y promueve la organización de las fibras de actina así como la formación de las uniones adherentes, y posteriormente las uniones estrechas a través de la formación del complejo de E-caderina y β -catenina, aumentando así la integridad de la barrera de la piel (Sokabe and Tominaga, 2010).

Adicionalmente, la activación del canal TRPV4 aumenta el sellado de las uniones estrechas en queratinocitos epidermales de humano, observando un aumento de la expresión de la ocludina y la claudina-4, proteínas estructurales de las uniones estrechas, así como la activación de los factores reguladores de estas uniones celulares como la PKC ζ fosfoatípica (Akazawa et al., 2013).

Por otro lado, la activación del canal TRPV4 en células HC11 de epitelio mamario de ratón, incrementa la permeabilidad paracelular y disminuye la expresión de las claudinas -1, -3, -4, -5, -7 y -8 (Reiter et al., 2006). Este efecto es también observado en células de endotelio pulmonar (Cioffi et al., 2009; Wu et al., 2009) y el células de epitelio alveolar (Alvarez et al., 2006) en donde la activación del canal TRPV4 incrementa la permeabilidad paracelular.

En estudios realizados por Ortiz-Melo y colaboradores (2012) se demostró que las células RCE1(5T5) forman TJ funcionales, como se muestra en la figura 10; y que

expresan Ocludina (figura 10B), claudina -1 (figura 10E), claudina -4 (figura 10C), así como ZO-1 (figura 10D), y cingulina (figura 10F) las cuales se expresan en la parte apical de la región de unión célula-célula de la capa celular superficial del epitelio corneal sugiriendo su posible participación en la formación de las uniones estrechas de este epitelio (figura 10G-J).

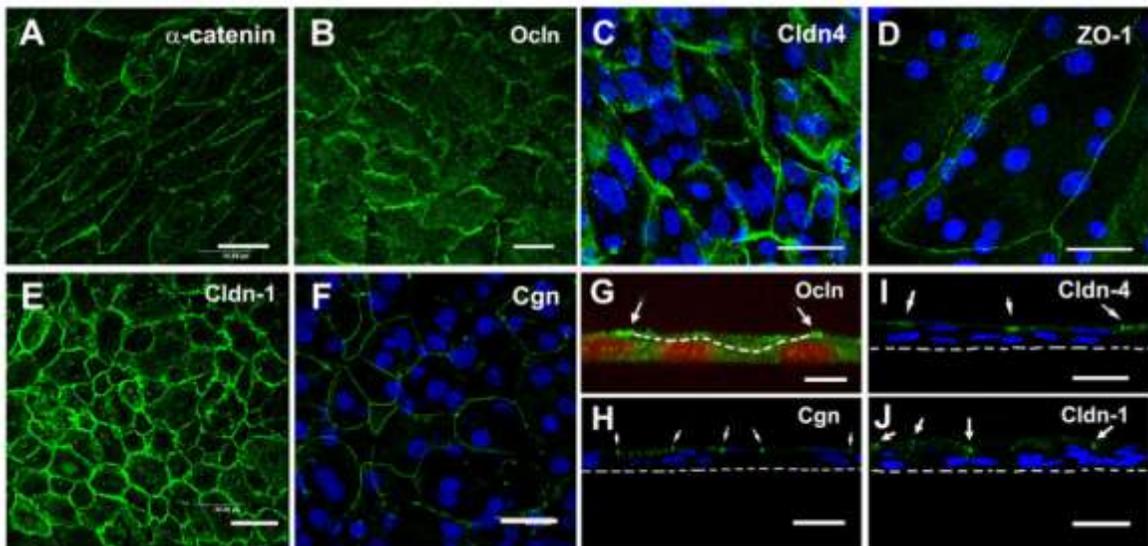


Fig. 10. Expresión de proteínas de la unión estrecha en células RCE1(5T5). Inmunofluorescencia de las células RCE1(5T5) de 7 días en cultivo para α -catenina (A) componente de las uniones adherentes. Ocludina y claudina-1(E), -4 (C), ZO-1 (D) y cingulina (F) en células RCE1(5T5) de 14 días de cultivo, las cuales se observan en los bordes celulares en la capa apical del epitelio, lo cual es más evidente en los cortes transversales G-J. Tomado de Ortiz-Melo et al., 2012.

Adicionalmente Ortiz-Melo también reportó que la eliminación del EGF en el medio de cultivo de RCE1(5T5) reduce los niveles de TER, ver figura 11.

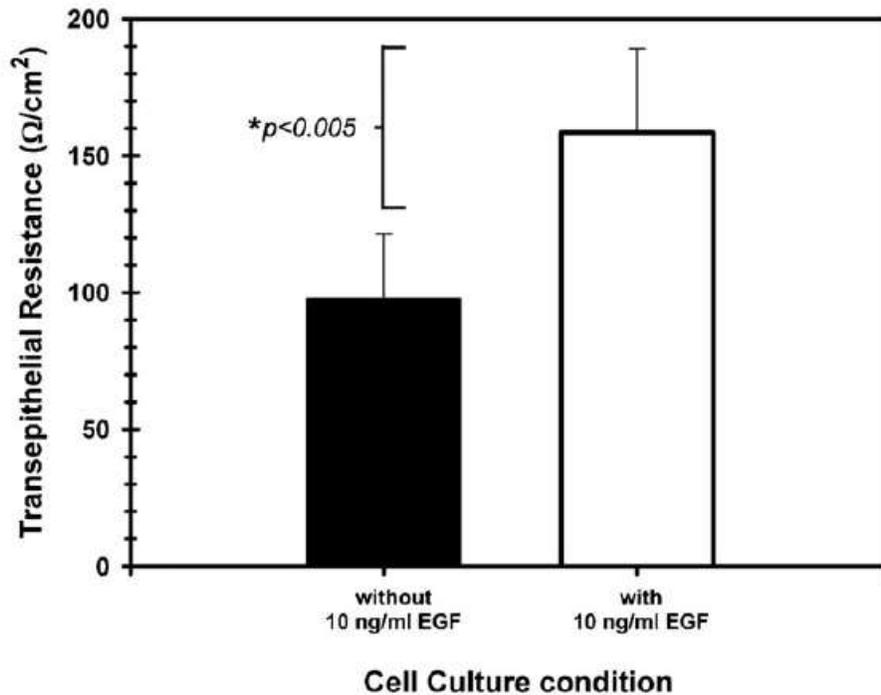


Fig. 11. EGF incrementa la hermeticidad de la unión estrecha en células RCE1(5T5). Cultivos de células RCE1(5T5) post confluentes fueron privados durante 5 días de 10ng/ml de EGF, posteriormente se realizaron mediciones de TER, observando que los cultivos en ausencia de EGF disminuyen sus valores de TER. Tomado de Ortiz-Melo et al., 2012.

Canales de la familia TRPV en epitelio corneal

Hasta el momento se ha identificado la expresión tanto a nivel de RNAm como de proteína de los canales TRPV1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4 en células de epitelio corneal de humano (Mergler et al., 2011).

Pan et al., (2008) reportaron que el canal TRPV4 es necesario para la regulación del volumen celular más bien regula la conducta de disminución de

volumen en células transformadas de epitelio corneal de humano (HCEC)., debido a que la presencia del RNA de interferencia del canal TRPV4, evita la recuperación del volumen celular después de un estímulo hipoosmótico (figura 12).

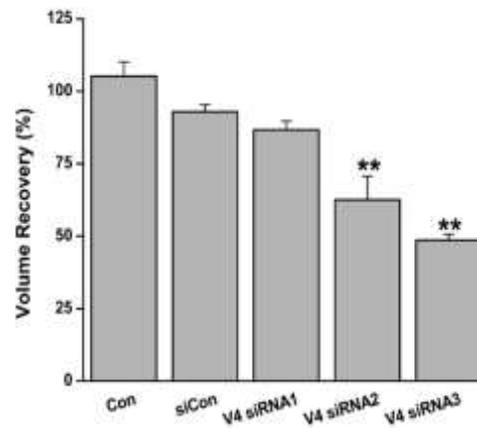


Fig. 12. TRPV4 regula el volumen celular. Gráfica de recuperación de volumen de células HCEC transfectadas con los siRNA1-3 para TRPV4 o siRNA control (siCon), donde se puede apreciar que en presencia de los siRNA para TRPV4 disminuyen la capacidad de recuperación de volumen celular (Pan et al., 2008).

Por otro lado, se ha descrito que la activación del canal TRPV1 induce la liberación de citocinas inflamatorias e incrementa la proliferación celular y la migración (Yang et al., 2010; Zhang et al., 2007). Este canal participa también en el proceso de cicatrización durante el sanado de heridas en la córnea (Sumioka et al., 2014).

En nuestro laboratorio estamos interesados en búsqueda de canales iónicos que pudieran estar involucrados con la proliferación y la diferenciación de células epiteliales, en trabajos anteriores nosotros observamos que los canales Kv1 y Ca1 no se encuentran involucrados en estos procesos celulares (Martínez-Rendón, 2009; González, 2009).

Por otro lado se ha reportado que una las familias de canales iónicos que se encuentra involucrada en la regulación de la proliferación y de la diferenciación de diferentes tipos celulares es la familia de canales TRPV (Adapala et al., 2013; Masuyama et al., 2008). Adicionalmente se ha descrito que los canales TRPV1, V3 y V4 son expresados en las células de epitelio corneal de humano (Mergler et al., 2011). Con base en estos antecedentes, decidimos evaluar si algún miembro de la familia de canales TRPV podría estar involucrado en la proliferación y la diferenciación de las células de epitelio corneal RCE1(5T5), para lo cual se diseñaron los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar a los canales de la familia TRPV que se expresan en las células RCE1(5T5) de epitelio corneal, y analizar su posible participación en la proliferación y/o la diferenciación de esta línea celular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Identificar canales de la familia TRPV diferencialmente expresados en células RCE1(5T5) proliferativas y diferenciadas mediante RT-PCR e inmunofluorescencia.**
- 2. Evaluar la participación de los canales TRPV en la proliferación y la diferenciación de las células RCE1(5T5), evaluando el efecto de activadores y bloqueadores farmacológicos específicos para estos canales sobre la cinética de crecimiento celular.**
- 3. Medir los niveles de expresión del canal TRPV4 a nivel de RNAm y de proteína en células RCE1(5T5) a lo largo de la cinética de crecimiento y diferenciación del cultivo.**
- 4. Comprobar la expresión funcional del canal TRPV4.**
- 5. Evaluar la participación del canal TRPV4 en la diferenciación terminal del epitelio corneal mediante el análisis de la formación y modulación de las uniones estrechas en este epitelio.**

Materiales y métodos

Cultivo celular

Para la realización de este trabajo se utilizaron células de la línea RCE1(5T5) derivadas de epitelio corneal de conejo (Castro-Munozledo, 1994). Las células se sembraron a una densidad de 2.7×10^3 células/cm² junto con 2.2×10^4 células/cm² de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina (Rheinwald, 1980), utilizando una mezcla (3:1) de DMEM/ nutriente F12-Ham, suplementada con 5% (v/v) FBS, 5 µg/ml insulina, 5 µg/ml transferrina, 0.4 µg/ml hidrocortisona, 2×10^{-9} M triyodotironina, 1×10^{-10} M toxina de cólera y 24.3mg/L de adenina. En todos los experimentos el cambio de medio se realizó diariamente; los cultivos fueron mantenidos en una atmosfera húmeda con 10% de CO₂.

Proliferación celular

Para el análisis de la posible participación de los canales TRP en la proliferación y diferenciación de la línea celular RCE1(5T5), se realizaron cinéticas de crecimiento de cultivos de células RCE1(5T5), sembradas a una densidad de 2.7×10^3 células/cm² junto con 2.2×10^4 células/cm² de fibroblastos 3T3, en presencia de diferentes concentraciones de bloqueadores y activadores de estos canales, como lo son; rojo de rutenio, capsaicina, capzacepina y RN-1734.

En estos experimentos al tercer día de cultivo, se agregó el bloqueador o activador correspondiente, debido a que, con esta densidad de células sembradas,

podemos observar; en los primeros días de cultivo una población de células mayoritariamente proliferativas (entre los días 3 y 6) y posteriormente, las células alcanzan la confluencia en el sexto día de cultivo que y comienzan a diferenciarse.

Después de la adición del activador o bloqueador farmacológico (al tercer día de cultivo) se realizaron conteos celulares de cada cultivo cada 24 h durante 7 días por triplicado mediante la utilización de una cámara de Neubauer.

Aislamiento de RNA

Para la extracción de RNA (Chomczynski and Sacchi, 1987), las células se lisaron con 1 ml de solución D (4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sodio pH7, 0.5% sarkosyl, 1% β mercapto-etanol) para una caja de 10 cm de diámetro, posteriormente se les agrego 0.1 ml de Acetato de Sodio 2 M pH4, 1 ml fenol ácido y 0.2 ml de cloroformo: isoamílico (1:24), se mezcló perfectamente en un vortex durante 1 min y se incubo en hielo durante 15 min, después de lo cual las muestras fueron centrifugadas a 13 000 rpm durante 10 min, recuperando la fase acuosa para posteriormente ser limpiadas con 1 ml de cloroformo:isoamilico1:24 mezclando y centrifugando de la misma manera. Posteriormente se precipitaron los RNAs con 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C durante 30 min y se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 min. La pastilla obtenida fue resuspendida en 400 μl de solución D, precipitando durante 30 min con etanol absoluto -20°C y centrifugando 10 min a máxima velocidad. La pastilla obtenida fue lavada con 1 ml

de etanol al 70%, se centrifugo durante 2 min, descartando un sobrenadante y dejando secar al aire durante aprox. 5 min

La concentración de los RNAs extraídos fue determinada por espectrofotometría, utilizando la equivalencia $1OD_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$. La densidad óptica de los RNAs fue medida en el espectrofotómetro Beckman, modelo DU 650 a 260 nm. La integridad de los RNAs fue comprobada mediante la utilización de un gel desnaturizante de agarosa-formaldehído, utilizando mezclas en proporción 1:3 (v/v) de RNA (5 μg): solución desnaturizante (50% formamida, 6% formaldehído y 2X MOPS), las cuales fueron desnaturizadas durante 15 min. a una temperatura de 65°C, después de lo cual fueron enfriadas en hielo-agua. Las muestras desnaturizadas de RNA fueron mezcladas con 2 μl de Buffer de carga (azul de bromofenol y xilen cianol) y cargadas en un gel de agarosa- formaldehído, el cual fue corrido a 50 V durante 30 min y teñido con una solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$) en 0.5 M de acetato de amonio durante 40 min. El gel fue foto documentado mediante la utilización de equipo DigiGenius (Synoptics).

Identificación del RNAm de canales TRP por RT-PCR

La identificación del RNAm de los canales de TRP se realizó mediante RT-PCR, partiendo de RNA total de cultivos celulares de 3 (proliferativos) y 10 (diferenciados) días de cultivo.

La técnica de RT-PCR se efectuó en dos etapas, primero se realizó una transcripción reversa para la síntesis de cDNA mediante el uso de 5 μg de RNA, la

enzima MLV (Fermentas) y el oligo -dT como primer. Posteriormente con el cDNA obtenido se realizó la amplificación de los canales de interés a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la cual se utilizó enzima Taq polimerasa (Roche). En la tabla 1 se presentan las secuencias de los oligos utilizados.

La identidad de los fragmentos obtenidos fue verificada en primera instancia mediante un gel de agarosa al 1.5% y posteriormente fueron clonados en el vector pGEM T-easy para su secuenciación.

Tabla 1. Oligos utilizados para la amplificación de canales TRP			
Canal	No. Acc. Genebank	Nombre del oligo	Secuencia
TRPV1	NM_001082166	TRPV1F	5'-CGACGGCAAGGACGACTGCA-3'
		TRPV1R	5'-TCGGGTACTGGCATCCCTTAA-3'
TRPV3	XM_008270888	TRPV3F*	5'-AGACATCGCGGCGCTCCTCATC-3'
		TRPV3R*	5'-TCAAGCCACAGGGACCATCGCC-3'
TRPV4	XM_008252919	TRPV4F	5'-GAGAAGCAGCCGCAGAGCCC-3'
		TRPV4R	5'-CCCTCATCCTTGGGCTGGAA-3'
TRPV6	NM_001082776	TRPV6F	5'-CCTGCTGGA ACTTATCGTCACC-3'
		TRPV6R	5'-CCTGGAGGAGCTTCTGCTGTAAG-3'
TRPM8	NM_024080	TRPM8R	5'-GCGTGAGGAGCAGGAGGCAC-3'
		TRPM8F	5'-TCTTG TAGCTCCACTTGTCGTCC-3'

* posteriormente al diseño y uso de estos oligos, se realizó una actualización a la secuencia TRPV3 de conejo (No. Acc, XM_017348824), estos oligos no se unen a la secuencia actualizada.

Clonación de fragmentos de PCR en el vector p-GEM T-Easy

La clonación de las secuencias obtenidas de los canales TRPV se realizó mediante la utilización del kit pGEM-T Easy Vector System (Promega). Para la ligación se utilizó una relación molar de 1:3 vector: inserto, y se incubó toda la noche a 16°C. Posteriormente esta ligación se utilizó para transformar 200 µl de bacterias competentes *E. coli* DH5α, las cuales se crecieron por una hora a 37°C en 1 ml de medio LB líquido. De este cultivo se sembraron 100 µl en cajas petri con LB, 100 µg/ml ampicilina, X-gal e IPTG para seleccionar las colonias positivas por α-complementación del gen Lac Z. Las colonias seleccionadas fueron crecidas en 5 ml de medio LB líquido con 100 µg/ml ampicilina, para posteriormente extraer el plásmido por medio de miniprep de lisis alcalina.

Aislamiento de DNA de plásmidos por miniprep (lisis alcalina).

Para la extracción de DNA se realizaron cultivos en los que se transfirió solo una colonia en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml ampicilina. Estos cultivos se incubaron durante toda la noche a 37°C, después de lo cual fueron empastillados mediante centrifugación a 13000 rpm en una microcentrífuga, las pastillas fueron resuspendidas en 200 µl de solución I fría (para 100 ml: 0.9g de glucosa, 2.5 ml de Tris 1 M pH 8.0 y 2 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0), posteriormente se les agregó 400 µl de solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%) y se mezclaron por inversión para después agregarles 300 µl de solución III fría (para 100 ml: 60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua milliQ), y mezclar por

inversión. Se centrifugaron durante 5 min a 13 000 rpm en una microcentrífuga, los sobrenadantes fueron transferidos a tubos limpios y para precipitar el DNA con 0.6 volúmenes de isopropanol. Finalmente se centrifugaron durante 5 min a 13 000 rpm en una microcentrífuga y se eliminó el sobrenadante, las pastillas fueron lavadas con etanol al 70% y resuspendidas en 50 µl de agua milliQ esterilizada.

Secuenciación automatizada de DNA

Las reacciones de secuenciación se realizaron con 500 ng del plásmido de interés, utilizando el kit BigDye terminador v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones de reacción; un minuto a 96°C, 25 ciclos de: 96°C 10 seg; 50°C 5 seg; 60°C 4 min, terminando a 4°C.

Las reacciones de secuenciación fueron precipitadas durante 30 min con Etanol absoluto - EDTA 125 mM, centrifugadas durante 20 min a 13 000 rpm en una microcentrífuga, limpiadas con etanol al 70% después de lo cual fueron centrifugadas durante 5 min a 13 000 rpm, se removió el sobrenadante, y se dejaron secar 5 min al aire para eliminar todo el etanol. Estas reacciones fueron enviadas para su análisis a la Unidad de Ácidos Nucleicos del en el Dpto. de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV IPN. Finalmente, para confirmar la identidad de las secuencias obtenidas, estas secuencias fueron comparadas con la base de datos del Gen Bank mediante la utilización del programa NCBI BLAST (nucleótidos).

RT-PCR cuantitativa.

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron a partir de RNA tratado con Turbo DNase I (Applied Biosystems) para lo cual se incubaron 7.5 µg de RNA con 1 unidad de Turbo DNase I por 30 min a 37°C, después de lo cual se agregaron 0.1 volúmenes de reactivo de inactivación y se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 13 000 rpm durante 1.5 min y el sobrenadante (RNA tratado) se recolectó en un tubo limpio.

Las reacciones de RT se realizaron a partir de 1µg de RNA, tratado con Turbo DNasa, y mediante la utilización de 200 unidades de la enzima reverso transcriptasa (M-MVL) y 2.5 µM random primer, durante una hora a una temperatura de 44 °C .

Para la reacción qPCR se utilizó el kit Fast Start SYBR Green Mastermix (ROX) (Roche diagnostics) y el equipo ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems), para lo cual se utilizaron 25ng de cDNA, con 2.5 pM de oligos específicos para cada gen (tabla1), en un volumen de reacción de 20 µl, utilizado una temperatura de alineamiento de 60 °C En todos los casos se verificó la amplificación de específica de un solo amplicon mediante la realización de curvas de disociación y posteriormente mediante el análisis en gel de agarosa. El análisis de datos se llevó a cabo mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Utilizando como control interno la expresión del mRNA de la proteína ribosomal P0 (PRP0) a partir de 0.1ng de cDNA y bajo las condiciones de amplificación previamente descritas(Garcia-Villegas et al., 2007).

Purificación de citoqueratinas de cultivos de células RCE1(5T5)

Para la purificación de las citoqueratinas, se realizaron cultivos celulares por duplicado bajo las condiciones descritas. Los cultivos celulares fueron homogenizados a 4°C con 25 mM de tris-HCL (pH7.5) con Tritón X-100 1.0%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1X Complete (Roche). Los homogenizados se centrifugaron durante 10 min a 12,000g a 4°C, posteriormente la pastilla se solubilizó a 95°C con Tris-HCl 25 mM, pH 7.4 + SDS 1%.

La cantidad de proteínas contenidas en los lisados celulares fue determinada mediante la utilización del Kit Coomassie Plus Protein Assay (PIERCE).

Se cargó lo equivalente a 20µg de proteína de cada muestra en un gel de acrilamida al 12.5%, el cual se corrió a 30 mA durante 30 min, después de lo cual el gel fue teñido durante 2 h con azul de Coomassie, para por último ser fotodocumentado con el escáner HP Scan Jet 5 P y analizado por densitometría mediante la utilización del programa Gen Snap (Syngen) y de esta manera determinar la cantidad de citoqueratinas presentes en los cultivos celulares.

Microscopía electrónica de transmisión.

Células RCE1(5T5) de 4 días de cultivo fueron tratadas durante 48 h con rojo de rutenio 50 y 100 µM para posteriormente ser analizadas por microscopia electrónica de transmisión, para lo cual las células tratadas fueron fijadas por una hora con glutaraldehído 2.5% (v/v) en cacodilato de sodio 0.1M; se postfijaron en tetróxido de osmio 1% (w/v) y se embebieron en Epon 812. Se obtuvieron cortes

finos que se contrastaron con acetato de uranilo y se analizaron en un microscopio electrónico FEI Morgagni 268D. Estas imágenes fueron realizadas por el Dr. Arturo González Robles del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular.

Inmunofluorescencia de células RCE1(5T5)

Las células RCE1(5T5) de 3 y 10 días de cultivo fueron sembradas sobre un cubreobjetos con las condiciones de cultivo descritas; fijadas con paraformaldehído al 3.5% (p/v) durante 2 h a 4°C, lavadas con PBS, permeabilizadas con Triton X-100 al 0.05% (v/v) durante 5 min a temperatura ambiente, después de lo cual las células fueron lavadas con PBS, bloqueadas con Power Block durante 5 min a temperatura ambiente, incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 2), durante toda la noche a 4°C, y lavadas con PBS + 0.05% (v/v) Tween 20.

Posteriormente se utilizó el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a un fluoróforo alexa-fluor, incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, las preparaciones fueron lavadas con PBS 1% + 0.05% Tween 20 e incubadas con DraQ7 durante 30 min, para después ser montadas con Vectaschield.

Las preparaciones fueron observadas en un sistema confocal de alta velocidad, multifotónico Leica (modelo TCS SP2; Leica Microsystems), los cortes ópticos fueron de 0.2-0.4 μm , y para prevenir la interferencia entre las señales de las imágenes de la misma sección óptica, las señales fueron detectadas con diferentes canales. Las imágenes fueron analizadas con el software LCS Leica Confocal™ v2.0 (Leica Microsystems).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia		
Anticuerpo	Num. Cat./Compañía	Dilución utilizada
TRPV1	SC 12498/Santa Cruz	1:50
TRPV4-N	SC 98592/Santa Cruz	1:75
TRPV4-C	SC 16485/Santa Cruz	1:25
TRPV4 <u>extracelular</u>	ACC-124/Alomone	1:50
TRPV6	SC 28396/Santa Cruz	1:50
Kv1.1	SC 25680/Santa Cruz	1:50
Claudina-1	71-7800/ Thermo Fisher Scientific	1:100
Claudina-4	32-9400/ Thermo Fisher Scientific	1:100
Claudina-4	3E2C1/Thermo Fisher Scientific	
TRPP2	sc-10377, Santa Cruz	1:25
EGFR	E2760/Sigma-Aldrich	1:50
EGFR	SC03/Santa Cruz	1:50

Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas, los cultivos se lavaron 3 veces con PBS frío, para posteriormente adicionar 0.5 ml de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, EDTA 10 mM, 1% NP40 y 1X Complete (Roche) por cada caja de 100mm, se incubaron en hielo durante 20 min y se rasparon con un gendarme, los extractos fueron recolectados y homogenizados pasándolos por una jeringa de insulina para

por ultimo ser centrifugados a 13000 rpm durante 3 min, se colectó el sobrenadante y se cuantificó mediante la utilización del Kit Coomassie Plus Protein Assay (PIERCE).

Western blot

Para la identificación del canal TRPV4, claudina-1, claudina-4 y ocludina, se colocaron 40 µg de extractos de proteína totales de células RCE1(5T5) en geles de acrilamida-SDS al 10% los cuales se corrieron a 15 mA en un buffer de corrida 1X (Tris 0.125mM, Glicina 0.96M, SDS 0.5%). Los geles de las electroforesis fueron transferidos a membranas de PVDF pre-equilibradas con metanol a 400 mA por tres horas en el buffer de transferencia 1X (Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%, SDS 0.1%) a 4°C.

Las membranas fueron lavadas con TBST (buffer salino de tris y tween) 1X, bloqueadas con leche al 10% e incubadas con anticuerpo primario a la concentración descrita en la tabla 3 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C, después se lavaron 7 veces con TBST 1X durante 10 min y se incubaron durante 1h con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) correspondiente (tabla 3) en solución de bloqueo, por último, las membranas se lavaron 7 veces durante 10 min con TBST. El revelado se realizó mediante la utilización de un kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz) y las placas sensibles a rayos X Kodak Film.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para WB		
Anticuerpo	Num. Cat./compañía	Dilución utilizada
TRPV4-N	SC 98592/Santa Cruz	1:1000
TRPV4	ACC-124/Alomone	1:4000
Claudina-1	71-7800/ Thermo Fisher Scientific	1:1000
Claudina-2*	90-0900/ Thermo Fisher Scientific	1:1000
Claudina-4	32-9400/ Thermo Fisher Scientific	1:1000
Ocludina	33-1511/ Thermo Fisher Scientific	1:1000
Actina	Donado por el Dr. José Manuel Hernández	1:500
GAPDH	Sc-32233/Santa Cruz	1:10000

*No pudo confirmarse la expresión claudina 2, debido a que no se observó señal.

Medición de calcio intracelular en las células de epitelio corneal RCE1(5T5).

La determinación de calcio intracelular se realizó en células RCE1(5T5) de 3 y 11 días de cultivo mediante la utilización del indicador fluorescente de calcio²⁺, Fluo 4 AM (5µM), para lo cual las células RCE1(5T5) fueron crecidas en cajas con fondo de cristal, el cual no genera interferencia en la medición de fluorescencia (Mat Tek, P356 1.5 14C), durante 3 y 11 días, los cultivos fueron lavados tres veces con solución salina (HBSS), NaCl 145 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1mM, KH₂PO₄ 1mM, MgCl₂ 1 mM, Glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, esterilizada por filtración, pH7.4, 300 mOsm/L, e incubados durante 30 min a 37°C con el indicador fluorescente Fluo-4 AM (5 µM) en HBSS, posteriormente se registraron los cambios de calcio intracelular en presencia del activador (GSK101 100nM), el bloqueador (RN1734 30µM) y el quelante de calcio EGTA (2mM).

Los registros del cambio de calcio intracelular fueron realizados a temperatura ambiente en un microscopio confocal Zeiss, LSM510 META, para cada registro se tomaron 60 imágenes durante 10 min, es decir una imagen cada 10 s. Tomando como señal basal el promedio de las primeras 10 imágenes, a partir de este punto las células se pusieron en presencia del activador y/o del inhibidor del canal, continuando los registros hasta el minuto 10. El análisis de imágenes se realizó en el programa Image J (Schneider et al., 2012), midiendo los cambios de calcio intracelular de cada célula de manera individual.

Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TER).

Las mediciones de TER en células RCE1(5T5) fueron realizadas mediante la utilización de un voltímetro epitelial EVOM (Wold precisión instruments, Sarasota, FL, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células fueron sembradas en transwells®, con membranas de policarbonato de 0.33cm² de superficie y con 0.4 µm de tamaño de poro (3413, Corning, Acton, MA), (Ceireijido, *et al.*, 1978), y fueron tratadas de acuerdo al protocolo de cada experimento, las mediciones se realizaron por triplicado para cada inserto, se calcularon los valores de TER restando el promedio de dos insertos sembrados con fibroblastos 3T3 confluentes y normalizando con respecto al área. Los valores fueron expresados en ohms•cm² ($\Omega\cdot\text{cm}^2$).

RNA de interferencia

El cDNA completo del canal TRPV4 de conejo fue clonado por RT-PCR a partir de células RCE1(5T5) y secuenciado (No. Acc. KX523177), a partir de esta secuencia se diseñaron dos shRNA que fueron clonados en el vector pLVXshRNA2 (Clontech), la secuencias blanco fueron: RabV4sh1: 5'-GGAGGAAGGTTGTAGAGAA-3' y RabV4sh2: 5'-CCAGAACTTGGGCATCATC-3'. Los plásmidos fueron transfectados usando el reactivo TransIT-X2 (Mirus, Bio LLC) en células RCE1(5T5) de 5 días de cultivo, sembradas sobre insertos para posteriormente realizar mediciones de TER cada 24 h o bien sembradas en cajas de 35 mm para extracción de proteínas.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante ANOVA seguido de la prueba de comparación de Bonferroni's, usando el software Sigmaplot 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL). Los valores expresados representan la media \pm el error estándar, donde las diferencias significativas con respecto al control están como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) o $p < 0.001$ (***), n, es el número de observaciones realizadas e incluidas en el análisis.

RESULTADOS

Efecto de bloqueadores y activadores de canales TRPVs en la proliferación y diferenciación de las células RCE1(5T5)

En primera instancia y con el fin de analizar de manera general la posible participación de los canales TRPV en la proliferación de las células RCE1(5T5), las células fueron crecidas en presencia rojo de rutenio (RR), un bloqueador general de los canales TRP a concentraciones de 50, 100 y 200 μM , este fármaco inhibió la proliferación celular a partir de la menor concentración usada (50 μM), sugiriendo así la posible participación de al menos un canal TRP en la regulación de este proceso celular (figura 13).

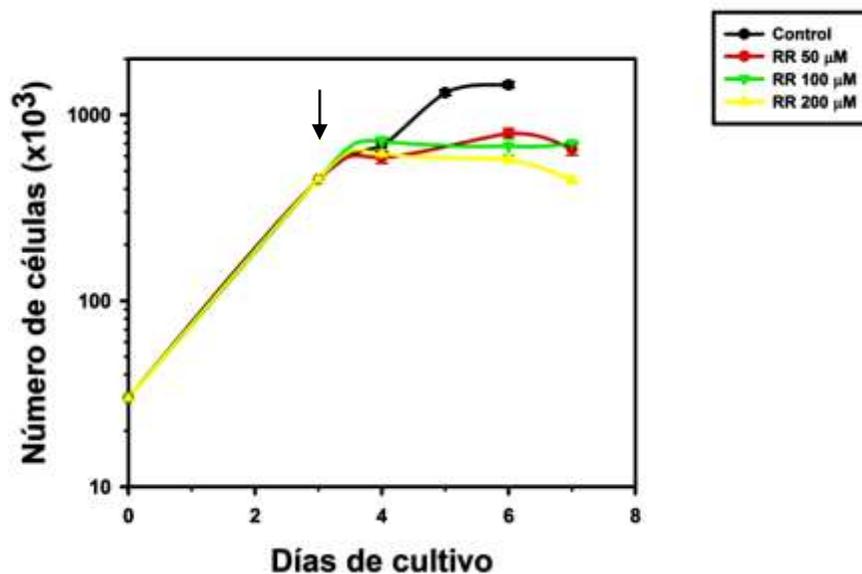


Fig.13 El Rojo de rutenio inhibe el crecimiento de las células RCE1(5T5), Cinética de crecimiento de células RCE1(5T5) en presencia de rojo de rutenio a 50, 100 y 200 μM . observando que la presencia de rojo de rutenio disminuye el número de células. Los resultados representan el promedio \pm en ES, de dos experimentos independientes realizados por duplicado. La flecha indica el inicio del tratamiento

Durante la realización de esta cinética de crecimiento observamos que los cultivos tratados con RR presentaban cambios morfológicos con respecto a los cultivos control, específicamente la presencia de células con mayor grado de queratinización en la capa apical del epitelio, lo que sugirió un mayor grado de diferenciación en estos cultivos.

Para analizar a detalle los cambios morfológicos inducidos por la presencia de RR, células RCE1(5T5) de 4 días de cultivo fueron tratadas durante 48 h con RR 50 o 100 μM , para posteriormente ser procesadas para microscopía electrónica.

En la figura 14 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica donde se puede observar que en las células tratadas con RR, hay una mayor concentración de fibras de citoqueratina, fibras alargadas más densas indicadas con flechas (figura14 B-C), lo cual está asociado a un mayor grado de diferenciación con respecto a las células control (figura 14 A), sugiriendo así la posible participación de algún canal TRP en la regulación de la diferenciación del epitelio corneal.

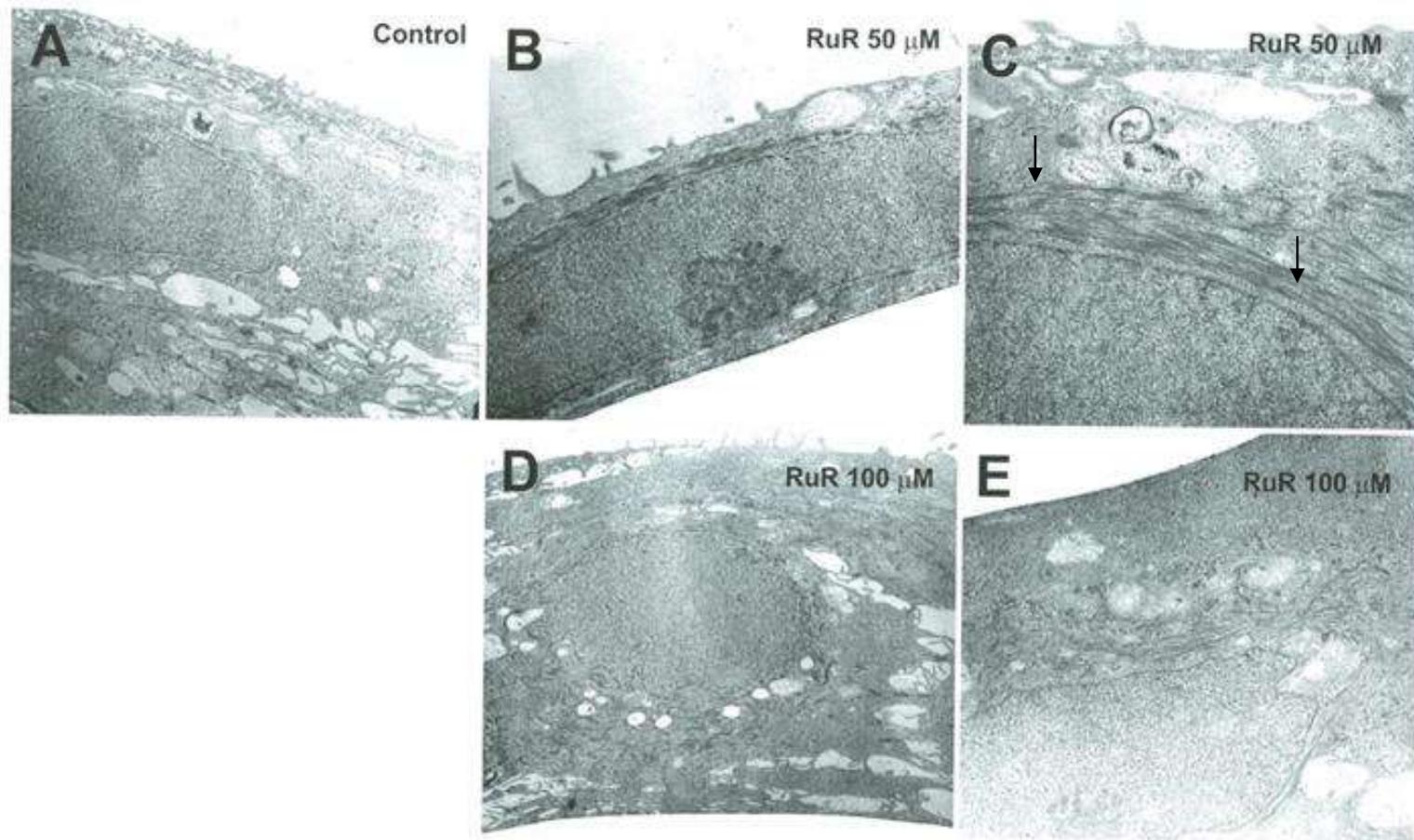


Fig.14 El rojo de rutenio induce un aumento de la expresión de fibras de citoqueratinas de las células RCE1(5T5). Microscopia electrónica de transmisión de células RCE1(5T5) de 4 días de cultivo (A) tratadas 48 h con de rojo de rutenio (RuR), 50 (B y C) o 100 (D y E) μ M. El RuR 50 μ M produce un aumento de la expresión de fibras de citoqueratinas indicadas por las flechas. Imagen obtenida por el Dr. Arturo González Robles

Para determinar de manera específica si la disminución de la proliferación observada en presencia de rojo de rutenio era debida a un canal de la familia TRP, se realizaron cinéticas de crecimiento en presencia de bloqueadores más selectivos y de activadores específicos de algunos canales de la familia TRPs, como la capzacepina que bloquea a los canales TRPV1 y TRPV4, la capsaicina que es un activador específico del canal TRPV1 y mentol que activa al canal TRPM8 (Peier et al., 2002). En estos experimentos las células RCE1(5T5) fueron tratadas al tercer día después del sembrado, y las células se contaron cada 24 horas durante el transcurso del experimento.

La adición del capsaicina tuvo un efecto diferencial dependiendo de la concentración: a 200 μM redujo la proliferación de las células RCE1(5T5), mientras que a 7.5 μM la aceleró, ver figura 15. Estos resultados sugirieron la participación del canal TRPV1 en la proliferación de esta línea celular.

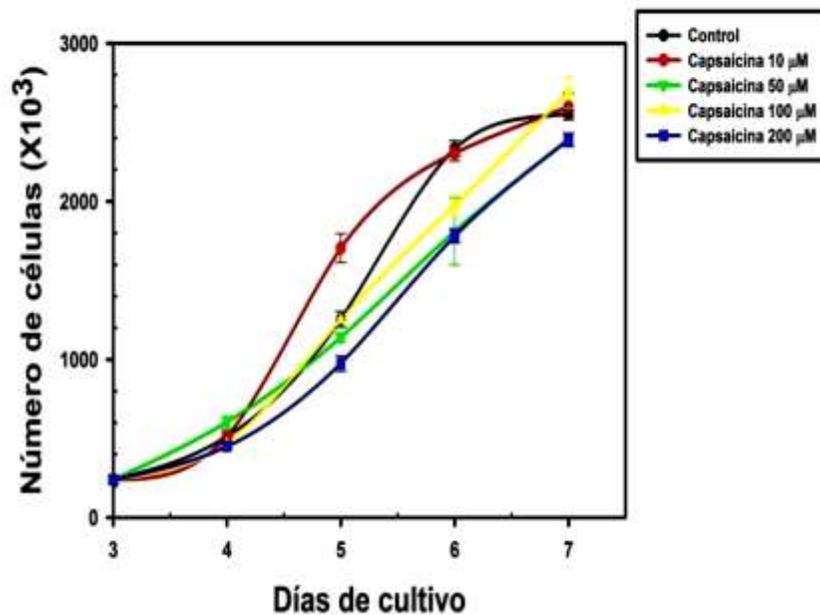


Fig.15 Efecto diferencial de capsaicina en el crecimiento de las células RCE1(5T5), las células RCE1(5T5) de tres días de cultivo fueron crecidas en presencia de diferentes concentraciones de capsaicina,

Por otro lado, la presencia de capzacepina (figura 16), un fármaco que bloquea a los canales TRPV1 y TRPV4, a la concentración de 50 μM disminuye el crecimiento celular (curva roja, figura16), sugiriendo la posible participación de alguno de estos canales en la proliferación de las células RCE1(5T5). Por otro lado, la capzacepina a concentraciones de 100 y 200 μM resultó ser tóxica para las células.

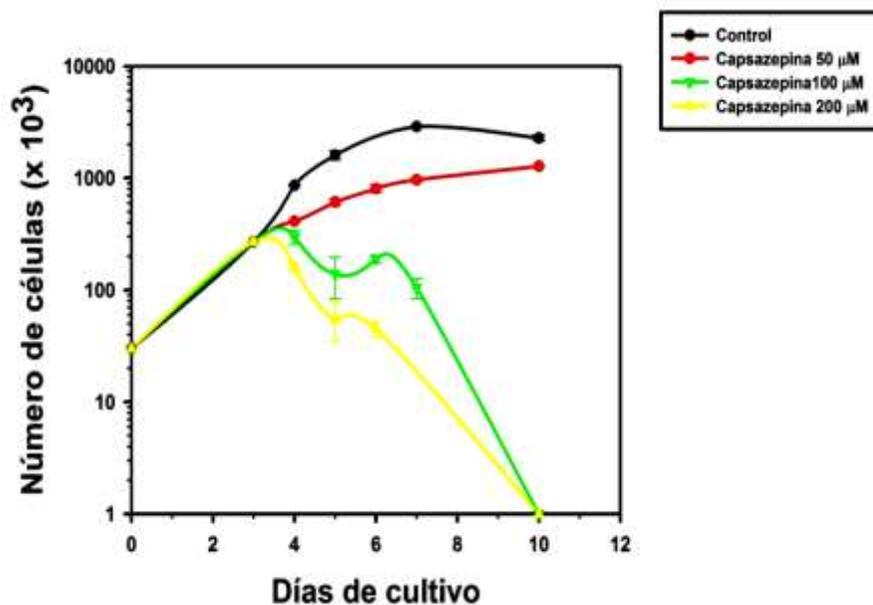


Fig.16 La capzacepina retarda el crecimiento de las células RCE1(5T5), Células RCE1(5T5) de tres días de cultivo fueron crecidas en presencia de diferentes concentraciones de capzacepina (50, 100 o 200 μM) observando una disminución del número de células a la concentración de 50 μM

Por otro lado, el mentol, activador farmacológico del canal TRPM8 a concentraciones de 10, 50, 100 o 500 μM , se provocó una disminución en el número de células al día 6 de cultivo, que es cuando las células alcanzan la

confluencia e inician el programa de diferenciación (figura 17), lo que podría sugerir la posible participación del canal TRPM8 en la entrada a la diferenciación del epitelio corneal.

En resumen, los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de células RCE1(5T5) sugieren que los canales TRPV1, TRPV4 y TRPM8 podrían participar en el desarrollo normal de esta línea celular.

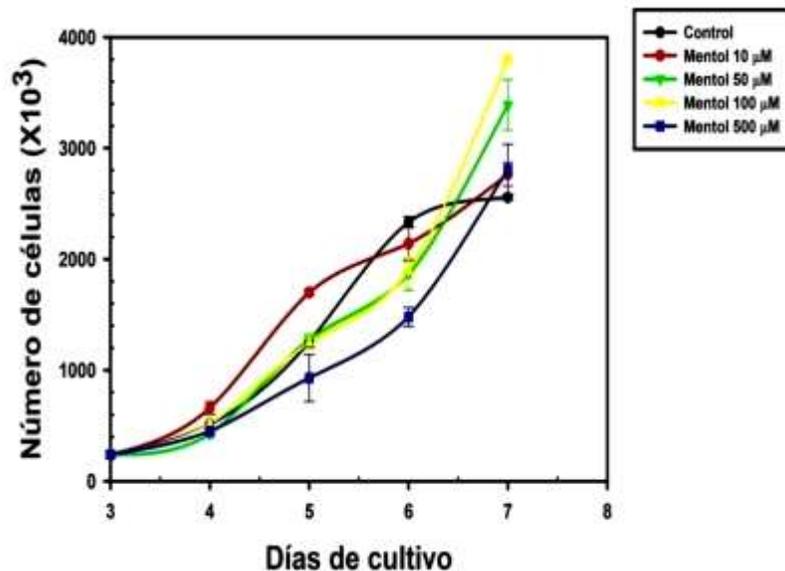


Fig.17 El mentol modifica la velocidad de crecimiento de las células RCE1(5T5). Células RCE1(5T5) de tres días de cultivo, crecidas en presencia de mentol (10, 50, 100 o 500 µM). La adición de mentol disminuye de la velocidad de proliferación en el sexto día de cultivo.

TRPV4 en la diferenciación de las células RCE1(5T5).

La inhibición de crecimiento de las células RCE1(5T5) en presencia de rojo de rutenio y capzacepina nos sugirieron que los canales iónicos TRPV1 y TRPV4 podrían participar en la regulación de la diferenciación de esta línea celular, por lo

cual, para evaluar si la actividad del canal TRPV4 está involucrada en el proceso de diferenciación de las células RCE1(5T5), se realizó una cinética de crecimiento en presencia de RN-1734 (10, 20 o 30 μ M), inhibidor específico del canal TRPV4. En la figura 18 se puede observar que RN-1734 disminuyó el número de células en el cultivo, este efecto fue más evidente durante los días 5 al 7 posteriores a la siembra que es el momento en el que las células RCE1(5T5) están iniciando su programa de diferenciación, sugiriendo así que posiblemente el canal TRPV4 podría estar relacionado con el inicio de la diferenciación de las células RCE1(5T5).

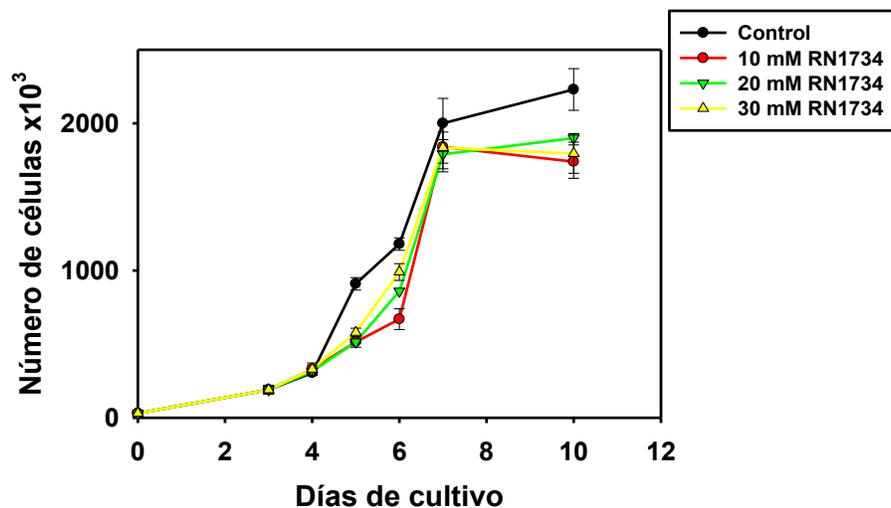


Fig.18 El bloqueador del canal TRPV4, RN17-34 disminuye el número de células RCE1(5T5). Células RCE1(5T5) de tres días de cultivo, fueron tratadas crónicamente con RN-1734 10, 20 o 30 μ M, 48h después del tratamiento se observó la disminución del número de células en el cultivo.

Para evaluar la posible participación del canal TRPV4 en el inicio de la diferenciación, células RCE1(5T5) de 5, 6 o 7 días de cultivo fueron tratadas durante 48 h, con RN-1734 30 μ M. Se utilizaron estas ventanas de tiempo debido

a que las células RCE1(5T5) inician su programa de diferenciación al sexto día de cultivo, de manera que evaluamos el efecto de la inhibición de TRPV4, antes, durante y después del inicio de la diferenciación.

Las células tratadas con RN-1734 (30 μ M) se analizaron de dos diferentes maneras, en primera instancia se realizaron conteos celulares y además se analizó el grado de diferenciación de estos cultivos mediante la cuantificación de la expresión del par de citoqueratinas K3/K12, ver figura 19 , debido a que el incremento de la expresión de estas citoqueratinas está relacionado con el grado de diferenciación del epitelio corneal (Tamariz et al., 2007).

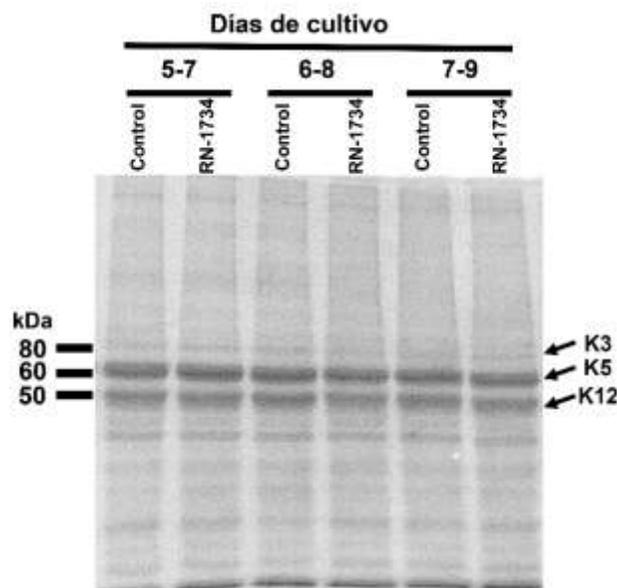


Fig.19 Expresión de citoqueratinas en las células RCE1(5T5), Células RCE1(5T5) de 5, 6 o 7 días de cultivo fueron tratadas durante 48 h con RN-1734 30 μ M, posteriormente se realizó la extracción de citoqueratinas, con tinción con azul de Coomassie.

En la figura 20 se muestran las gráficas obtenidas de la cuantificación de las citoqueratinas K3 y K12, donde se observa que el tratamiento con RN-1734 no altera el inicio de la diferenciación en los cultivos de RCE1(5T5)

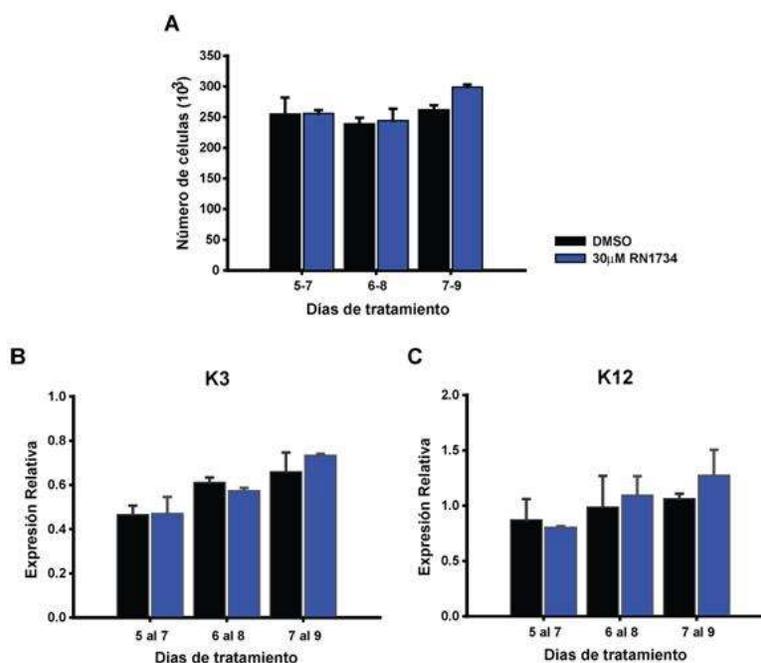


Fig.20 TRPV4 no modifica el inicio del programa de diferenciación de las células RCE1(5T5), Células RCE1(5T5) de 5, 6 o 7 días de cultivo fueron tratadas durante 48 h con RN-1734 30 μ M. (A). Número de células en presencia de RN-1734. (B). Expresión relativa de citoqueratina K3, (C). Expresión relativa de citoqueratina K12. Normalizadas con respecto a la expresión de K5.

Identificación de canales de la familia TRPV expresados en células RCE1(5T5)

En estudios previos realizados por Megler *et al.*, (2011) se reportó la expresión de los canales TRPV1, TRPV3 y TRPV4 en células transformadas de epitelio corneal de humano. Adicionalmente los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento realizadas en presencia de activadores y bloqueadores

farmacológicos de canales TRP nos sugirieron la participación de algunos de estos canales en la diferenciación de las células RCE1(5T5), por todo lo anterior buscamos la expresión del RNA mensajero de los canales TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPV6 y TRPM8 en las células RCE1(5T5), mediante la técnica de PCR de punto final.

Para ello se extrajo el RNA total de RCE1(5T5) proliferativas a 3 días de cultivo o diferenciadas colectadas a los 10 días de cultivo, observando la expresión de lo mensajero de los canales TRPV1, TRPV4 y TRPV6. En la figura 21 se observa que en los tres casos se obtiene una banda de amplificación del peso esperado; TRPV1 (211 pb.), TRPV4 (170 pb.) y TRPV6 (251 pb.). Para verificar la identidad molecular de cada transcrito, los fragmentos obtenidos por PCR se clonaron en el vector p-GEM-T Easy, y se secuenciaron.

Por otro lado, los mensajeros de los canales TRPV3 y TRPM8 parecen no expresarse en esta línea celular, ya que no se observaron los amplicones de los pesos esperados; TRPV3 (275 pb.) y TRPM8 (250 pb.) (figura 21), Se usó como control positivo de amplificación al gen de la proteína ribosomal P0 (PRP0), obteniéndose la banda de peso esperado (231 pb.) tanto en el RNA de 3 como de 10 días de cultivo, (figura 21).

Una vez que identificamos la presencia del mensajero de los canales TRPV1, TRPV4 y TRPV6 en las células RCE1(5T5) evaluamos si estos canales se

expresaban de manera diferencial durante la proliferación y la diferenciación de estas células. Para ello cuantificamos los niveles de RNAm de cada canal a lo largo de la cinética de proliferación y diferenciación, utilizando como referencia los niveles de RNAm del canal de potasio Kv1.1, que previamente habíamos identificado y que sabemos que no se encuentra involucrado en ambos procesos.

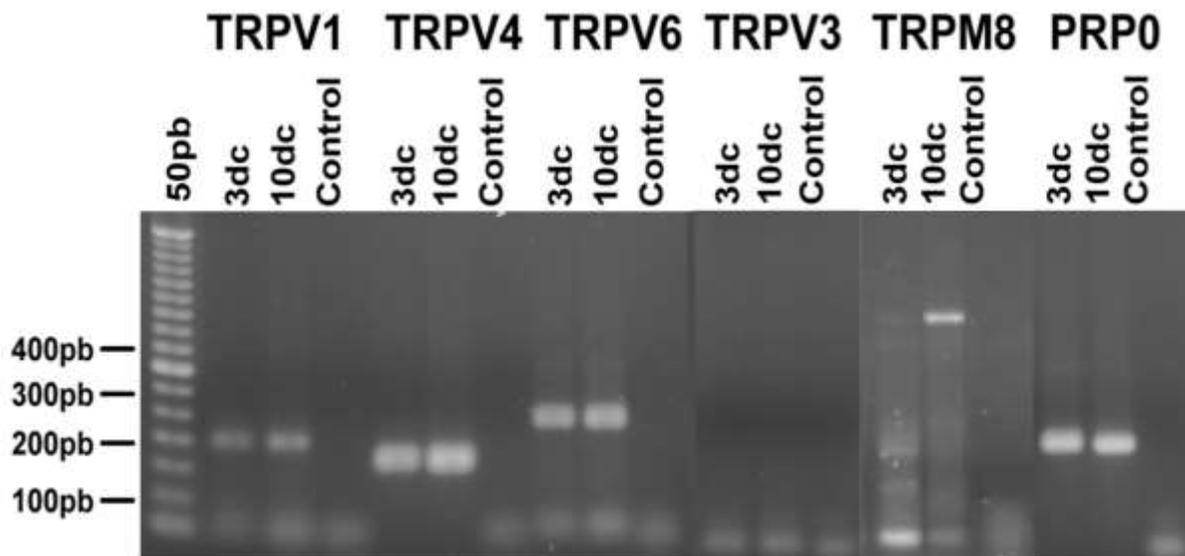


Fig. 21 Expresión del RNA mensajero de canales TRPV en células RCE1(5T5). Las células RCE1(5T5) expresan el RNAm de los canales TRPV1, TRPV4 y TRPV6, y no se detectaron los canales TRPV3 y TRPM8 utilizando como gen de referencia PRP0. Gel de agarosa al 1.5% carriles de izquierda a derecha, Marcador de peso molecular, escalera de 50 pb, en todos los casos se muestra la amplificación del DNAc de interés de células RCE1(5T5) de 3 y 10 días de cultivo, así como su control negativo sin

Cinética de expresión de los RNAm de los canales TRPV1, TRPV4 y TRPV6 en las células RCE1(5T5)

Una vez que se identificó la presencia en células RCE1(5T5) de los mensajeros de los canales TRPV1, TRPV4 y TRPV6, se evaluó si estos canales se expresan de

manera diferencial durante el crecimiento y la diferenciación de las células RCE1(5T5), para lo cual se midió la expresión de los RNAm correspondientes desde los 3 hasta los 10 días de cultivo, los RNAs extraídos fueron tratados con DNAsa Turbo ®, (Ambion), la integridad de los RNAs fue confirmada por electroforesis en geles desnaturalizantes y posteriormente se sintetizó el DNAc como se describe en la sección de material y métodos.

Los DNAc obtenidos fueron analizados por PCR cuantitativo utilizando como gen de referencia los niveles de expresión del mensajero de la proteína ribosomal PRP0 (Garcia-Villegas et al., 2007). La diferenciación del cultivo fue monitoreada por la expresión de los RNAm del marcador temprano de diferenciación Pax 6 (Garcia-Villegas et al., 2009) y del marcador tardío de diferenciación citoqueratina K3. Adicionalmente se midieron los niveles del RNAm del canal Kv1.1, canal que previamente habíamos identificado en esta línea celular y que sabemos que no se encuentra involucrado en proliferación o diferenciación de este epitelio (Martínez-Rendón, 2009).

En la figura 22 se muestran las cinéticas de expresión de cada uno de los canales evaluados, donde se observa que cada canal tiene una cinética de expresión diferente. El RNAm de TRPV6 es el que más incrementa su expresión, su pendiente en el sexto día es mucho mayor que para los otros canales, coincidiendo con el inicio de la diferenciación de las células RCE1(5T5). El mensajero del canal Kv1.1 presenta un comportamiento bimodal observando dos picos de expresión en los días 5 y 7, siendo más abundante en células

proliferativas que en diferenciadas. Por otro lado, los niveles del mensajero de TRPV4 permanecen constantes a través del tiempo.

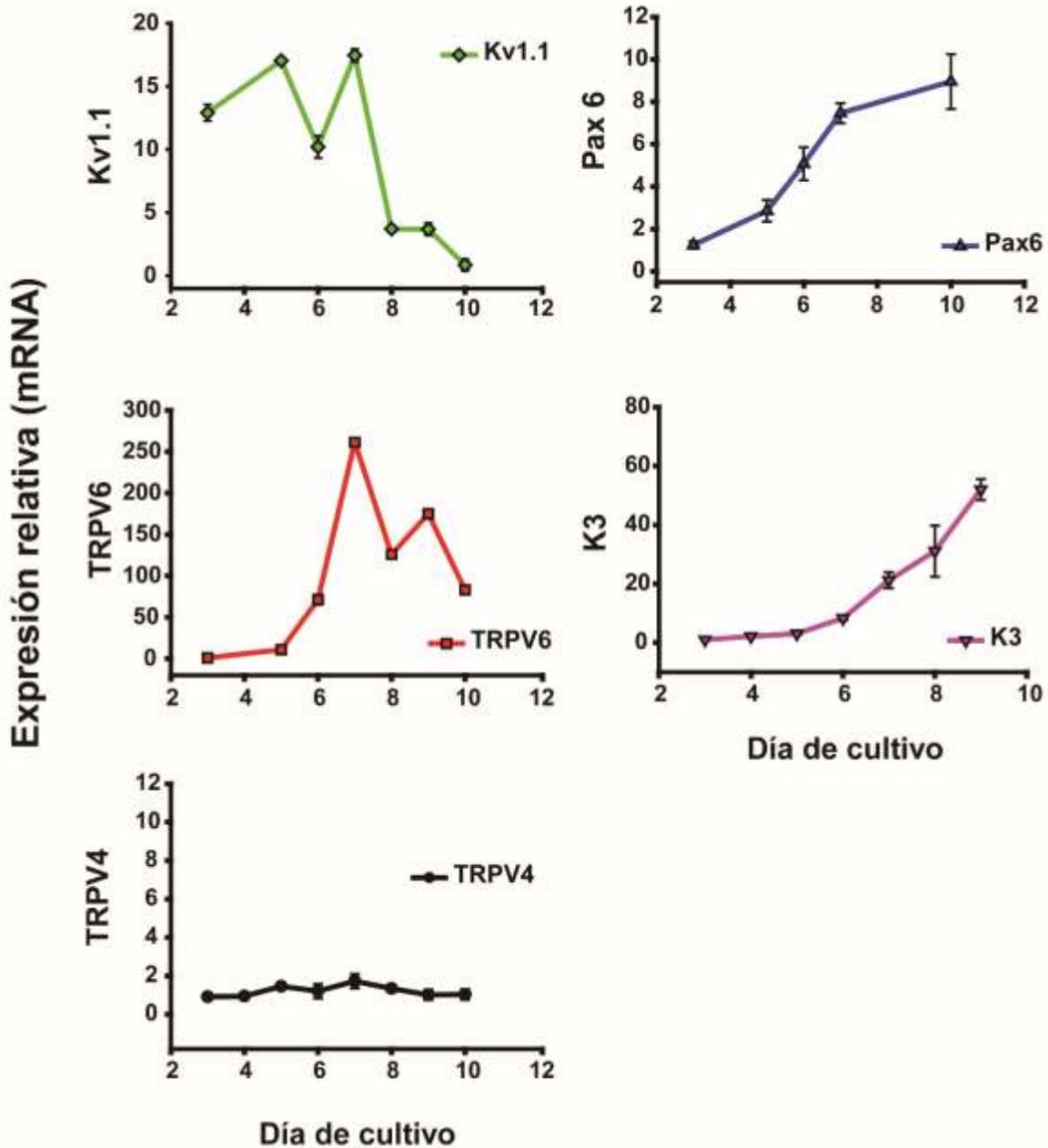


Fig.22 Cinética de expresión de los RNAm de los canales Kv1.1, TRPV4 y TRPV6, durante el crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5), Gráficas de expresión relativa de los mensajeros de los canales Kv1.1, TRPV4 y TRPV6, medidos mediante RT-qPCR. Para verificar el grado de diferenciación del cultivo se usó como referencia la expresión de los marcadores de diferenciación Pax 6 y citoqueratina K3. Los resultados representan el promedio +/- el ES, para el canal Kv1.1 de un experimento realizados por triplicado. Para el canal TRPV6 de dos experimentos independientes realizados por triplicado y para el canal TRPV4, Pax6 y K3 de tres experimentos independientes realizados por triplicado

Inmunolocalización de los canales Kv1.1, TRPV1, TRPV4 y TRPV6 en células RCE1(5T5)

Para evaluar si los cambios observados en la expresión a nivel de mensajero, correlacionaban con cambios en los niveles de las proteínas correspondientes se evaluó la presencia de los canales Kv1.1, TRPV1, y TRPV6 mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos de células RCE1(5T5) proliferativas (3 días de cultivo) y diferenciadas (10 días de cultivo).

En la inmunotinción del canal Kv1.1 observamos que en células proliferativas el canal se distribuye de manera homogénea en toda la célula (figura 23A) al igual que en las células de 10 días de cultivo (figura 23 E). Por otra parte, el canal TRPV1 parece ser más abundante en células diferenciadas (figura 23 M) que en células proliferativas (figura 23 I), En este caso, en el epitelio estratificado parece existir un gradiente de expresión, en donde se observa una menor expresión del canal en la capa basal y ligero aumento en las capas suprabasales (figura 23 P).

En cuanto a la expresión del canal TRPV6, observamos que de manera similar a la expresión de mensajero este se expresa mayoritariamente en las células proliferativas (figura 23 Q) en comparación con la cantidad de canal en células diferenciadas (figura 23 U). Adicionalmente en epitelio estratificado el canal TRPV6 se expresa mayoritariamente en la capa basal (figura 23 Y).

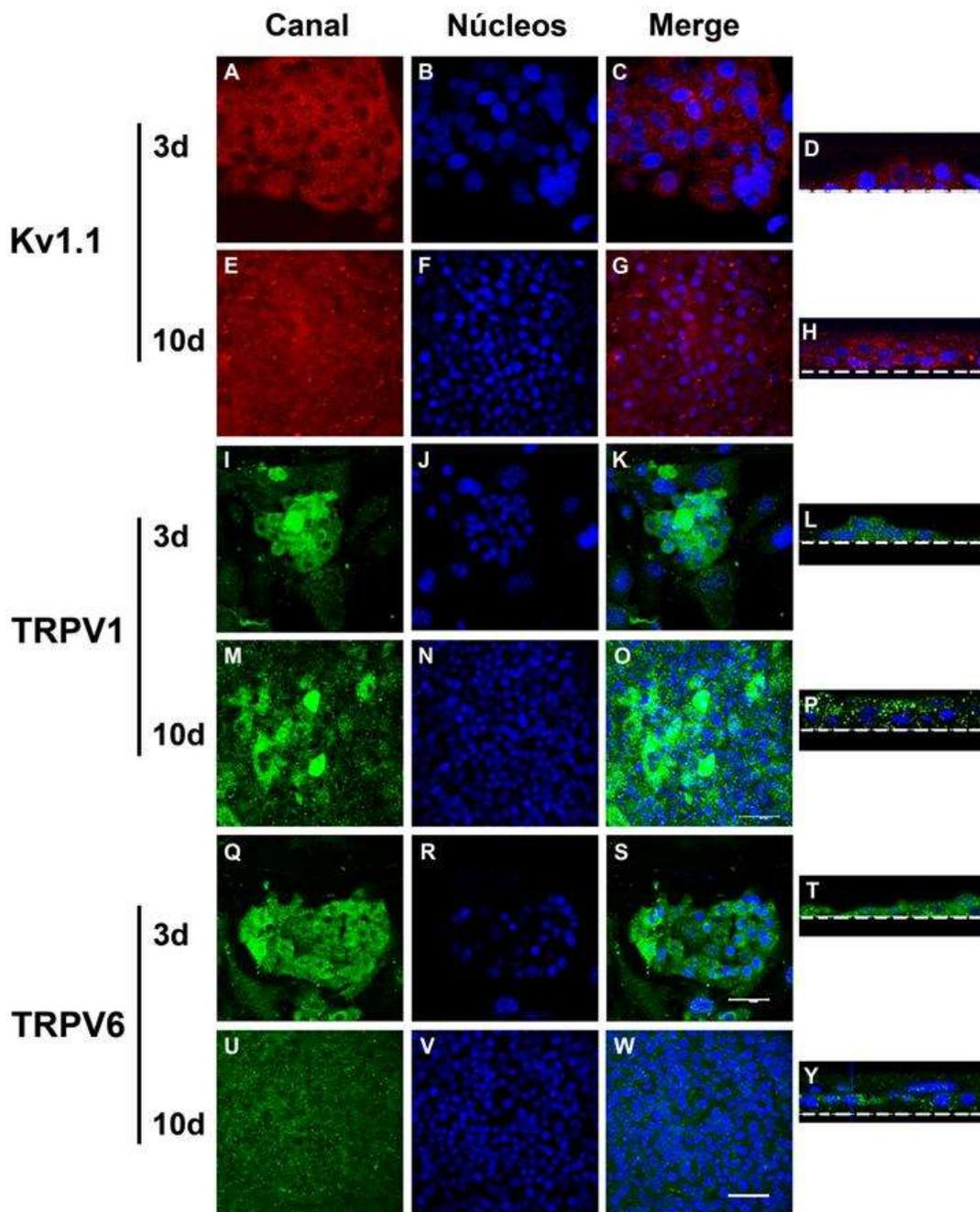


Fig.23 Localización subcelular de los canales Kv1.1 TRPV1 y TRPV6, en las células RCE1(5T5), Fotografías de microscopía confocal de células RCE1(5T5) de 3 y 10 días de cultivo, en donde se observa la inmunolocalización de los canales Kv1.1, TRPV1 y TRPV6). (A-D) detección del canal Kv1.1 en células proliferativas y diferenciadas (E-H). Detección del canal TRPV1 en células proliferativas (I) y diferenciadas (M), (Q) de TRPV6 en células proliferativas y diferenciadas (U), (D, H, L, P) cortes transversales de las células RCE1(5T5) de 3 y 10 días de cultivo. Tinción de núcleos con DAPI Barra 40 μ M.

En contraste con éstos canales, nuestros resultados muestran que durante el crecimiento y la diferenciación de las células RCE1(5T5) TRPV4 tiene un marcado cambio en su distribución subcelular. De manera que, observamos que en células proliferativas se encuentra localizado mayoritariamente en el núcleo y en menor grado en el citoplasma de la célula (figura 24 A). Mientras que en cultivos diferenciados la señal de TRPV4 se concentra en la parte apical de la capa celular más externa del epitelio (figura 24E y H).

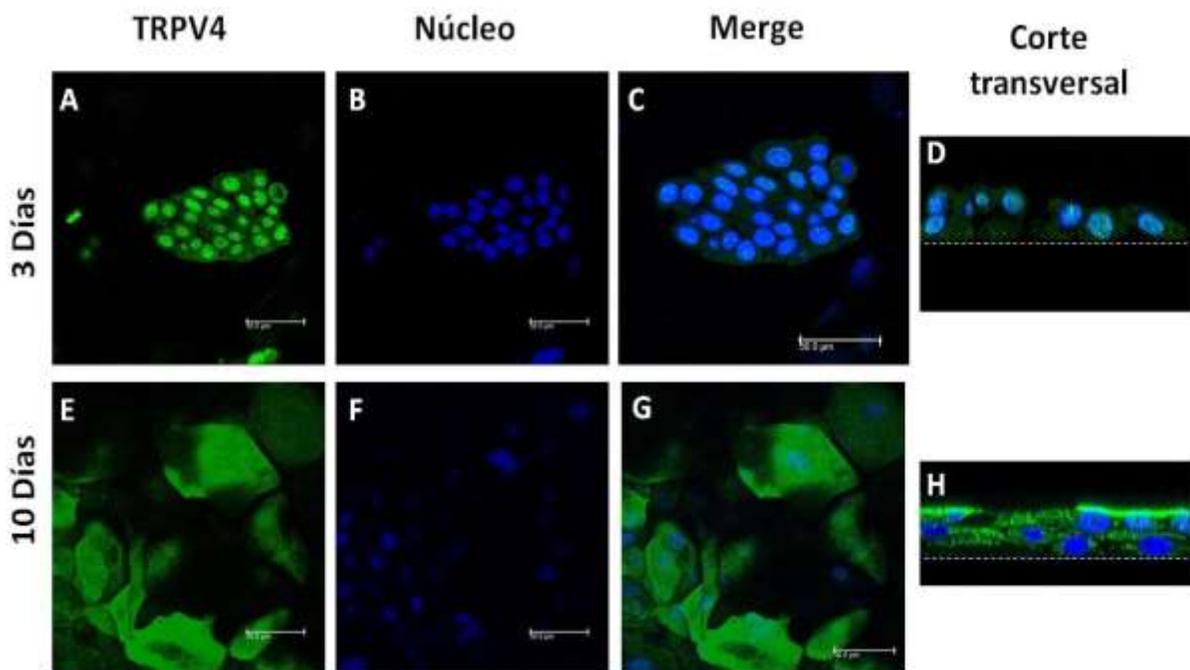


Fig.24 Cambio de localización subcelular del canal TRPV4 en las células RCE1(5T5). Imágenes de microscopía confocal de células RCE1(5T5) de 3 y 10 días de cultivo, en células proliferativas (A-D) el canal TRPV4 se encuentra mayoritariamente en el núcleo y en menor grado en el citoplasma. En cultivos diferenciados se observa concentrado en la membrana apical de la capa de células más externa del epitelio corneal y en menor grado en citoplasma (E-H). Los núcleos fueron teñidos con DraQ-7. Barra 50 μ m.

Para confirmar si la señal observada en la parte apical del epitelio era específica del canal TRPV4 se comparó la señal obtenida por inmunofluorescencia con dos diferentes anticuerpos: el anticuerpo que se usó en todos los experimentos de este

trabajo sc-98592 (Santa Cruz) que reconoce al dominio entre los aminoácidos 62-134 de la región amino terminal del canal. Y el anticuerpo ACC-124 (Alomone) el cual reconoce un dominio extracelular en la región del poro entre los aminoácidos 647-662. Para realizar estas inmunodetecciones se utilizaron células RCE1(5T5) de 14 días de cultivo sembradas sobre insertos de policarbonato. En la figura 25, se muestra el corte óptico de la parte apical del epitelio, en donde se puede observar que, con ambos anticuerpos, el canal TRPV4 se detecta en la membrana apical de las células de la capa más externa del epitelio diferenciado (figura 25 A y C), esta localización subcelular es evidente en los cortes transversales (figura 25 B y D). Adicionalmente en la figura 25 E y F se puede apreciar que la presencia del péptido inhibidor del anticuerpo ACC-124 durante inmunotinción elimina la señal de TRPV4 demostrando la especificidad de la inmunodetección

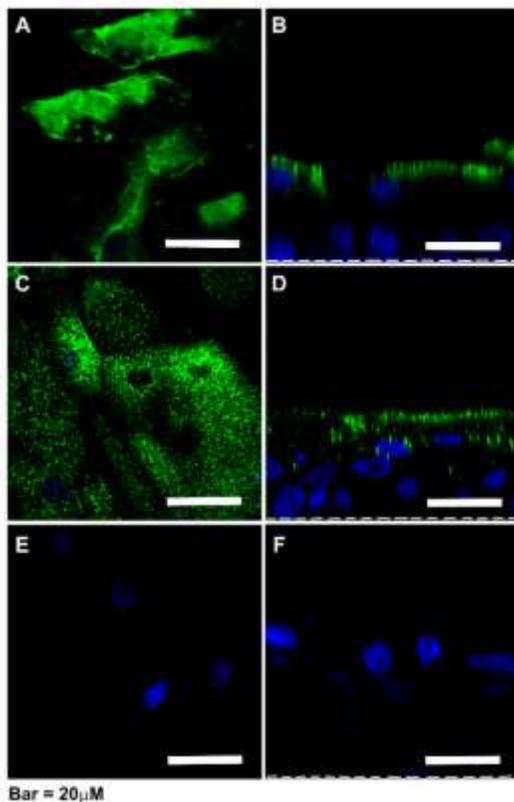


Fig.25 Inmunodetección del canal TRPV4 con dos diferentes anticuerpos en las células RCE1(5T5). Cortes ópticos de $0.2\mu\text{M}$ obtenidos por microscopía confocal de células RCE1(5T5) con 14 días de cultivo, (A, B) anticuerpo sc-98592, (C y D) anticuerpo ACC-124. Con ambos anticuerpos el canal TRPV4 se observa en la membrana apical de la capa de células más externa del epitelio corneal, señal que es inhibida por la adición con el péptido inhibidor del anticuerpo ACC-124. Mostrando la especificidad de la inmunodetección. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La línea continua corresponde a la parte basal del epitelio. Barra $50\mu\text{m}$.

Cambio de localización subcelular del canal TRPV4 en células RCE1(5T5) durante la diferenciación.

En primera instancia para evaluar si el cambio en localización subcelular observado del canal TRPV4, se encontraba asociado al grado de diferenciación de las células RCE1(5T5), se crecieron y fijaron células RCE1(5T5) a 3 y 10 días de cultivo y se realizó la coimmunotinción del canal TRPV4 y del marcador de diferenciación tardía citoqueratina K3, usando la tinción de actina con rodamina-faloidina para poder identificar cada célula de manera individual.

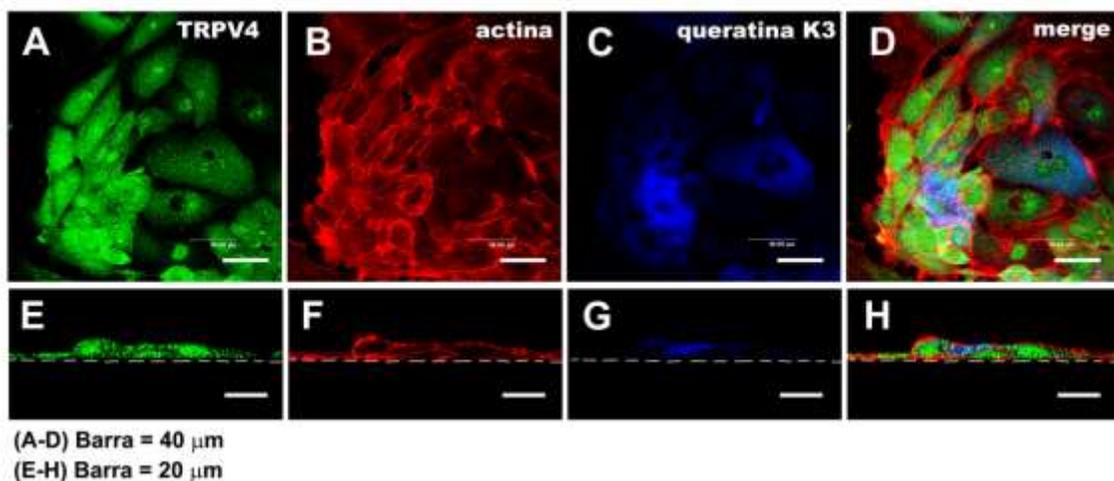


Fig.26 Inmunotinción del canal TRPV4 en una colonia de células RCE1(5T5) de 3 días de cultivo. El canal TRPV4 (verde) se localiza en el núcleo y el citoplasma de las células en proliferación (A), (B) tinción de actina con rodamina-faloidina (Rojo), (C) Expresión del marcador de diferenciación queratina K3, (D) Sobre posición de las señales de TRPV4, actina y queratina K3, (E-F) Cortes transversales, en donde se puede observar la señal de TRPV4 (verde) en el interior y en el borde celular.

En la figura 26 se muestra una colonia de células RCE1(5T5) de tres días de cultivo, en estas células el canal TRPV4 se localiza en el núcleo y en el citoplasma (figura 26A), notando que conforme avanza el grado de diferenciación de las

células el canal se distribuye de manera homogénea en el citoplasma. Las células con mayor grado de diferenciación se pueden distinguir por la presencia del marcador de diferenciación queratina K3 (figura 26 G), este cambio en distribución subcelular del canal TRPV4 se evidencia en la figura 26 H donde las células positivas para queratina K3 ya no presentan la tinción nuclear para el canal TRPV4, observando que en estas células el canal presenta una distribución homogénea en todo el citoplasma.

En la figura 27. se muestran cortes ópticos obtenidos por microscopia confocal a diferente profundidad de un epitelio diferenciado de células RCE1(5T5) de 10 días de cultivo. Se observa que, en las células de la capa basal, células proliferativas (figura 27A), y las suprabasales (figura 27E), la tinción del canal TRPV4 se observa de manera homogénea en todo el citoplasma de la célula, mientras que, en las células de la capa más externa, células con mayor grado de diferenciación del epitelio, la expresión del canal TRPV4 se observa en la membrana apical (figura 27I). Adicionalmente podemos observar que conforme a lo previamente reportado por García-Villegas *et al.*, (2009) el marcador de diferenciación queratina K3 comienza a expresarse en las células del estrato intermedio (figura 27G), posteriormente se expresa en casi todas las células de la capa apical las cuáles son las células con mayor grado de diferenciación del epitelio (figura 27K). Adicionalmente se observa que mientras que casi todas las células del estrato superior del epitelio son positivas para el marcador de diferenciación queratina K3 solo algunas de estas células son positivas para el canal TRPV4 en la membrana apical (figura 27L y P), por lo que la expresión de TRPV4 en la membrana apical

de la capa de células más externa del epitelio puede ser considerado como un rasgo de diferenciación tardío, posterior a la expresión de la citoqueratina K3.

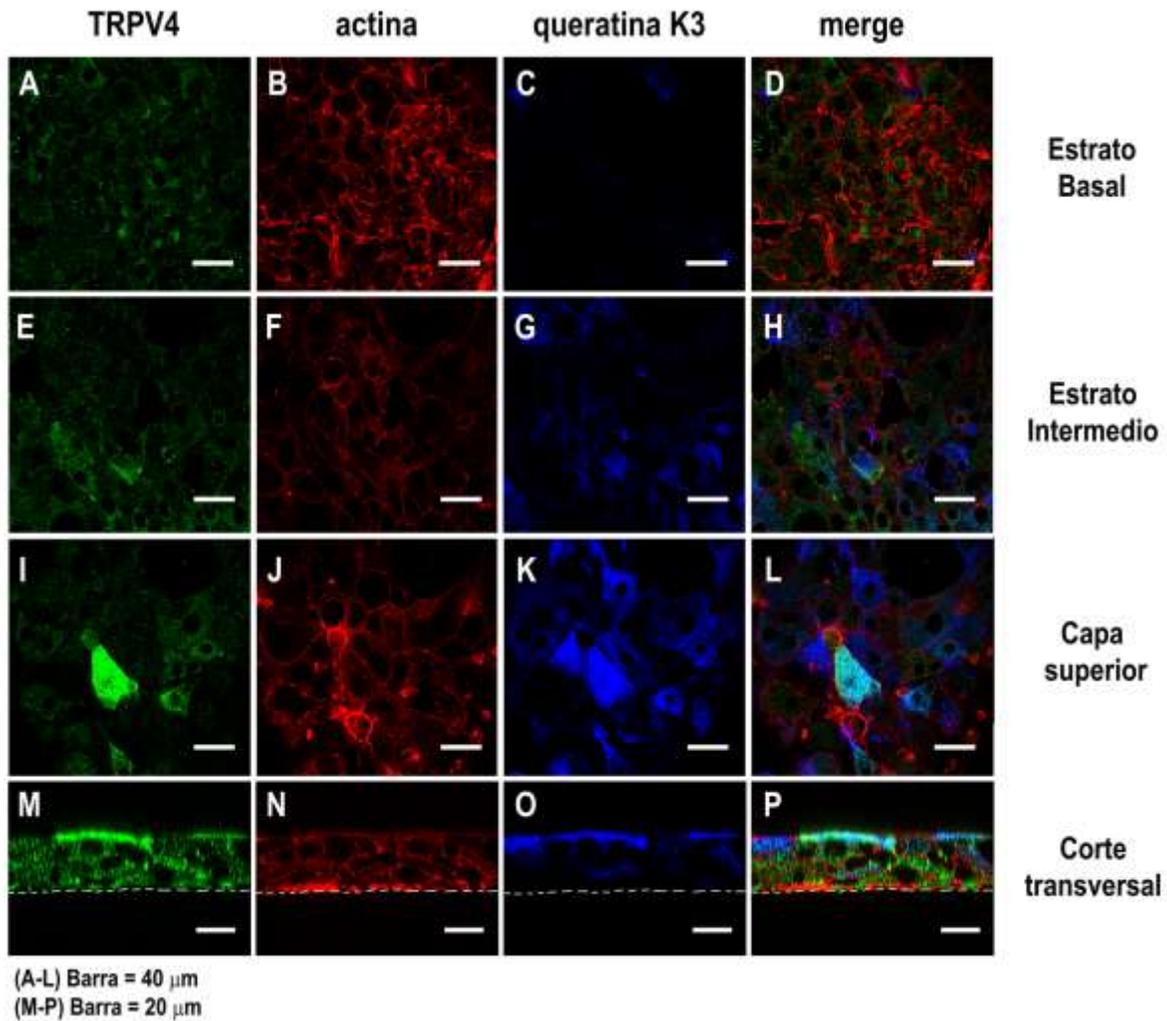


Fig.27 Localización subcelular del canal TRPV4 en células RCE1(5T5) diferenciadas. (A-L) Secciones ópticas de células RCE1(5T5) diferenciadas, 10 días de cultivo. TRPV4 (verde) es expresado en todos los estratos del epitelio, observando que en las células de los estratos basal (A) y suprabasal (E) se encuentra distribuido de manera homogénea en toda la célula, mientras que en el estrato superior del epitelio (I) la señal se concentra en la membrana apical de las células.

La tinción de actina con rodamina-faloidina (rojo) nos permite diferenciar cada célula de manera individual (B, F y J). a expresión del marcador de diferenciación queratina K3 se observa preferencialmente en la membrana apical de las células diferenciadas (K). (D, H y L) Sobre posición de las señales de TRPV4, actina y queratina K3 en los diferentes estratos del epitelio corneal. (M-P) cortes transversales, en donde se puede apreciar que la mayoría de las células del estrato superior expresan queratina K3 en la membrana apical, mientras la expresión del canal TRPV4 comienza a aparecer en algunas células. La línea punteada indica la parte basal del epitelio.

Cinética de expresión del canal TRPV4 en células RCE1(5T5)

Posteriormente para evaluar si los cambios en localización subcelular de TRPV4 son acompañados por cambios en los niveles de la proteína del canal se determinó la cantidad de TRPV4 por western blot y densitometría durante la cinética de proliferación y diferenciación de las células RCE1(5T5). De las muestras obtenidas se cargaron 40 µg de proteínas totales en un gel de acrilamida al 10%, Las bandas obtenidas fueron cuantificadas por densitometría y se normalizaron con respecto a los niveles de expresión de actina. En la figura 28, podemos observar que la expresión canal TRPV4 a nivel proteína (peso aproximado 120 kDa) disminuye a través del tiempo, de manera que en los cultivos diferenciados la expresión del canal se reduce un 70% en comparación con la cantidad de canal expresado en cultivos proliferativos,

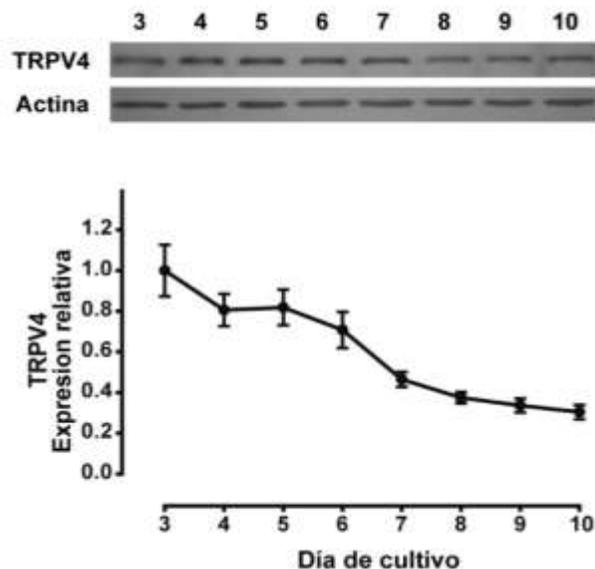


Fig.28 Cinética de expresión de la proteína del canal TRPV4 en células RCE1(5T5) proliferativas y diferenciadas. WB de TRPV4 donde la expresión de TRPV4 a nivel de proteína disminuye a través del tiempo, observando que en cultivos diferenciados la cantidad de canal disminuye un 70% con respecto a la cantidad de canal expresado en cultivos proliferativos. Los resultados representan el promedio +/- en ES, de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos se normalizaron con los niveles de expresión de actina.

Expresión funcional del canal TRPV4 en células RCE1(5T5)

Debido a que la señal de TRPV4 que se observa por inmunofluorescencia es mayoritariamente intracelular, y no membranal, como se esperaría para un canal iónico activo (salvo en las células diferenciadas donde el canal se expresa en la membrana apical de la capa de células más externa), lo siguiente que decidimos evaluar fue si el canal TRPV4 se expresaba funcionalmente en las células de epitelio corneal RCE1(5T5).

Inicialmente se evaluaron diferentes indicadores fluorescentes de Ca^{2+} para probar cuál era el más adecuado para detectar los cambios en la concentración de calcio intracelular en nuestro modelo celular. Se probaron los indicadores Fluo-3 AM, Fluo 4-AM y Oregon Green BAPTA-1 AM (OGB-1AM) (Molecular Probes), para lo cual células RCE1(5T5) fueron crecidas durante 11 días, sobre cajas petri con fondo de cristal, y fueron cargadas durante 30 min con cada uno de los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} a una concentración de 5 μM . Posteriormente, se registraron los cambios en fluorescencia intracelular evocados por la perfusión de capsaicina 10 μM , el activador específico del canal TRPV1 (Caterina et al., 1997), debido a que previamente identificamos la expresión del canal TRPV1 a nivel de RNAm y proteína, y considerando que Megler *et al.*, (2010) reportaron la expresión funcional del canal TRPV1 en células transformadas de epitelio corneal humano.

En la figura 29 se muestran los trazos representativos de los cambios de calcio intracelular de las células RCE1(5T5), registrados durante la perfusión de

capsaicina y con respecto a la respuesta basal, donde podemos observar que el indicador intracelular de calcio Fluo 4-AM es el único que evidencia la entrada de calcio inducida por la activación del canal TRPV1.

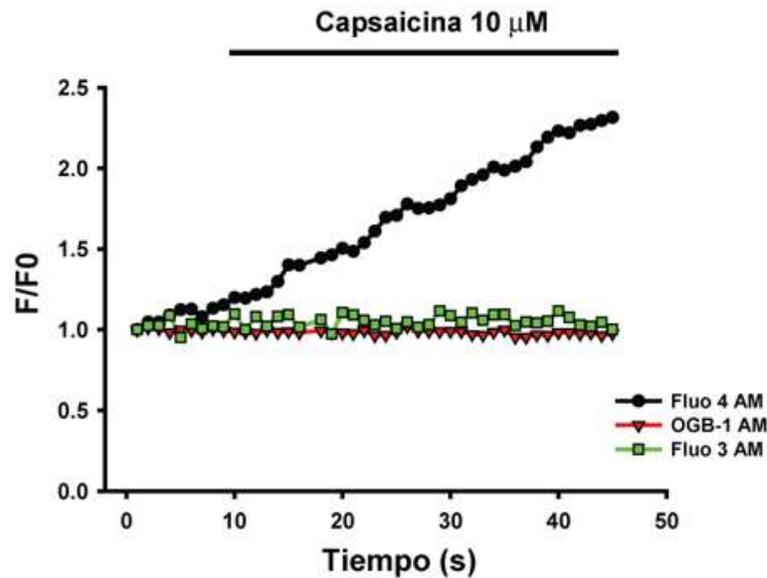


Fig.29 Cambio en el Ca^{2+} intracelular en células RCE1(5T5) tratadas con capsaicina 10 μM . Trazos representativos de la medición de calcio intracelular de células RCE1(5T5) de 11 días de cultivo cargadas previamente con los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} Fluo4 AM, OGB-1 AM y Fluo 3 AM. Respuesta inducida por la perfusión del activador del canal TRPV1 capsaicina a 10 μM , el tiempo de perfusión se indica con una línea.

Por lo que decidimos utilizar el indicador Fluo 4-AM para evaluar los cambios de calcio intracelular de las células RCE1(5T5). Una vez seleccionado el indicador fluorescente de Ca^{2+} , lo siguiente que hicimos fue un estudio preliminar para medir la entrada de calcio a las células RCE1(5T5) a partir de la activación del canal TRPV1 con capsaicina incrementando los tiempos de registro. Las células RCE1(5T5) de 11 días de cultivo fueron incubadas durante 30 min con Fluo 4AM (5 μM) en solución salina (HBSS), y posteriormente se registraron los cambios en

fluorescencia a temperatura ambiente en presencia de capsaicina 10 μM en HBSS.

En la figura 30 se observa que la capsaicina induce un incremento intracelular de Ca^{2+} , que no se observa en las células control tratadas únicamente con HBSS. F/F0 representa a los valores de fluorescencia normalizados con respecto a la fluorescencia basal, indicando que el canal TRPV1 se expresa funcionalmente en las células RCE1(5T5).

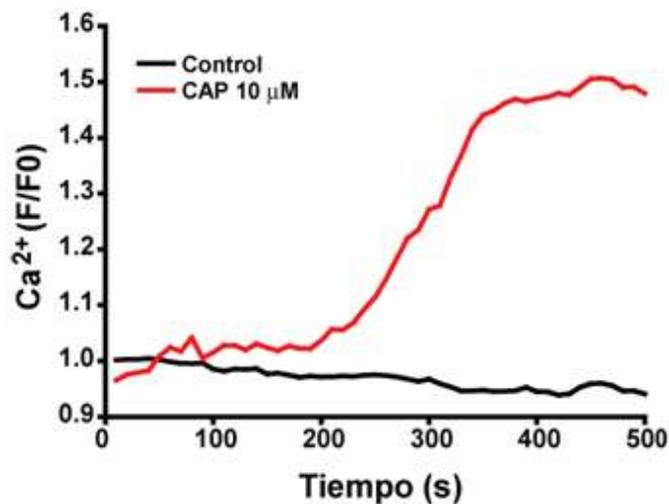


Fig.30 Expresión funcional del canal TRPV1 en células RCE1(5T5), análisis de imágenes de calcio intracelular de células RCE1(5T5) de 11 días de cultivo en presencia de capsaicina. Trazos representativos del aumento de calcio intracelular inducidos por la presencia de capsaicina 10 μM (rojo) y las células control con HBSS (negro), n= 15 con un porcentaje de respuesta del 50%

Una vez que observamos que Fluo 4-AM era internalizado por las células RCE1(5T5) y que daba un rango de respuesta que nos permitía evaluar cambios en el Ca^{2+} intracelular se procedió a evaluar la presencia de canales TRPV4 funcionales, para lo cual, cultivos de 4 y 11 días fueron cargados durante 30 min con Fluo 4 AM (5 μM) y registradas en presencia del activador GSK101 (100 nM) o

el inhibidor específicos RN-1734 (30 μ M) del canal TRPV4, así como en presencia del quelante de calcio EGTA (2 mM).

Los registros se hicieron enfocando la parte apical del cultivo, en la figura 31A se muestran imágenes de células RCE1(5T5) de 11 días de cultivo cargadas con Fluo 4-AM, antes de la estimulación (A), durante el aumento de la fluorescencia inducido por GSK101 (figura 31B), y durante la disminución de la fluorescencia inducida por la adición de RN-1734 (figura 31C).

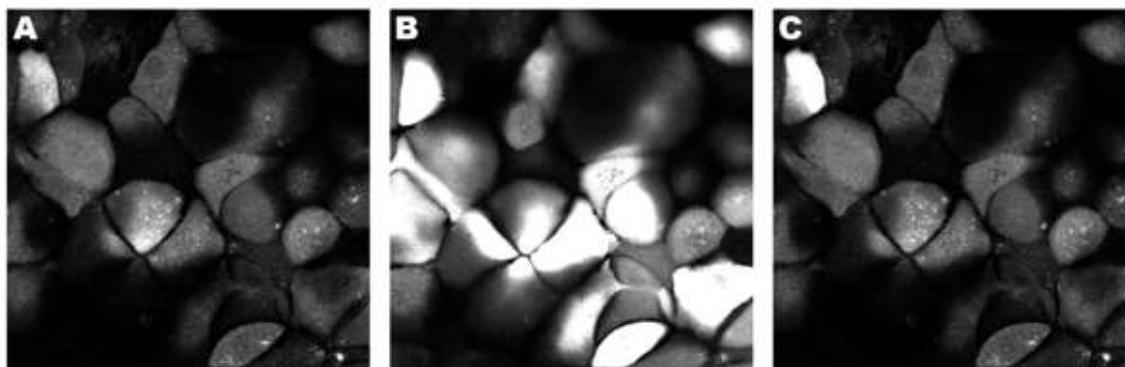


Fig.31 Aumento de Ca²⁺ intracelular inducido por la activación del canal TRPV4 en Células RCE1(5T5) diferenciadas. (A) Fluorescencia basal de las células RCE1(5T5). (B) Células RCE1(5T5) perfundidas con GSK101 100 nM durante 100 s, y posteriormente con RN-1734 30 μ M en el segundo 400 de registro.

En la figura 32 A, B y C se presentan los trazos representativos del cambio intracelular de calcio durante el tiempo de registro, normalizados con respecto a la respuesta basal (F/F₀), inducidos por la adición de GSK101, RN-1734 y/o EGTA. En esta gráfica se puede observar que GSK101 induce un incremento de calcio intracelular que es abatido por RN-1734 (figura 32B) o EGTA (figura 32A). Estos resultados demuestran que el canal TRPV4 es funcional en las células RCE1(5T5) y que conduce calcio al interior de la célula.

Por otro lado, se observa que en las células tratadas previamente con RN-1734 la adición de GSK101 ya no es capaz de inducir el aumento de calcio intracelular (figura 32C), demostrando que el incremento de calcio promovido por la adición de GSK101 se debe a la activación del canal TRPV4.

En la figura 32D se muestra una gráfica con el promedio del cambio en los niveles intracelulares de calcio, registrados en células individuales, inducidos por la presencia de GSK101, RN1734 o EGTA, con respecto a la respuesta basal ($\Delta F/F_0$). Donde se puede observar que GSK101 induce un $\Delta F/F_0$ de 2.02 ± 0.35 .

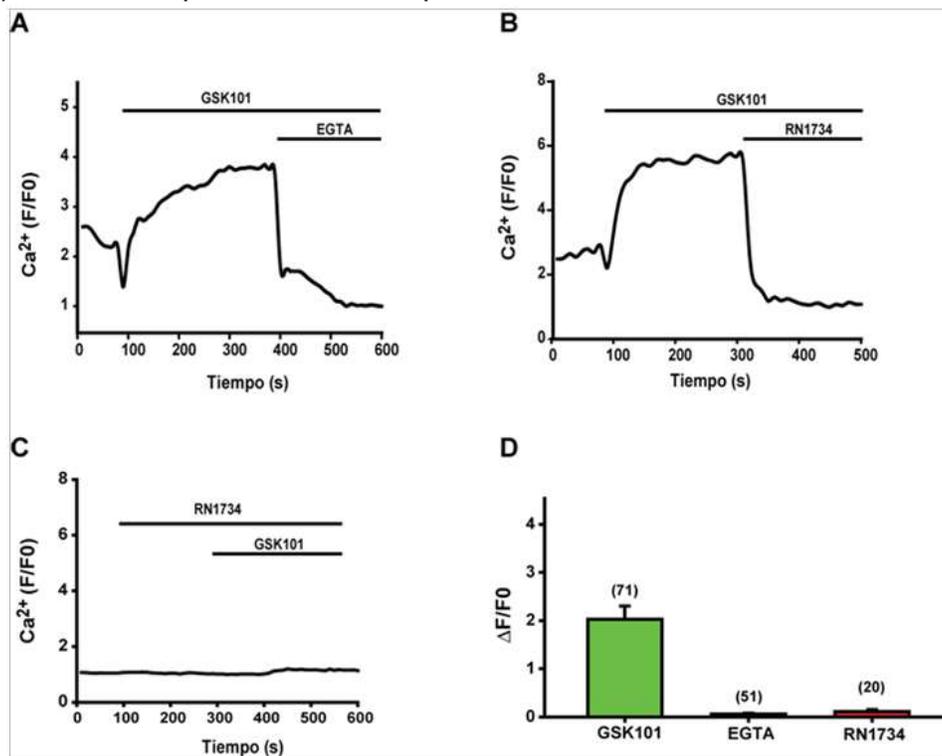


Fig.32 Expresión funcional de TRPV4 en células RCE1(5T5) diferenciadas, incremento de calcio intracelular de células RCE1(5T5) de 11 días de cultivo inducidos por GSK101 100 nM y la posterior disminución por la perfusión de EGTA 2mM(A) o RN-1734 (B), (C) Trazo representativo de la ausencia de respuesta a GSK101 en células pretratadas con RN-1734 30 μ M. Las barras indican la duración de cada estímulo.

(D) Gráfica con el promedio del cambio en la fluorescencia inducido por GSK101, así como la posterior inhibición por EGTA o RN-1734 con respecto a la fluorescencia basal. Los resultados representan la media \pm el error estándar y los números sobre las barras indican el número de células registradas en cada condición.

El 55% de las células respondieron a GSK101, aunque la magnitud de estas respuestas fue heterogénea, es decir, la cantidad de calcio que entra a cada una de las células es diferente, generando aumentos de fluorescencia (ΔF) con diferentes magnitudes. Este efecto se evidencia en el histograma de la figura 33A

Durante la realización de los registros de calcio intracelular observamos que además de que no todas las células tienen la misma magnitud de respuesta, no todas tienen el mismo tiempo de retardo, por lo que evaluamos la posibilidad de que las diferencias en la magnitud de la respuesta (ΔF) pudieran estar relacionadas con el tiempo de retardo. En la figura 33B se muestra un gráfico con las ΔF de cada célula con respecto al tiempo de retardo, donde se puede observar que no existe una correlación entre la magnitud y el tiempo de retardo.

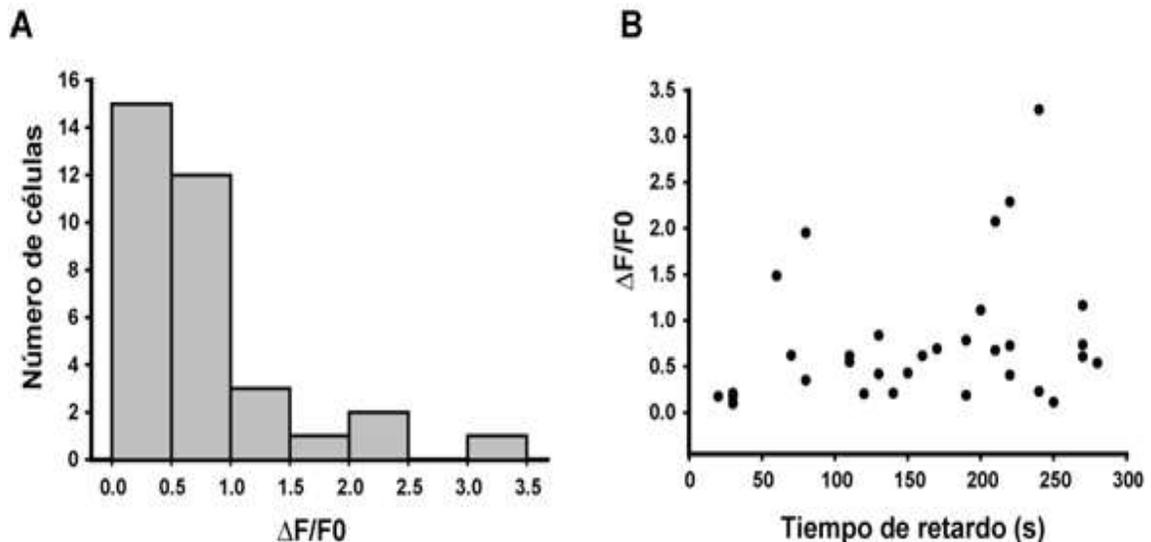


Fig.33 Respuesta heterogénea de la activación del canal TRPV4 en cultivo, (A) Histograma de $\Delta F/F_0$ de las células de células RCE1(5T5) de 11 días de cultivo en presencia del activador del canal TRPV4 GSK101. (B) Tiempo de retardo vs $\Delta F/F_0$.

Otra posibilidad es que estas diferencias en la magnitud de respuesta de las células podrían estar relacionadas con las diferencias en la cantidad de canales

expresados en cada célula pues como se observa en la figura 27I, las células RCE1(5T5) de la capa más externa, expresan diferentes cantidades de canal en la superficie apical.

De manera adicional observamos que el canal TRPV4 tiene actividad espontánea en estas células, lo que se puede observar en la figura 34, donde se presenta un trazo representativo de la fluorescencia (F) normalizado con respecto a la fluorescencia mínima (F min) de células RCE1(5T5) en HBSS, en el cual se puede apreciar que durante los primeros 200 segundos existe una entrada de calcio, después del segundo 200 la activación TRPV4 con de GSK101 100nM induce un aumento de la entrada de calcio a las células, y después del segundo 300 ambas entradas de calcio, tanto la espontánea como la inducida por la presencia de GSK101 son inhibidas por la presencia de RN-1734 30 μ M, sugiriendo que la entrada espontánea de calcio de las células RCE1(5T5) se debe al menos en parte a la actividad del canal TRPV4.

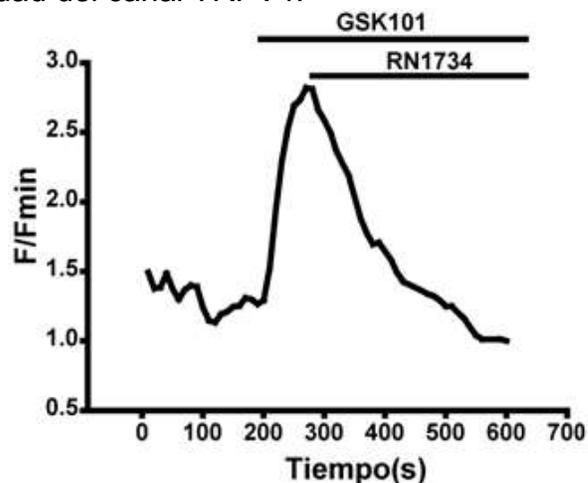


Fig.34 Actividad espontánea del canal TRPV4 en células RCE1(5T5), Trazo representativo de los cambios de calcio intracelular en las células RCE1(5T5) en buffer HBSS, donde se puede observar que en los primeros segundos 200 segundos existe una entrada de calcio, después del segundo 200 la activación del canal TRPV4 con de GSK101 100nM induce un aumento de la entrada de calcio a las células, y en el segundo 300 ambas entradas de calcio, tanto la espontánea como la estimulada por GSK101 son inhibidas por la presencia de RN-1734 30 μ M.

También se evaluó la actividad del canal TRPV4 en cultivos proliferativos de 4 días, en la figura 35 se puede observar que la adición del activador específico del canal TRPV4 GSK101 100 nM induce la entrada de calcio a las células, $\Delta F/F_0=1.08\pm 0.15$ (figura 35C), el cual es inhibido por RN1734 30 μ M o EGTA 2mM (figura 35A). Este aumento de calcio intracelular es de menor magnitud que el observado al activar al canal TRPV4 en las células diferenciadas y es evitado si las células son pretratadas con RN1734 o EGTA (figura 35B).

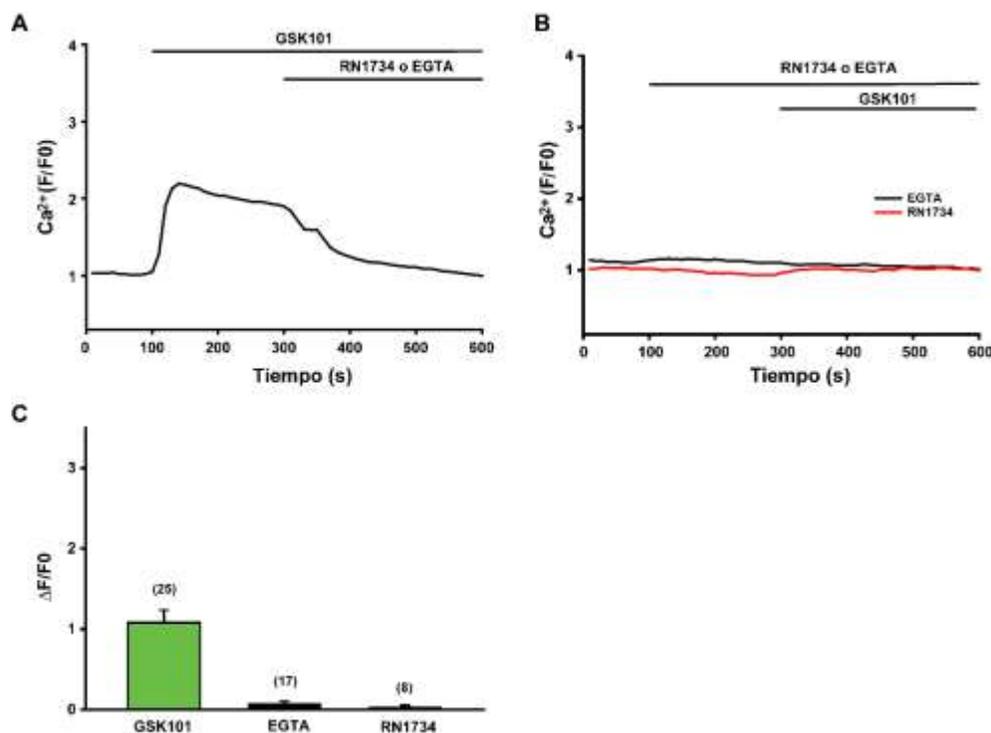


Fig.35 Expresión funcional de TRPV4 en células RCE1(5T5) proliferativas, incremento de calcio intracelular de células RCE1(5T5) de 4 días de cultivo inducido por GSK101 100nM y la posterior disminución por la adición de EGTA 2mM o RN-1734 (A), (B) Trazo representativo de las células pretratadas con RN-1734 30 μ M. Las barras indican la duración de cada estímulo. (C) Gráfica con el promedio del cambio en la fluorescencia inducido por GSK101, así como la posterior inhibición por la presencia de EGTA o RN-1734 con respecto a la fluorescencia basal. Los resultados representan la media +/- el error estándar y los números sobre las barras indican el número de células registradas en cada condición.

En conclusión, estos resultados demuestran que el canal TRPV4 es funcional en células RCE1(5T5), que permite el flujo de calcio al interior de estas células y que su activación genera una respuesta heterogénea.

Adicionalmente comprobamos que podemos activar y bloquear de manera específica al canal TRPV4 en nuestro modelo celular del epitelio corneal mediante la utilización de GSK101 y RN-1734, respectivamente.

La función del canal TRPV4 es necesaria para el establecimiento y modulación de las uniones estrechas en el epitelio corneal

La redistribución subcelular del canal TRPV4 hacia la región apical de la capa celular más externa del epitelio diferenciado nos sugirió que además de la función regulatoria sobre el volumen celular, TRPV4 podría participar en otras funciones epiteliales.

Se ha reportado que el canal TRPV4 modula la función de barrera de las uniones estrechas en queratinocitos epidermales (Akazawa et al., 2013; Kida et al., 2012; Reiter et al., 2006; Sokabe and Tominaga, 2010), aunque también existen reportes que muestran el efecto contrario, que TRPV4 aumenta la permeabilidad para celular, en endotelio pulmonar y células de epitelio mamario (Alvarez et al., 2006; Cioffi et al., 2009; Reiter et al., 2006). Tomando en cuenta que en los epitelios formados por las células RCE1(5T5), TRPV4 se localiza en la membrana apical de las células de la capa más externa, decidimos evaluar si la actividad de TRPV4 podría regular las uniones estrechas en este epitelio.

Primero evaluamos si el canal TRPV4 estaba relacionado con el establecimiento de las uniones estrechas. Para esto medimos la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de cultivos de células RCE1(5T5) sembradas en insertos de policarbonato, a las cuales al séptimo día de cultivo, justo antes de la formación de las uniones estrechas, (Ortiz-Melo et al., 2013) se les adicionó GSK101 a concentraciones de 10, 50, 100 nM o bien RN-1734 a 10, 20 o 30 μ M. estos experimentos mostraron que en presencia de RN-1734, disminuyó significativamente los niveles de TER del cultivo. En el día 12 después de la siembra los valores de TER en células tratadas con RN-1734 30 μ M disminuyen a $107 \pm 11 \Omega \cdot \text{cm}^2$ comparado con de $162 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ el control (figura 36A), sugiriendo que la función de TRPV4 es necesaria para el correcto establecimiento de las uniones estrechas en este epitelio. De manera adicional observamos que el tratamiento con GSK101 incrementa de los valores de TER de manera dependiente de la dosis de $162 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ en cultivos control a $219 \pm 8 \Omega \cdot \text{cm}^2$. De manera interesante, este efecto solo se observa a partir del día 12 de cultivo cuando las TJ ya se han formado. Lo que sugiere que la activación de TRPV4 incrementa TER de las TJ ya formadas.

Para confirmar la participación de TRPV4 en la modulación de las uniones estrechas ya establecidas, crecimos células RCE1(5T5) en insertos hasta el doceavo día de cultivo, cuando las uniones estrechas se encuentran completamente establecidas, dado que los valores de TER se mantienen constantes. Al doceavo día de cultivo las células se trataron durante 48 h con diferentes concentraciones del activador GSK101 (10, 50 o 100 nM) o con el bloqueador RN-1734 (10, 20 o 30 μ M). Se observó que la activación del canal

TRPV4 incrementa los valores de TER de $155 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (células control) a $201 \pm 10 \Omega \cdot \text{cm}^2$, a las seis horas del inicio del tratamiento, observando la mayor respuesta ($229 \pm 12 \Omega \cdot \text{cm}^2$) a las 48 horas del inicio del tratamiento (figura 36B). Por otro lado, el tratamiento con RN-1734 en estas condiciones experimentales no produce cambios en los valores de TER. Estos resultados nos sugieren que TRPV4 modula la función de barrera de las uniones estrechas ya establecidas aumentando los valores de TER.

Para confirmar la participación de la función del canal TRPV4 en el establecimiento de las uniones estrechas, células RCE1(5T5) de 5 días de cultivo fueron transfectadas con 2 plásmidos diferentes (RabV4sh1 y RabV4sh-2) que producen RNAs inhibidores (shRNAs) específicos diseñados contra la secuencia de TRPV4 de conejo (No. Ac. KX523177), con una mezcla (1:1) de ambos interferentes, así como con el sh scramble (shScr) y el vector vacío. Posteriormente se realizaron mediciones de TER cada 24 h. La presencia de cualquiera de los dos RNA de interferencia bloqueó el aumento normal de los valores de TER, observándose el mayor efecto en el décimo día de cultivo cuando la transfección con el shRNA RabV4sh-2 redujo los valores de TER a 128 ± 2 comparado con 181 ± 6 del control (figura 36C), demostrando que el canal TRPV4 es necesario para el correcto establecimiento de las TJ en el epitelio corneal

Adicionalmente para la validación de los shRNA células RCE1(5T5) de 5 días de cultivo fueron transfectadas con los plásmidos RabV4sh1 y RabV4sh-2, con la mezcla (1:1) de ambos interferentes, como con el sh scramble (shScr) o con el vector vacío, 5 días pos transfección se extrajo la proteína total de los cultivos y 30

µg de las muestras obtenidas fueron analizadas por western blot. En la figura 36D, se observa que la presencia de RabV4sh1 y RabV4sh-2 o bien con la mezcla de ambos interferentes disminuye la expresión del canal TRPV4

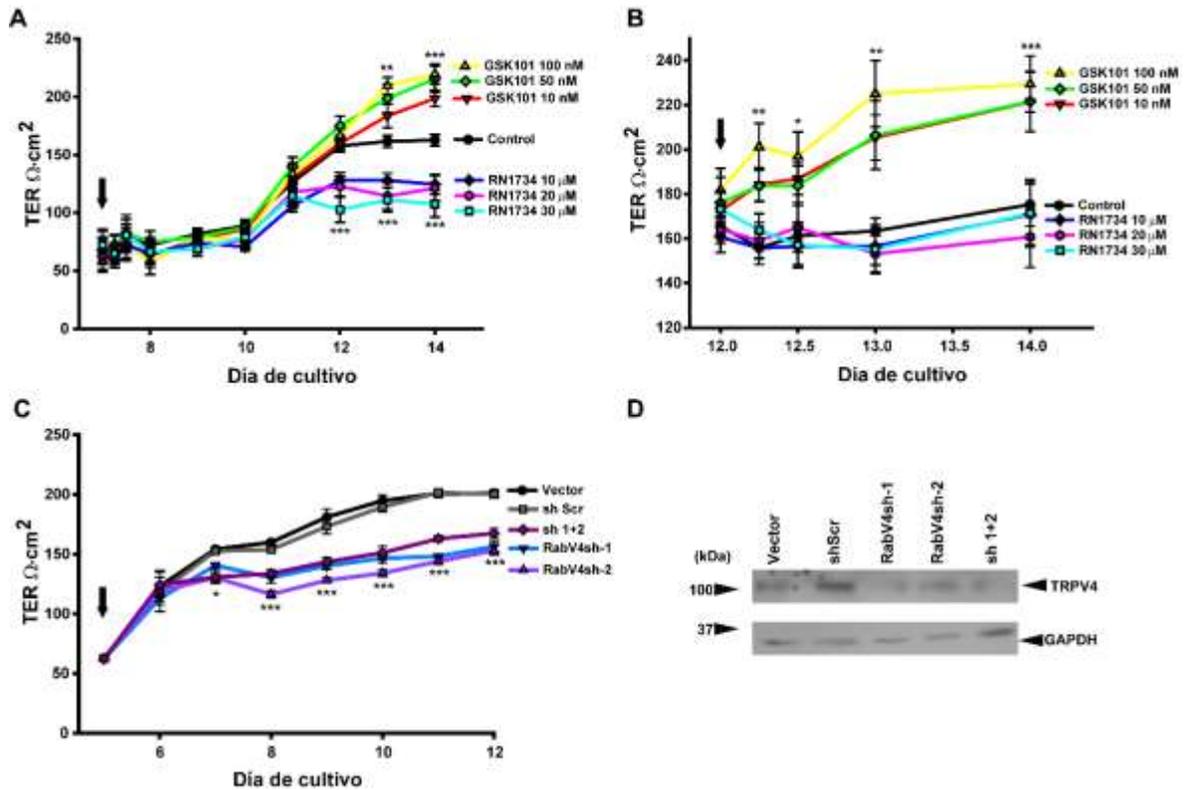


Fig.36 TRPV4 es necesario para el establecimiento y modulación de las unión estrecha en el epitelio corneal. Mediciones de TER de células RCE1(5T5) sembradas sobre insertos de policarbonato; (A) tratadas a partir al séptimo día de cultivo con GSK101 (100, 50, 10 nM) o RN-1734 (30, 20, 10 µM). De manera concentración dependiente la presencia de RN-1734 evita aumento normal de TER. La adición de GSK101 incrementa los valores de TER a partir del día 12 de cultivo. (B) células tratadas durante 48 h a partir del día 12 con GSK101 (100, 50, 10 nM) o RN-1734 (30, 20, 10 µM). GSK101 incrementa los valores de TER a las 6 h de iniciado el tratamiento, observando el efecto máximo a las 48 h. (C) Transfectadas al 5 día con los shRNA de TRPV4, en las cuales se observa que en ausencia del canal TRPV4 no incrementan los valores de TER (D) validación de los shRNA de TRPV4 la transfección con los shRNA 1 y 2 o bien de la mezcla de ambos disminuye a expresión del canal TRPV4, se utilizó como control la expresión de GAPDH. Los valores expresados representan la media ± el error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado, n=9, donde las diferencias significativas con respecto al control están como p<0.05 (*), p<0.01 (**) o p<0.001 (***). Las flechas indican el inicio del tratamiento.

La activación de TRPV4 aumenta la cantidad de claudina-4 en las TJ

Se ha reportado que la activación de TRPV4 en queratinocitos epidermales aumenta los valores de TER, a través del aumento de la expresión de las proteínas de la unión estrecha ocludina y claudina-4 (Akazawa et al., 2013; Kida et al., 2012).

Para evaluar si el aumento de TER observado en las células RCE1(5T5) en presencia del activador específico del canal TRPV4 GSK101 producía un cambio en la expresión de las proteínas de la unión estrecha se analizó la expresión de la claudina -1, claudina-4 y ocludina, proteínas cuya expresión ha sido previamente reportadas en las células RCE1(5T5) (Ortiz-Melo et al., 2013), mediante inmunofluorescencia y western blot en cultivos de células RCE1(5T5) de 12 días de cultivo, tratados con el activador (GSK101 100nM) o con el inhibidor (RN1734 30 μ M) del canal TRPV4 durante 48 hrs.

En la figura 37 se puede observar que después del tratamiento con GSK101 100 nM se presentó un aumento en la señal detectada de la claudina-4 (figura 37A) en el las TJ, evidenciada por su colocalización con Z0-1. También se observó un aumento en la señal de claudina-1, sin embargo, esta señal se localiza intracelularmente, de manera dispersa en el citoplasma y en menor proporción en unión célula-célula (figura 37A).

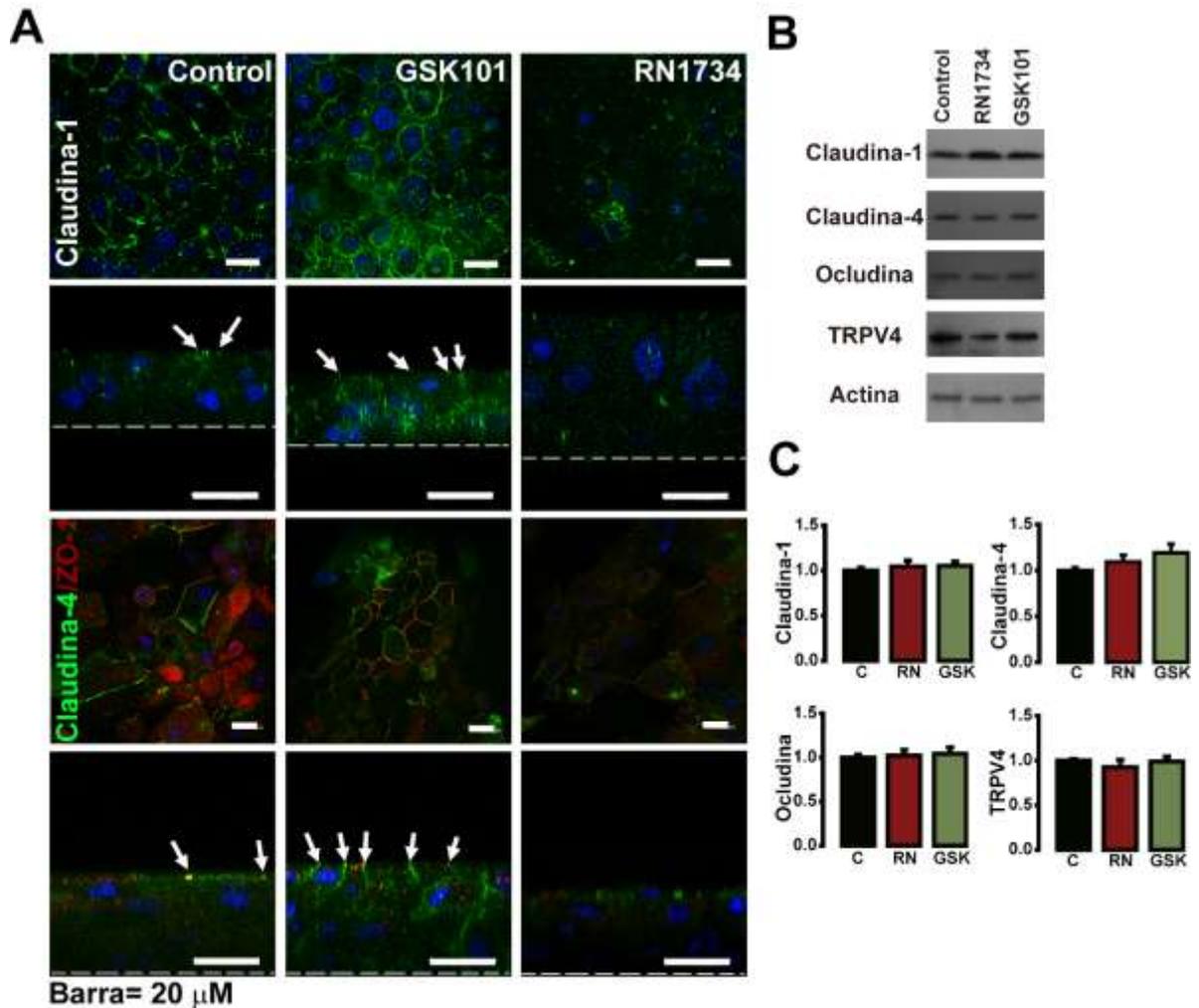


Fig.37 La activación del canal TRPV4 con **GSK101** aumenta la localización de **claudina-4** en las uniones estrechas (A) Inmunofluorescencia de claudina-1 -4 y ZO-1 de cultivos de células RCE1(5T5) tratados durante 48 horas con GSK101 (100 nM) o con RN17-34 (30 μ M). La activación de TRPV4 aumenta la localización de claudina-4 en las uniones estrechas indicado con las flechas, y de claudina-1 en los bordes célula-célula de la parte apical del epitelio. La línea punteada señala la basal del epitelio.

(B) WB de Claudina -1,-4, occludina y TRPV4 de cultivos de células control y tratados durante 48 horas con GSK101 (100 nM) o RN1734 (30 μ M), (C) densitometría de las bandas obtenidas en los WB mostrados en B, Los valores corresponden al promedio +/- en ES, de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Por otro lado, el tratamiento con RN-1734 disminuyó la señal detectada de claudina-1 y claudina-4 (figura 37A). Estos cambios detectados por inmunofluorescencia no fueron acompañados por cambios en la cantidad de estas proteínas medidas por WB (figura 37 B y C). Esto sugiere que la activación de TRPV4 no modifica la cantidad de las proteínas que constituyen la unión estrecha, sino más bien, podría estar aumentando los valores de TER a través de un aumento en el ensamblaje de claudina-4 en las TJ de este epitelio.

La activación de TRPV4 con GSK101 modifica su localización subcelular.

Zhao et al., en 2012 reportaron que la activación de TRPV4 en miocitos de rata mediante un estímulo hipoosmótico, correlaciona con la translocación del canal del núcleo al citoplasma, es decir la actividad del canal parece modificar su localización subcelular (Zhao et al., 2012). Por este motivo, evaluamos si la actividad del canal TRPV4 está asociada al cambio en su localización subcelular. En la figura 38 se muestran cortes ópticos de los diferentes estratos del epitelio formado por células RCE1(5T5) inmunoteñidas con el anticuerpo específico del canal TRPV4 (verde), en donde se puede observar que el canal TRPV4 se expresa en el citoplasma de las células de la capa basal (figura 38A) e intermedia (figura 38D), mientras que se localiza en la membrana apical de las células de la capa más externa (figura 38G), esta localización apical es más evidente en el corte transversal del epitelio (figura 38J). En cultivos tratados con GSK101 hay un aumento del canal TRPV4 en la membrana apical de las células de la capa de células más externas (figura 38K), mientras que en cultivos tratados con el

inhibidor parece existir una disminución en la cantidad de canal TRPV4 asociado a la región apical (figura 38L).

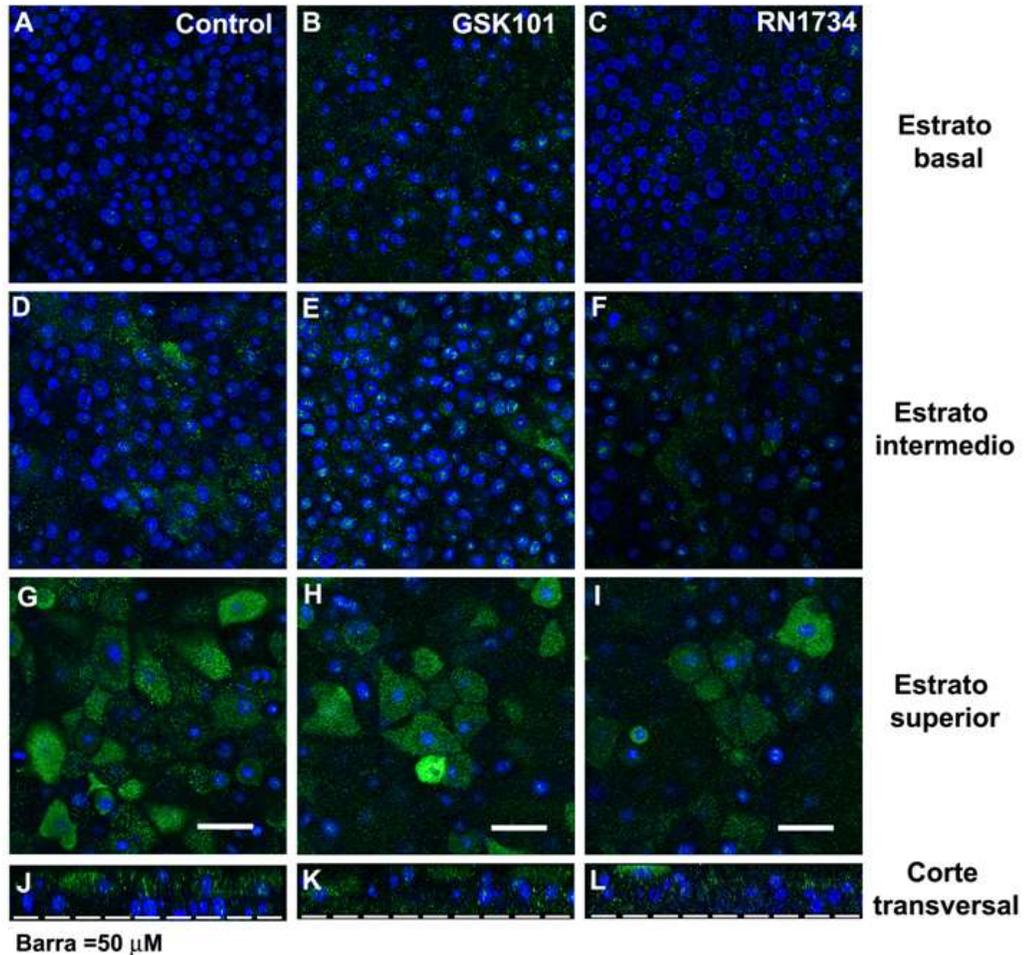


Fig.38 Cambio de localización subcelular del canal TRPV4 en células RCE1(5T5) diferenciadas tratadas con GSK101 o con RN1734. (A-I) Secciones ópticas de células RCE1(5T5) diferenciadas con 12 días de cultivo tratados durante 48 h con GSK101 (100nM) o RN-1734 (30 μM). TRPV4 (verde) es expresado en todos los estratos del epitelio, observando que en las células de los estratos basal (A) y suprabasal (D) se encuentra distribuido de manera homogénea en toda la célula, mientras que en el estrato superior del epitelio (G) es expresado en la membrana apical de las células, después del tratamiento con GSK101 aparenta haber un incremento de la expresión del canal TRPV4 (H) mientras que la presencia de RN-1734 lo disminuye (I). (J-L) cortes transversales del epitelio. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul).

La actividad del canal TRPV4 es necesaria para la modulación de la TER ejercida por EGF en las células de epitelio corneal RCE1(5T5).

Ortiz-Melo *et al.*, (2012) reportaron que la presencia de EGF aumenta los valores de TER en células RCE1(5T5). Por otro lado se sabe que el canal TRPV4 pueden formar un canal funcional heteromerizando con TRPP2, el cual es activado por EGF (Du *et al.*, 2014; Kottgen *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2005), dado que nosotros encontramos que TRPV4 modula las TJ en el epitelio corneal, decidimos analizar si el aumento de TER inducido por EGF en células de epitelio corneal estaba relacionado con la actividad del canal TRPV4.

Para abordar esta pregunta medimos los valores de TER en cultivos de células RCE1(5T5) crecidos sobre insertos de policarbonato, los cuales fueron privados de EGF a partir del octavo día de cultivo. Posteriormente al día 12 cuando los valores de TER habían disminuido 40 % ($100 \pm 6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ con respecto al control 176 ± 5) los cultivos fueron tratados con GSK101 (100 nM) o RN-1734 ($30 \mu\text{M}$), solos o en combinación con EGF.

En estos experimentos pudimos observar que conforme a lo previamente reportado por Ortiz-Melo *et al.* (2012) en ausencia de EGF los valores de TER en células RCE1(5T5) disminuye al 12 día de cultivo ($100 \pm 6 \Omega \cdot \text{cm}^2$) en comparación con los valores de TER de las células que permanecieron en EGF durante todo el tiempo de cultivo ($150 \pm 1 \Omega \cdot \text{cm}^2$), ver figura 39.

Por otro lado, observamos que GSK101 aumenta los valores de TER al mismo nivel que el de las células tratadas con EGF y el RN-1734 evita el aumento en la

TER inducido por el tratamiento con EGF ($95 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$), figura 39. Estos resultados demuestran que se necesita la actividad del canal TRPV4 para observar la regulación de la unión estrecha ejercida por EGF.

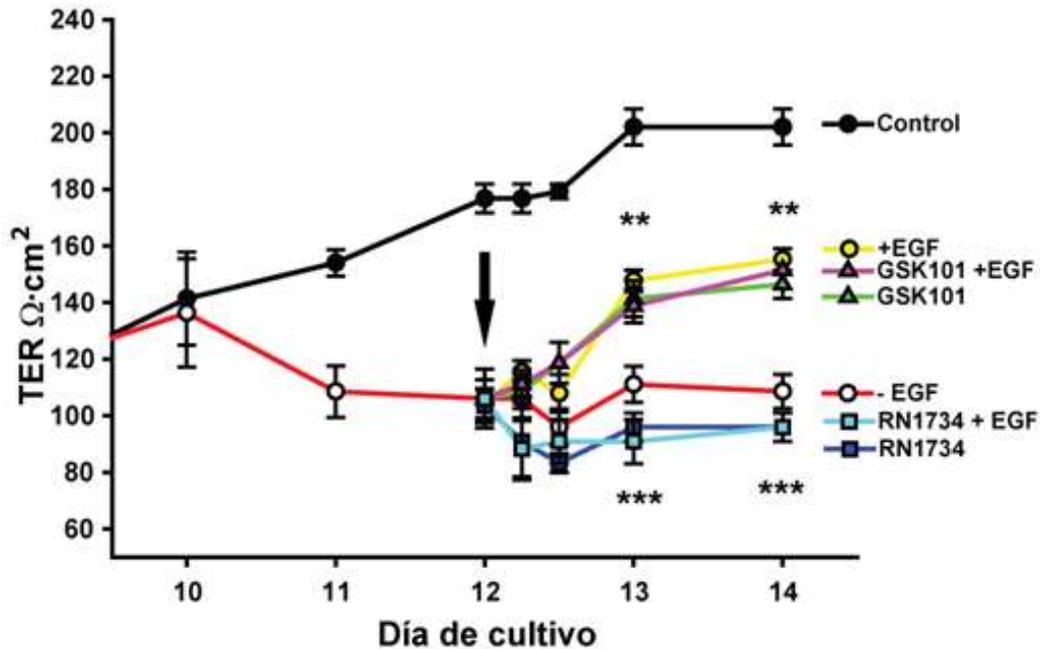


Fig.39 La función del canal TRPV4 participa en la regulación de la TER ejercida por EGF. Valores de TER de cultivos de células RCE1(5T5) sembrados sobre insertos, los cuales fueron crecidos en ausencia de EGF por 4 días. Al día 12 de cultivo las células fueron tratadas con GSK101 (100 nM) o RN1734 (30 μM) en presencia o ausencia de EGF. En ausencia de EGF GSK101 incrementa los valores de TER a los mismos valores de las células tratadas con EGF. En contraste RN-1734 evita el incremento de la TER inducido por EGF lo que sugiere que el canal es necesario para la regulación de la TER ejercida por EGF.

Los valores mostrados corresponden a la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado, $n=9$, donde las diferencias significativas con respecto al control están como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) o $p < 0.001$ (***). La flecha indica el inicio del tratamiento.

La regulación de las uniones estrechas en epitelio corneal es específica del canal TRPV4

Previamente se reportó la expresión del canal TRPV1 en epitelio corneal humano (Zhang et al., 2007); así mismo, nosotros encontramos que la función de TRPV1 también está presente en las células RCE1(5T5), figuras 29 y 30. Considerando que TRPV1 participa en la modulación de la permeabilidad paracelular en células de glándulas submandibulares, donde la activación del canal TRPV1 aumenta la permeabilidad celular, asociada a la disminución de la expresión de ocludina (Cong et al., 2012; Cong et al., 2013).

Decidimos evaluar si la modulación de las uniones estrechas en el epitelio corneal es específica del canal TRPV4 o bien, si el canal TRPV1 también podría participar en su modulación. Para esto, se realizaron mediciones de la TER en cultivos de células RCE1(5T5) tratados con capsaicina (10 μ M), el activador específico del canal TRPV1 (Caterina et al., 1997). Adicionalmente las células RCE1(5T5) también fueron tratadas con GSK101, el activador de TRPV4, en ausencia de EGF para determinar si la activación de TRPV4 era suficiente para restaurar los valores de TER. Adicionalmente se trataron los cultivos con RN-1734, inhibidor de TRPV4, para evaluar la participación del canal TRPV4 en la formación de las uniones estrechas en ausencia de EGF.

Los resultados de estos experimentos nos muestran que la capacidad de modular a las uniones estrechas es específica del canal TRPV4 ya que la activación de

TRPV1 con capsaicina no modifica los valores de TER, sugiriendo que el canal TRPV1 no se encuentra relacionado con la regulación de las uniones estrechas en este epitelio (figura 40).

Por otro lado, la activación del canal TRPV4 con GSK101 aumenta los valores de TER al mismo nivel que las células tratadas con EGF durante los días 8 al 12, período durante el cual se establecen las uniones estrechas, sin embargo, no es suficiente para mantener los valores normales de TER en los días 13 y 14 ($179 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$) cuando se presentan diferencias significativas respecto a las células tratadas con EGF ($204 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Esto sugiere que el canal TRPV4 participa en la formación de las uniones estrechas mediada por EGF, pero que, al mismo tiempo, son necesarias otras moléculas para mantener los valores de TER.

De manera adicional la presencia de RN-1734 disminuye los valores de TER de manera significativa a partir del día 12, en ausencia de EGF, mostrando que TRPV4 tiene una actividad independiente de EGF en la regulación de las uniones estrechas del epitelio corneal.

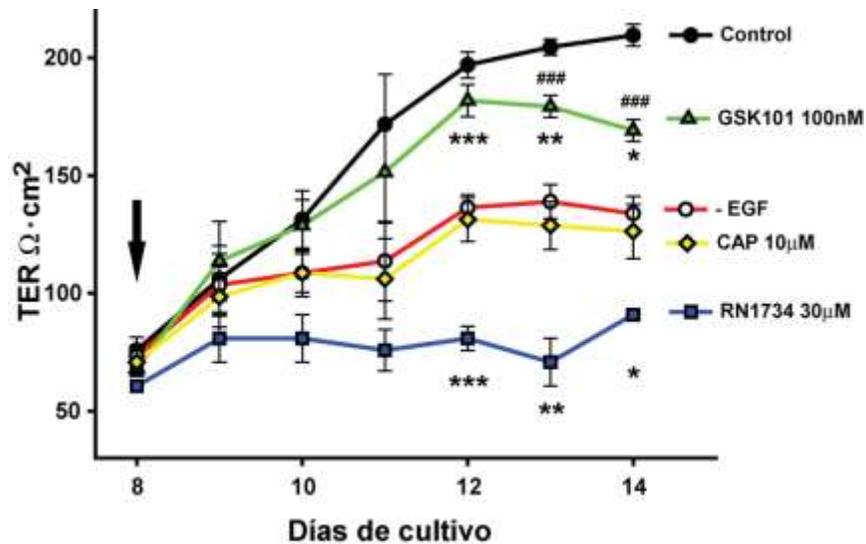


Fig.40 La regulación de las uniones estrechas es específica de TRPV4. Valores de TER de cultivos de células RCE1(5T5) de 8 días, tratados con, capsaicina (10 μ M), GSK101 (100 nM) o RN1734 (30 μ M) en ausencia de EGF. Observando que capsaicina no modifica los valores de TER. La adición de GSK101 aumenta los valores de TER y RN-1734 los disminuye en ausencia de EGF, lo que sugiere que el canal tiene un efecto en la modulación de las uniones estrechas independiente de EGF.

Los valores expresados representan la media \pm el error estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado, n=6, donde las diferencias significativas con respecto las células crecidas en ausencia de EGF están como p<0.05 (*), p<0.01 (**) o p<0.001 (***) y las diferencias significativas con respecto al control están como p<0.001 (###). Las flechas indican el inicio del tratamiento.

Expresión de TRPP2 en células RCE1(5T5) y colocalización con TRPV4

Kottgen *et al.*, 2008 reportaron que TRPV4 puede formar un canal funcional asociado al canal TRPP2 activado por EGF (Ma et al., 2005). Por otra parte nosotros encontramos que en células RCE1(5T5) el canal TRPV4 es necesario para el aumento de TER inducida por EGF (figura 39), con base en lo anterior, analizamos si las células RCE1(5T5) proliferativas y diferenciadas expresaban al canal TRPP2 así como su posible colocalización con el canal TRPV4 mediante

experimentos de inmunolocalización, en células RCE1(5T5) de 3 y 14 días de cultivo, para posteriormente ser fueron fijadas e inmunoteñidas con los anticuerpos específicos para los canales TRPV4 y TRPP2.

En la figura 41 se muestra la cotinción del canal TRPV4 (verde) y el canal TRPP2 (Rojo) en una colonia de células RCE1(5T5) de 3 días de cultivo, en esta imagen se puede observar que las células RCE1(5T5) expresan el canal TRPP2 de manera homogénea en todo el citoplasma (figura 41B) mientras que el canal TRPV4 se encuentra distribuido tanto en citoplasma como en el núcleo de las células (figura 41A), observando solo en algunos puntos la colocación de la señal de ambos canales, (figura 41D).

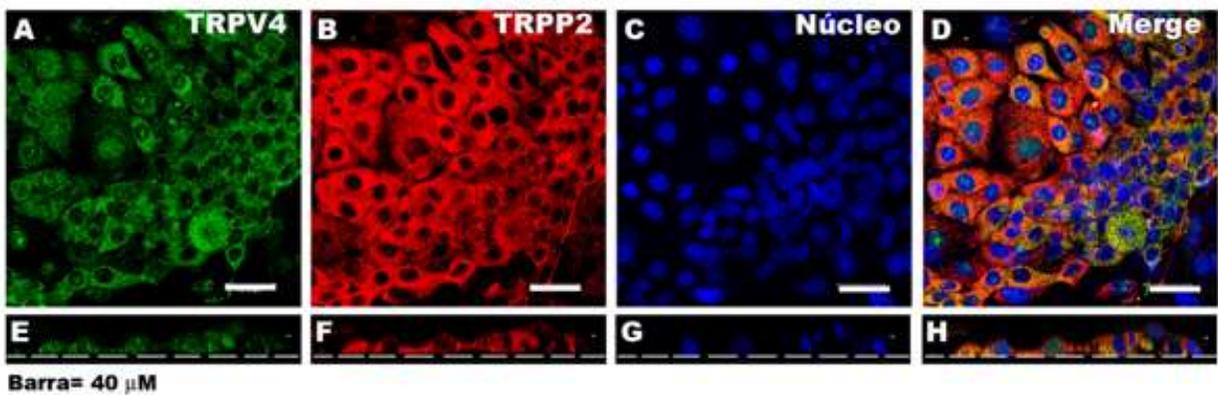


Fig.41 Expresión de los canales TRPV4-TRPP2 en una colonia de células RCE1(5T5) de 3 días de cultivo. El canal TRPV4 (verde) es expresado en el núcleo y el citoplasma de las células (A), mientras que el canal TRPP2 (rojo) se observa de manera homogénea en el citoplasma, (C) Tinción de núcleos con DAPI (azul), (D) Sobre posición de los canales de TRPV4, TRPP2 y núcleos, (E-F) Cortes transversales.

basal y suprabasal media, mientras que en la capa más externa del epitelio se observa en la membrana apical de las células superficiales (figura 42).

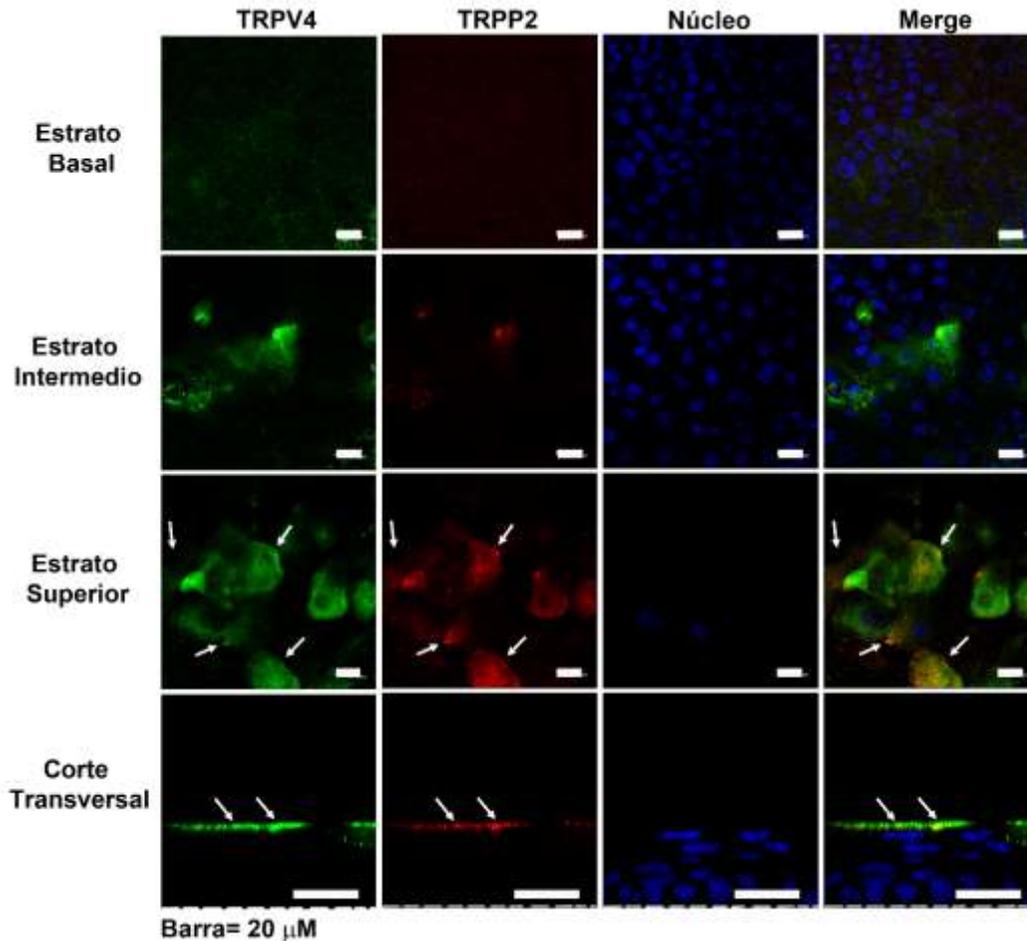


Fig.42 Inmunodetección del canal TRPP2 en células RCE1(5T5) y colocación con el canal TRPV4. Coinmunotinción de TRPV4 y TRPP2 en cultivos de células RCE1(5T5) de 14 días de cultivo sembradas sobre insertos. TRPV4 (verde) es expresado de manera homogénea en las células de las capas basal y suprabasal del epitelio, observando que en las células de capa superior es expresado en la membrana apical. TRPP2 es expresado homogéneamente en todas las células de las diferentes capas del epitelio, tinción de núcleos con DAPI (azul), En la sobreposición de las señales de los canales TRPV4, TRPP2 y núcleos de las diferentes capas del epitelio, se observa que en la parte apical de cultivo hay un empalme de las señales para TRPP2 y TRPV4 señaladas por flechas. La línea punteada señala la parte basal del epitelio

Por otro lado, el canal TRPP2 se encontró en el citoplasma de las células de todas las capas del epitelio, observándose un gradiente de expresión donde la capa basal es la que expresa menor cantidad del canal y la capa apical es la que tiene la mayor cantidad del canal. Al sobreponer de la señal de ambos canales se observa que conforme aumenta el grado de diferenciación de las células también aumenta el grado de colocación con el canal TRPV4, es decir en las células basales existe muy poca colocación de la señal de ambos canales, aumenta en la capa intermedia y en la parte apical del epitelio se observa una clara colocación de los canales TRPV4 y TRPP2, sugiriendo la posibilidad de la formación de heterotetrámeros de TRPV4 y TRPP2

Expresión del receptor a EGF en las células RCE1(5T5) y colocación con el canal TRPV4.

Nuestros resultados muestran que la activación del canal TRPV4 mimetiza el efecto de EGF sobre las uniones estrechas en el epitelio corneal. Por lo tanto, decidimos analizar la localización del receptor a EGF (EGFR) en las células RCE1(5T5), así como la posible colocación con el canal TRPV4, para esto se realizó la cotinción del canal TRPV4 y el EGFR en células RCE1(5T5) proliferativas y diferenciadas, utilizamos dos diferentes anticuerpos para el EGFR, los anticuerpos utilizados fueron sc-03 de Santa Cruz Biothecnology y E2760 de Sigma.

Con el anticuerpo sc--SC-03 se pudo observar que tanto en células proliferativas (figura 43A) como en células diferenciadas (figura 43E) el receptor a EGFR (verde) se observa distribuido de manera heterogénea, es decir solo se observa en algunas células y en las células que se encuentra expresado parece localizarse en la membrana apical de las células, mostrando colocalización con la señal del canal TRPV4 (rojo) en la membrana apical de las células de la capa más externa en las células diferenciadas (figura 43H),

Por otro lado, en la tinción con el anticuerpo E2760 se observa un patrón de expresión diferente, se ve una distribución homogénea del receptor a EGF (rojo) en todas las células, con un patrón punteado tanto en células proliferativas (figura 48 I) como en células diferenciadas (figura 43 M), al sobrelapar la señal de este anticuerpo con la señal del canal TRPV4 (verde) no se observa colocalización de las señales (figura 43 L, P). Esta diferencia tan evidente en las tinciones para el receptor a EGF con los dos anticuerpos utilizados nos impidió identificar la localización subcelular real para el EGFR en las células RCE1(5T5).

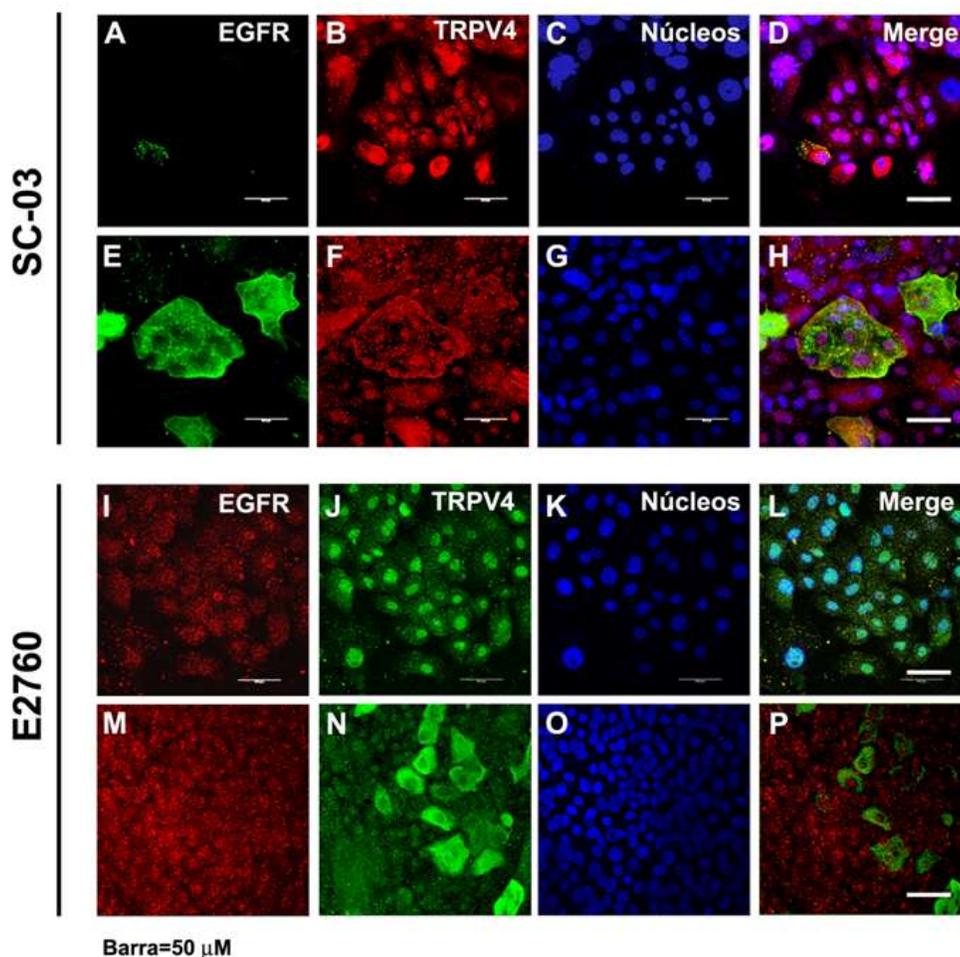


Fig.43 Inmunodetección del EGFR y del canal TRPV4 en células RCE1(5T5). Coinmunotinción de EGFR y TRPV4 en cultivos de células RCE1(5T5) de 3 y 10 días de cultivo con los anticuerpos SC-03 de Santa Cruz y E2760 de SIGMA.

Con el anticuerpo SC-03, el EGFR (verde) se observó distribuido de manera homogénea en las células de 3 días de cultivo (A) mientras que a los 10 días de cultivo se observa solo en la parte apical de algunas células (M). El canal TRPV4 (Verde) se observa en el núcleo y en el citoplasma de las células proliferativas (B), mientras que se observa en la membrana apical de la capa más externa de células del epitelio diferenciado (F). Tinción de núcleos con DAPI (C, G). Empalme de la señal de los canales de TRPV4, EGFR y núcleos (D, H) donde observa que en la parte apical de cultivo hay un empalme de las señales para EGFR y TRPV4.

Con el anticuerpo E2760, el EGFR (rojo) se observa de manera homogénea con un patrón punteado en todas las células tanto de 3 (I) y 10 días de cultivo (M). TRPV4 (rojo) es expresado en el núcleo y citoplasma de las células proliferativas (B), en el epitelio diferenciado se observa en la membrana apical de la capa de células más externa (N). Tinción de núcleos con DAPI (K, O). Empalme de la señal de los canales de TRPV4, EGFR y núcleos (L, P). En este caso no se observa colocalización de las señales de EGFR y TRPV4.

DISCUSION

En el presente trabajo describimos la expresión diferencial de los canales TRPV1, TRPV4 y TRPV6 a nivel de RNAm y de proteína, a lo largo del crecimiento y diferenciación de las células RCE1(5T5), observando que a nivel de mensajero cada canal tiene una cinética diferente de expresión. El canal TRPV6 presenta un incremento de expresión al sexto día de cultivo lo cual podría estar relacionado con el inicio al programa de diferenciación de las células de epitelio corneal. Adicionalmente se ha reportado su participación en la diferenciación de queratinocitos (Garcia-Hernandez et al., 2015; Pan et al., 2008).

Por el contrario, la expresión del RNAm del canal TRPV4 permanece constante durante la proliferación y diferenciación de RCE1(5T5). Al considerar los niveles de las proteínas correspondientes, el canal que parece ser mayoritario es TRPV4. Mengler *et al.*, (2010) reportó la presencia del canal TRPV4 en células de epitelio corneal de humano, observando que en cortes de tejido hay un gradiente de expresión del canal TRPV4, sugiriendo una mayor concentración del canal en la parte central y apical del epitelio. En este epitelio se ha descrito que el canal TRPV4 regula el volumen celular (Pan et al., 2008), sin embargo, nuestras observaciones muestran que en el epitelio corneal de conejo, TRPV4 tiene un evidente cambio en su localización subcelular y que parece depender del grado de diferenciación de las células. En cultivos proliferativos TRPV4 se localiza mayoritariamente en el núcleo y citoplasma de las células y posteriormente en cultivos diferenciados se expresa en la membrana apical de la última capa de células, como un rasgo tardío de diferenciación. Estas observaciones fueron

confirmadas en tinciones de rebanadas de córneas aisladas de conejos adultos en donde también se observa que TRPV4 se localiza mayoritariamente en la región apical de algunas células de la capa celular más externa del tejido, ver figura 44, (Martínez-Rendón et al., 2016).

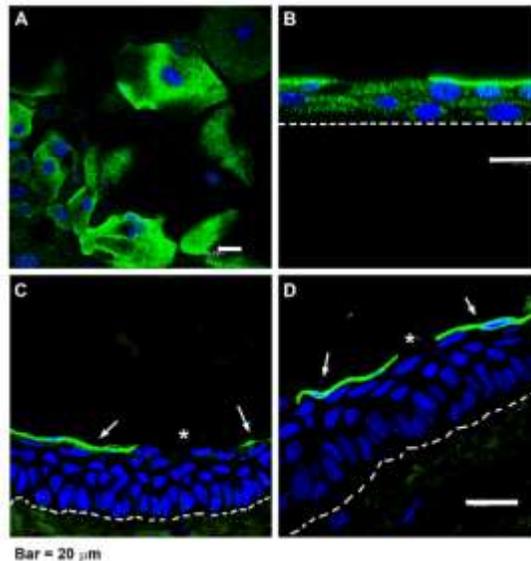


Fig.44 Inmunodetección del canal TRPV4 en epitelio corneal de conejo. Cortes ópticos de 0.2μM obtenidos por microscopía confocal de células RCE1(5T5) 14 días de cultivo, (A,B) donde el canal TRPV4 se localiza en la membrana apical de la capa del células más externa, similar distribución se observa en cortes de 8 μM de epitelio corneal (C y D) Barra 20 μm. Tomado de Martínez-Rendón et al., 2016

Adicionalmente los resultados de las cinéticas de crecimiento y diferenciación realizadas en presenciaria de rojo de rutenio, capzacepina y RN-1734 nos sugieren que uno de los canales que podría estar involucrado en la proliferación y/o diferenciación de las células RCE1(5T5) es el canal TRPV4, por lo que decidimos enfocarnos a analizar la posible participación del canal TRPV4 en la diferenciación de esta línea celular, a través de estudiar la formación y modulación de las uniones estrechas.

Inicialmente demostramos la expresión funcional del canal TRPV4 en las células de epitelio corneal de conejo RCE1(5T5) ya que la perfusión del activador específico de TRPV4 GSK101 evoca un incremento de calcio intracelular el cual es abatido por la perfusión con RN-1734, un inhibidor específico de TRPV4 o bien por EGTA.

Posteriormente se realizaron las mediciones de TER (las cuales reflejan del grado de hermeticidad de las TJ) donde observamos que la activación de TRPV4 con GSK101 aumenta los valores de resistencia eléctrica transepitelial pero solo cuando las células RCE1(5T5) están diferenciadas es decir, cuando el canal TRPV4 se localiza en la membrana apical de la última capa de células, lo que nos sugiere que es necesario que el canal se localice en la membrana apical para poder modular las uniones estrechas de este epitelio. Evidenciando que TRPV4 podría tener diferentes funciones en la célula dependiendo del lugar en el que se localice dentro de la célula.

Nuestros resultados demuestran que la activación de TRPV4 es necesaria para el correcto establecimiento de las uniones estrechas en el epitelio corneal, debido a que el bloqueo del canal con RN-1734 o la inhibición con shRNAs específicos contra TRPV4 evitan el aumento normal de los valores de TER durante el desarrollo del epitelio de RCE1(5T5) (figura 36A y C) sugiriendo que es necesario para la diferenciación terminal del epitelio corneal.

Adicionalmente en células diferenciadas la activación de TRPV4 aumenta los valores de TER de las uniones estrechas ya establecidas (figura 36B), Regulando

así la función de barrera del epitelio corneal, este efecto modulador de la función de barrera por TRPV4 ha sido reportado en otros modelos celulares, por ejemplo, en queratinocitos epidermales en donde la activación de TRPV4 aumenta la hermeticidad de las TJ, (Akasaka *et al.*, 2012, Sokabe *et al.*, 2010 y Kida *et al.*, 2012). Sin embargo, el efecto de la activación canal TRPV4 sobre las TJ parece ser tejido específico ya que se ha observado el efecto opuesto en los epitelios mamario e intestinal donde la activación del canal incrementa la permeabilidad transepitelial (Chen *et al.*, 1997; Reiter *et al.*, 2006).

Nuestros resultados agregan dos observaciones importantes a los trabajos previamente reportados en la literatura (1) TRPV4 es necesario para el correcto establecimiento de la unión estrecha y (2) para que el canal TRPV4 module las uniones estrechas ya establecidas parece ser necesario que el canal se encuentre expresado en la membrana apical de la capa de células más externa, localización que puede ser considerada como un rasgo tardío de diferenciación en el epitelio corneal.

Por otro lado, también se ha descrito la presencia del canal TRPV1 en células de epitelio corneal de humano (Megler *et al.*, 2011), así como su participación en la modulación de la función de barrera en células de glándulas submandibulares, donde la activación de TRPV1 aumenta la permeabilidad de las uniones estrechas de este tejido en conjunto con un aumento de expresión de ocludina (Cong *et al.*, 2012, 2013). Nosotros encontramos que las células RCE1(5T5) expresan al canal TRPV1 tanto a nivel mensajero como proteína figuras 22 y 23, pero la exposición a capsaicina 10 μ M, (activador específico de TRPV1) no modifica los valores de

resistencia eléctrica transepitelial del epitelio corneal, sugiriéndonos así que el canal TRPV1 no participa en la modulación de las uniones estrechas del epitelio corneal y que el efecto observado es específico del canal TRPV4.

Se ha descrito que TRPV4 participa en la regulación de la función de barrera de las uniones estrechas en queratinocitos (Akazawa *et al.*, 2011), donde la activación del canal TRPV4 aumenta la función de barrera de este epitelio, junto con un aumento de claudina-4 y ocludina, componentes estructurales de la unión estrecha. Nuestras observaciones muestran que en las células RCE1(5T5) el aumento de TER producido por la activación del canal TRPV4 correlaciona con un evidente aumento de la expresión de claudina-4 en las uniones estrechas, figura 37, sin embargo, este cambio no va acompañado por un aumento en la cantidad de esta proteína. Por lo tanto, el aumento de TER observado durante la activación de TRPV4 podría estar siendo mediado por un incremento en la incorporación de claudina-4 a las uniones estrechas, ya que el aumento de Claudina-4 en las TJ es suficiente para inducir un aumento en la TER (Ikari *et al.*, 2009)

Un punto importante a considerar es que la cuantificación de proteínas que constituyen la unión estrecha se realizó en extractos totales de proteínas de todo el epitelio, si consideramos que la unión estrecha se localiza solo en la membrana apical de las células del estrato superior del epitelio, podría ser que hayamos subestimado los cambios de composición en las uniones estrechas ya que se usaron proteínas de todo en epitelio.

Se sabe que en epitelios simples como en las células MDCK la presencia de EGF induce un aumento transitorio de los valores de TER así como el aumento de la expresión de claudina-4 y la degradación de claudina-2 (Flores-Benitez et al., 2007; Garcia-Hernandez et al., 2015), por otro lado Ortiz-Melo , *et al.* (2012) reportaron que el EGF aumenta los valores de TER en células RCE1(5T5) Nuestros resultados muestran que RN-1734, el bloqueador de TRPV4 evita el aumento de la TER inducido por EGF sugiriendo así que la actividad del canal TRPV4 es necesaria para la modulación de la TER inducida por EGF en el epitelio corneal.

Adicionalmente se reportó que la activación de los canales TRPV1 y TRPV3, modulan la fosforilación del receptor a EGF (EGFR) induciendo diferentes respuestas (Cheng et al., 2010; Yang et al., 2010). Por otra parte, nuestros resultados muestran que existe una relación funcional del canal TRPV4 y el EGFR. Con esto en mente nosotros proponemos que la actividad de TRPV4 y la activación del EGFR, podrían estar formando un sistema de regulación de las uniones estrechas en el epitelio corneal.

Esta interacción podría estar mediada por diferentes mecanismos como la activación de vías de señalización comunes, las vías de PKC y Src, ya que se ha reportado que ambas proteínas pueden ser activadas en presencia de EGF (Biscardi et al., 1999; Jones and Rappoport, 2014). Y también se sabe que PKC es capaz de regular la actividad del canal TRPV4 (Xu et al., 2003a) y se encuentra relacionada con la modulación del ensamblaje de las uniones estrechas en diferentes epitelios (Akazawa et al., 2013; Balda et al., 1991; D'Souza et al., 2007;

Kojima and Sawada, 2012). Por otro lado también se ha descrito que Src regula la actividad del canal TRPV4 (Alessandri-Haber et al., 2008; Xu et al., 2003b) y participa en la regulación de las uniones estrechas del epitelio corneal (Wang et al., 2004).

Otra de las vías de señalización implicadas en la modulación de las uniones estrechas por EGF es la vía de señalización de PLC (Balda et al., 1993; Margolis et al., 1989), la cual también se ha reportado que modula de la actividad eléctrica del canal TRPV4 (Watanabe et al., 2003b), por lo que también podría ser uno de los mecanismos involucrados en la relación funcional del canal TRPV4 y el EGFR.

Previamente se ha descrito que los canales TRPV1 y TRPV3 transactivan al EGFR generando diferentes respuestas celulares (Cheng et al., 2010; Yang et al., 2010), por lo que otra posibilidad que se podría sugerir es la transactivación entre TRPV4 y EGFR.

Se ha reportado que el canal TRPV4 puede formar heterómeros con el canal TRPP2, canal activado por EGF (Kottgen et al., 2008; Ma et al., 2005) y nosotros observamos por inmunofluorescencia que las señales de ambos canales colocaliza en la parte apical del epitelio corneal, sugiriendo que al menos una parte del canal TRPV4 se encuentra formando heterotetrámeros con el canal TRPP2 en este epitelio, aunque harían falta más experimentos para demostrarlo.

La modulación de la función de barrera del canal TRPV4 podría ser de suma importancia en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio corneal ya que este epitelio está en contacto directo con las agresiones del medio ambiente de

manera cotidiana, como por ejemplo al nadar o en ambiente secos donde la presencia de un estímulo hipoosmótico o bien el aumento de fricción, podrían activar al canal TRPV4 volviéndolo un perfecto transductor de señales que protejan y preparen al organismo para los cambios del medio ambiente.

Adicionalmente la modulación las uniones estrechas por el canal TRPV4 también puede ser altamente relevante en diversas condiciones patológicas como los ojos secos, en donde se sabe que el funcionamiento correcto de las uniones es un factor determinante para un buen pronóstico del paciente, en esta patología se disminuye la producción de lágrimas, incrementando la fricción en la superficie ocular, lo cual podría activar al canal TRPV4 e incrementar de esta manera la función de barrera del epitelio (Pflugfelder et al., 2000).

Otro posible proceso patológico en el que podría ser relevante la modulación de la función del barrera del epitelio corneal por el canal TRPV4 es la inflamación en donde el incremento de citocinas como TNF α podrían sensibilizar al canal TRPV4 (El Karim et al., 2015; Yi et al., 2000) y de esta manera modular a las uniones estrechas del epitelio.

En resumen, nuestros resultados demuestran que TRPV4 se expresa funcionalmente en las células RCE1(5T5), que es necesario para el correcto establecimiento de las uniones estrechas del epitelio corneal. Adicionalmente, en células diferenciadas se localiza en la membrana apical de células de la capa más externa del epitelio y una vez ahí es capaz de modular la permeabilidad de las uniones estrechas ya establecidas, aumentando los valores de TER y participando

en la regulación de las uniones estrechas mediada por EGF. Por todo esto, concluimos que el canal TRPV4 es necesario para la diferenciación terminal del epitelio corneal.

ANEXO

Construcción de plásmidos de expresión de shRNA de los canales TRPV1 y TRPV6 de conejo.

Para evaluar de manera específica si una proteína se encuentra implicada en un proceso celular se pueden utilizar estrategias de biología molecular como la sobreexpresión de un gen o bien la eliminación de la expresión del mismo, por lo que con el fin de en un futuro evaluar específicamente las probables funciones de los canales TRPV1 y TRPV6 en la biología de las células de epitelio corneal RCE1(5T5), se construyeron plásmidos que expresan los shRNA para TRPV1 (shRNA-TRPV1) o para TRPV6 (shRNA-TRPV6).

Basados en la secuencia Acc. No. NM_001082166 para TRPV1 de conejo se diseñó el shRNA-TRPV1 dirigido contra la secuencia 5'-GGAGAACTGGAAGAACT-3'. En el caso de TRPV6 se usó la secuencia de TRPV6 de conejo Acc. No. NM_001082776 para diseñar el shRNA-TRPV6 dirigido contra la secuencia 5'-CCAAGCTGCTCAAGTATGA-3'.

Los RNAs de interferencia para los canales TRP fueron clonados en el vector pLVX-shRNA2 (Clontech), debido a que tiene la ventaja de que sobreexpresa de manera simultánea al RNA de interferencia y a la proteína verde fluorescente ZsGreen lo que permite identificar las células que expresan el RNA de interferencia de interés. Los plásmidos fueron construidos por Guillermo Aquino-Jarquín, y posteriormente fueron verificados mediante restricción y secuenciación.

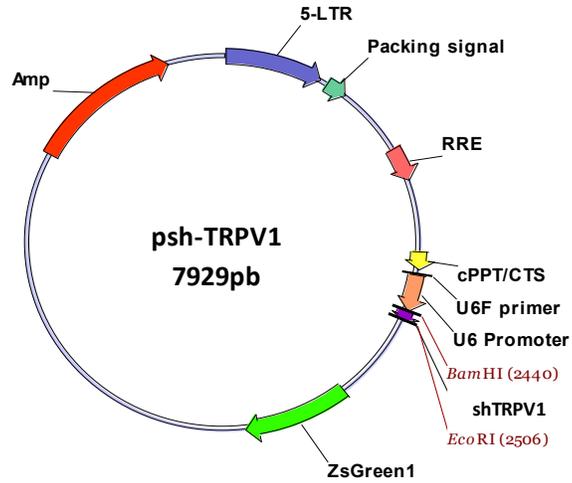


Fig.A1 Representación esquemática del plásmido pshTRPV1. El plásmido contiene la secuencia del shRNA del canal TRPV1 así como la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente ZsGreen

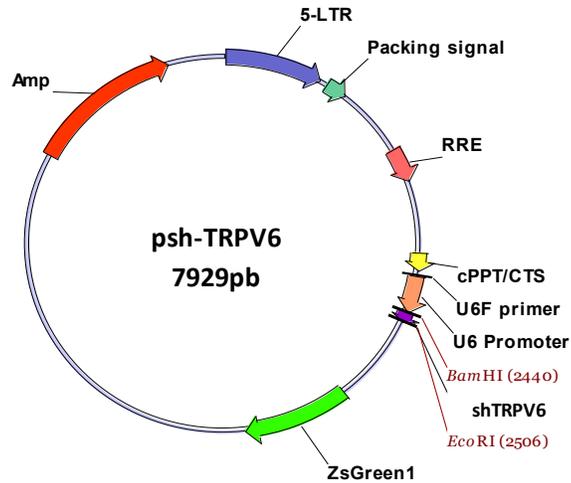


Fig.A2 Representación esquemática del plásmido pshTRPV6. El plásmido contiene la secuencia del shRNA del canal TRPV6 así como la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente ZsGreen

Clonación del DNAc completo del canal TRPV4 de conejo.

Como parte de las estrategias experimentales para evaluar de manera específica las probables funciones del canal TRPV4 en la diferenciación de las células RCE1(5T5), se decidió clonar la secuencia completa del DNAc canal TRPV4 de conejo en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen).

La amplificación de la secuencia completa del DNAc del canal TRPV4 se realizó a partir de RNA total aislado de células RCE1(5T5) proliferativas. Y mediante una estrategia de PCR anidada. La primer PCR se realizó utilizando los oligos TRPV4-5pF1(5'- GGC TGA AGA GTG CAG ACG GCT CTG -3') y TRPV4-R2 (5'-TGC AGG CGG ACT AGA ACA GGC AGG -3'), a partir de esta PCR se realizó una segunda PCR con los oligos R2KZRbv4F (5'- TTG GTA CCG CCA CCA TGG CGG ATC CCA GCG ACA GC-3') y RbV4XbaR (5'-GCT CTA GAT CAG TCC GCC ACT TGC GGG -3') los cuales le agregan a la secuencia los sitios de restricción Kpn I y Xba I.

El fragmento obtenido de la PCR anidada fue purificado por columna, cortado con las enzimas Kpn I y Xba I y clonado en el vector pcDNA3.1 mediante una ligación sitio dirigida. Posteriormente se verificó la secuencia del canal TRPV4 y se depositó en el genbank con el No. de Acc. -KX523177. Finalmente, se verificó la expresión del canal TRPV4 a partir del plásmido construido y denominado pTRPV4Rab mediante transfección en células AD293, observando que la sobreexpresión del canal TRPV4 tiene un efecto tóxico sobre las células.

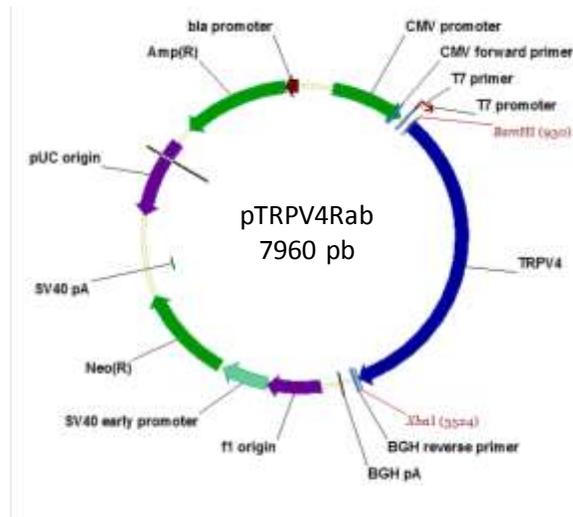


Fig.A3 Representación esquemática del vector pTRPV4Rab, El plásmido construido contiene la secuencia codificante completa del canal TRPV4 de conejo clonada en los sitios de restricción Kpn I y Xba I del vector pcDNA3.1.

Clonación del canal Kv1.1

De manera adicional también se realizó la clonación del DNAC del canal Kv1.1 de conejo, canal que sabemos que se expresa de manera endógena en la células RCE1(5T5) y que no se encuentra involucrado en la proliferación y diferenciación de esta línea celular.

La secuencia completa del DNAC del canal Kv1.1 de conejo se clonó por RT-PCR a partir de RNA total de células RCE1 de 3 días de cultivo con los oligos Kv1.1CF (5'-AAA AGG ATC CGG AGG AGG AGG AGG AAT GAC GGT GGT GTC AGG GGA G-3') y Kv1.1CR (5'-TTT TTC TAG ACT AAA CAT CGG TCA GGA GCT TG-3') en los sitios BamH1 y Xba1 del vector pEYFP-C1 (Clontech), el cual contiene la secuencia codificante para la proteína amarilla fluorescente EYFP,

para producir una proteína de fusión que contiene a la proteína amarilla fluorescente en el extremo amino del canal Kv1, la secuencia del plásmido construido fue verificada por restricción y secuenciación, esta proteína de fusión nos permitió seguir *in vivo* la expresión del canal Kv1.1.

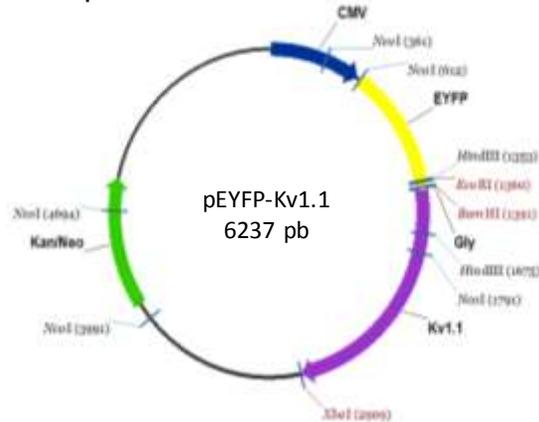


Fig.A4 Representación esquemática del vector pEYFP-Kv1.1, EL plásmido construido contiene la secuencia codificante para el canal Kv1.1 de conejo en los sitios de restricción BamH I y Xba I del vector pEYFP-C1, manteniendo el marco abierto de lectura de la proteína amarilla fluorescente y adicionando una bisagra de 6 glicinas entre ambas proteínas.

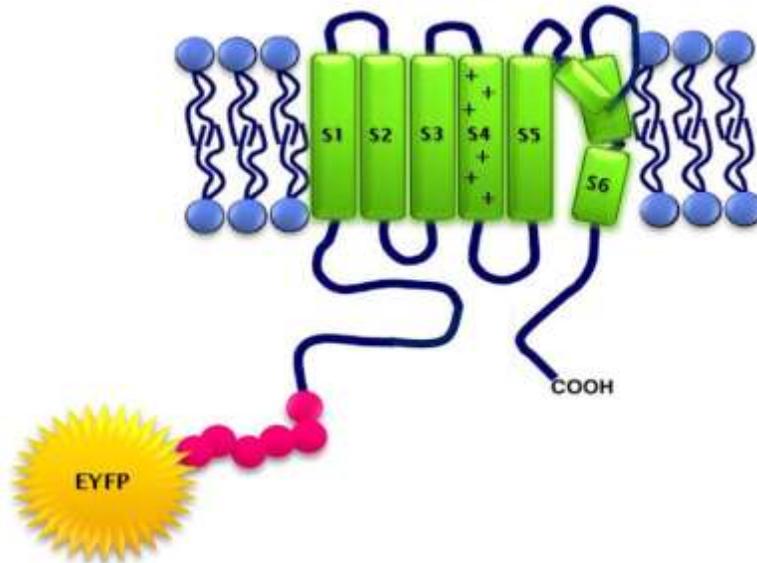


Fig.A5 Representación esquemática de la proteína de fusión EYFP-Kv1.1, Estructuralmente el canal Kv1.1 se encuentra formado por 6 dominios transmembranales, con los dominios NH₃ y COOH localizados en el citoplasma, en la imagen se puede observar la fusión del canal Kv1.1 con la proteína amarilla fluorescente en el extremo amino del canal, así como la bisagra de 6 glicinas (esferas rosas) localizada entre ambas proteínas.

Expresión del canal EYFP-Kv1.1

Una vez obtenido el plasmido EYFP-Kv1.1, se evaluó la expresión del canal Kv1.1 en células 293T y RCE1(5T5), para lo cual células 293T y células RCE1(5T5) fueron transfectadas con lipofectamina 2000, utilizando como control de transfección el vector pEYFP-C1 vacío. En ambas líneas celulares 48 h después de la transfección la expresión de la proteína fluorescente unida al canal Kv1.1 se observa en forma de clusters lo que nos sugiere que se encuentra localizada en microdominios de la membrana plasmática (figura A6 A y C), localización característica de los canales Kv, por otro lado la proteína amarilla fluorescente es expresada de manera homogénea en toda la célula (figura A6 B y D).

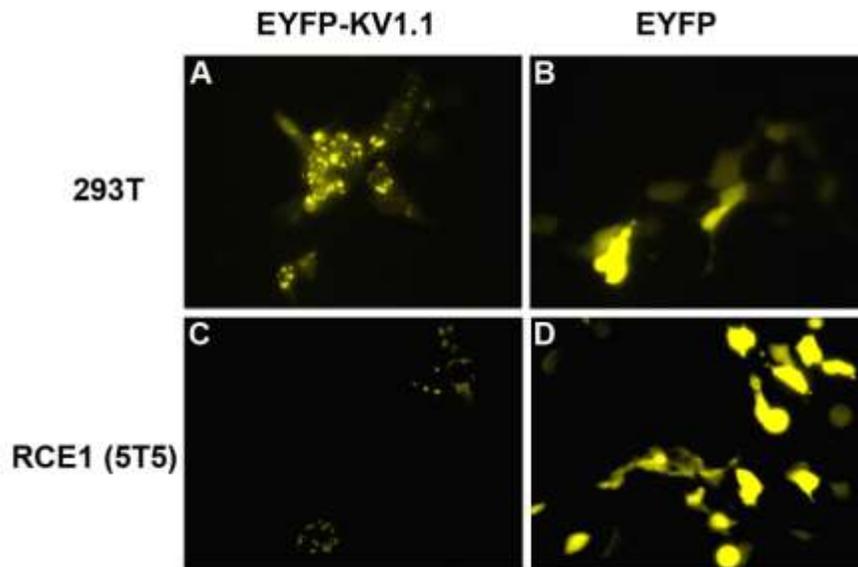


Fig.A6 Sobreexpresión del canal Kv1.1. Células 293T y RCE1(5T5) 48 h después de la transfección con la proteína de fusión EYFP-Kv1.1 (A y C) y con el vector pEYFP-C1 (C y D), donde se puede observar que tanto en las células 293T (A) como en las RCE1(5T5) (C) el canal Kv1.1 forma de clusters.

Expresión funcional del canal EYFP-Kv1.1

Posteriormente se evaluó la expresión funcional del canal Kv1.1 fusionado a la proteína amarilla fluorescente, para lo cual el plásmido EYFP-Kv1.1 fue transfectado en células AD293, 48 h pos-transfección, se evaluó la función del canal Kv1.1 mediante la realización de registros electrofisiológicos.

Los registros de corriente se realizaron mediante una rampa de voltaje en configuración cell attached (figura A7) y whole cell (figura.A8), observando que los cambios en el voltaje inducen la entrada de potasio a las células, demostrando que la proteína de fusión EYFP-Kv1.1 forma canales funcionales, Los registros fueron realizados por el Dr. León Islas en laboratorio de Biofísica Molecular de la Facultad de Medicina en la UNAM.

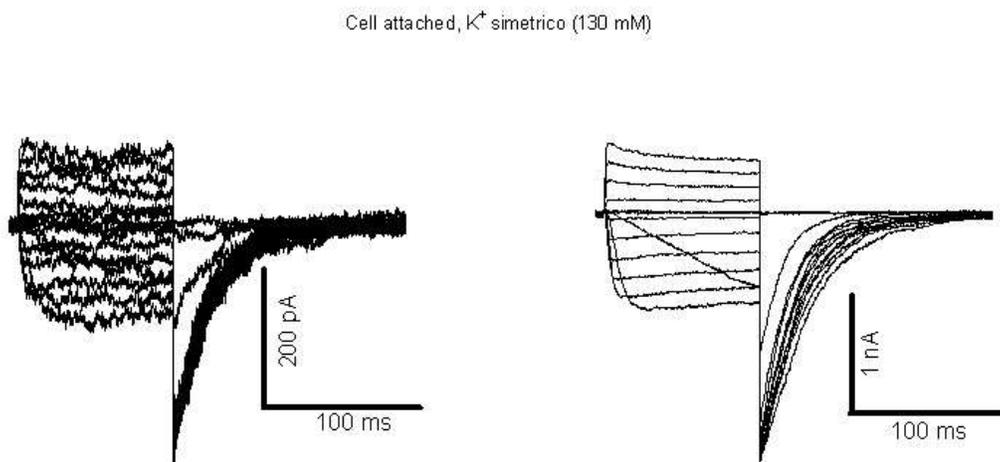


Fig.A7 Expresión funcional del canal Kv1.1 de conejo. Registros de corriente durante un protocolo de cambio de voltaje en configuración cell attached de Células AD293 48 h después de la transfección con la proteína de fusión EYFP-Kv1.1.

Whole cell, $[K^+]_i$ 130 mM; $[K^+]_o$ 1 mM

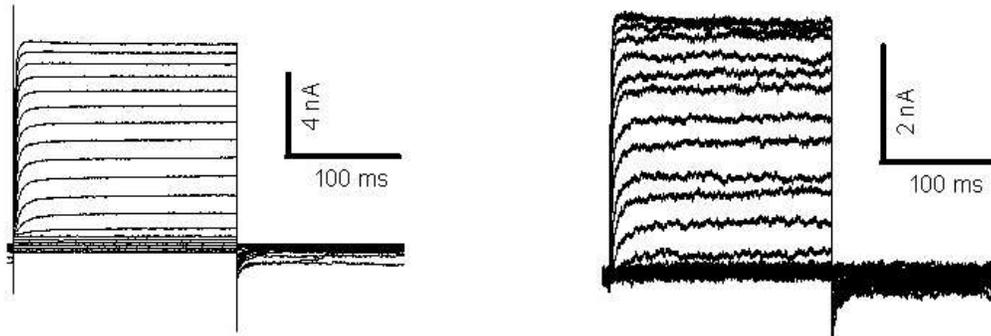


Fig.A8 Expresión funcional del canal Kv1.1, Registros de corriente durante un protocolo de cambio de voltaje en configuración de célula completa de células AD293 48 h después de la transfección con la proteína de fusión EYFP-Kv1.1.

BIBLIOGRAFIA

- Adapala RK, Thoppil RJ, Luther DJ, Paruchuri S, Meszaros JG, Chilian WM, Thodeti CK. 2013. TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *Journal of molecular and cellular cardiology* 54:45-52.
- Aijaz S, Balda MS, Matter K. 2006. Tight junctions: molecular architecture and function. *International review of cytology* 248:261-298.
- Akazawa Y, Yuki T, Yoshida H, Sugiyama Y, Inoue S. 2013. Activation of TRPV4 strengthens the tight-junction barrier in human epidermal keratinocytes. *Skin pharmacology and physiology* 26(1):15-21.
- Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling DB, Levine JD. 2008. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(5):1046-1057.
- Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parada CA, Chen X, Reichling DB, Levine JD. 2003. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* 39(3):497-511.
- Alvarez DF, King JA, Weber D, Addison E, Liedtke W, Townsley MI. 2006. Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. *Circulation research* 99(9):988-995.
- Anderson JM, Van Itallie CM. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1(2):a002584.
- Arniges M, Fernandez-Fernandez JM, Albrecht N, Schaefer M, Valverde MA. 2006. Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *The Journal of biological chemistry* 281(3):1580-1586.
- Auer-Grumbach M, Olschewski A, Papic L, Kremer H, McEntagart ME, Uhrig S, Fischer C, Frohlich E, Balint Z, Tang B, Strohmaier H, Lochmuller H, Schlotter-Weigel B, Senderek J, Krebs A, Dick KJ, Petty R, Longman C, Anderson NE, Padberg GW, Schelhaas HJ, van Ravenswaaij-Arts CM, Pieber TR, Crosby AH, Guelly C. 2010. Alterations in the ankyrin domain of TRPV4 cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nature genetics* 42(2):160-164.
- Balda MS, Gonzalez-Mariscal L, Contreras RG, Macias-Silva M, Torres-Marquez ME, Garcia-Sainz JA, Cereijido M. 1991. Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *The Journal of membrane biology* 122(3):193-202.
- Balda MS, Gonzalez-Mariscal L, Matter K, Cereijido M, Anderson JM. 1993. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *The Journal of cell biology* 123(2):293-302.
- Balda MS, Matter K. 2009. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochimica et biophysica acta* 1788(4):761-767.
- Banan A, Zhang LJ, Shaikh M, Fields JZ, Choudhary S, Forsyth CB, Farhadi A, Keshavarzian A. 2005. theta Isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isoforms: a novel mechanism for regulation of permeability. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 313(3):962-982.
- Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH, Parsons SJ. 1999. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *The Journal of biological chemistry* 274(12):8335-8343.

- Castro-Munozledo F. 1994. Development of a spontaneous permanent cell line of rabbit corneal epithelial cells that undergoes sequential stages of differentiation in cell culture. *Journal of cell science* 107 (Pt 8):2343-2351.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653):816-824.
- Catterall WA. 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67(6):915-928.
- Cereijido M, Contreras RG, Gonzalez-Mariscal L. 1989. Development and alteration of polarity. *Annual review of physiology* 51:785-795.
- Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD. 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *The Journal of cell biology* 77(3):853-880.
- Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 279(3):G477-482.
- Cioffi DL, Lowe K, Alvarez DF, Barry C, Stevens T. 2009. TRPping on the lung endothelium: calcium channels that regulate barrier function. *Antioxidants & redox signaling* 11(4):765-776.
- Clapham DE. 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426(6966):517-524.
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *American journal of physiology Cell physiology* 283(1):C142-147.
- Cong X, Zhang Y, Shi L, Yang NY, Ding C, Li J, Ding QW, Su YC, Xiang RL, Wu LL, Yu GY. 2012. Activation of transient receptor potential vanilloid subtype 1 increases expression and permeability of tight junction in normal and hyposecretory submandibular gland. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92(5):753-768.
- Cong X, Zhang Y, Yang NY, Li J, Ding C, Ding QW, Su YC, Mei M, Guo XH, Wu LL, Yu GY. 2013. Occludin is required for TRPV1-modulated paracellular permeability in the submandibular gland. *Journal of cell science* 126(Pt 5):1109-1121.
- Cuajungco MP, Grimm C, Oshima K, D'Hoedt D, Nilius B, Mensenkamp AR, Bindels RJ, Plomann M, Heller S. 2006. PACSINs bind to the TRPV4 cation channel. PACSIN 3 modulates the subcellular localization of TRPV4. *The Journal of biological chemistry* 281(27):18753-18762.
- Chen TT, Wu RL, Castro-Munozledo F, Sun TT. 1997. Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Molecular and cellular biology* 17(6):3056-3064.
- Cheng X, Jin J, Hu L, Shen D, Dong XP, Samie MA, Knoff J, Eisinger B, Liu ML, Huang SM, Caterina MJ, Dempsey P, Michael LE, Dlugosz AA, Andrews NC, Clapham DE, Xu H. 2010. TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell* 141(2):331-343.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162(1):156-159.
- Chun J, Shin SH, Kang SS. 2012. The negative feedback regulation of TRPV4 Ca²⁺ ion channel function by its C-terminal cytoplasmic domain. *Cellular signalling* 24(10):1918-1922.
- D'Hoedt D, Owsianik G, Prenen J, Cuajungco MP, Grimm C, Heller S, Voets T, Nilius B. 2008. Stimulus-specific modulation of the cation channel TRPV4 by PACSIN 3. *The Journal of biological chemistry* 283(10):6272-6280.

- D'Souza T, Indig FE, Morin PJ. 2007. Phosphorylation of claudin-4 by PKCepsilon regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *Experimental cell research* 313(15):3364-3375.
- Denker SP, Barber DL. 2002. Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* 14(2):214-220.
- Du J, Ma X, Shen B, Huang Y, Birnbaumer L, Yao X. 2014. TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28(11):4677-4685.
- El Karim I, McCrudden M, Linden GJ, Abdullah H, Curtis TM, McGahon M, About I, Irwin C, Lundy FT. 2015. TNF-alpha-Induced p38MAPK Activation Regulates TRPA1 and TRPV4 Activity in Odontoblast-like Cells. *The American journal of pathology*.
- Everaerts W, Nilius B, Owsianik G. 2010a. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Progress in biophysics and molecular biology* 103(1):2-17.
- Everaerts W, Zhen X, Ghosh D, Vriens J, Gevaert T, Gilbert JP, Hayward NJ, McNamara CR, Xue F, Moran MM, Strassmaier T, Uykai E, Owsianik G, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Fanger CM, Voets T. 2010b. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(44):19084-19089.
- Fan HC, Zhang X, McNaughton PA. 2009. Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 284(41):27884-27891.
- Farquhar MG, Palade GE. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology* 17:375-412.
- Findley MK, Koval M. 2009. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB life* 61(4):431-437.
- Flores-Benitez D, Ruiz-Cabrera A, Flores-Maldonado C, Shoshani L, Cerejido M, Contreras RG. 2007. Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *American journal of physiology Renal physiology* 292(2):F828-836.
- Furuse M. 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(1):a002907.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of cell biology* 156(6):1099-1111.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology* 123(6 Pt 2):1777-1788.
- Gao X, Wu L, O'Neil RG. 2003. Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *The Journal of biological chemistry* 278(29):27129-27137.
- Garcia-Elias A, Mrkonjic S, Pardo-Pastor C, Inada H, Hellmich UA, Rubio-Moscardo F, Plata C, Gaudet R, Vicente R, Valverde MA. 2013. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(23):9553-9558.
- Garcia-Hernandez V, Flores-Maldonado C, Rincon-Heredia R, Verdejo-Torres O, Bonilla-Delgado J, Meneses-Morales I, Gariglio P, Contreras RG. 2015. EGF regulates claudin-2 and -4 expression through Src and STAT3 in MDCK cells. *Journal of cellular physiology* 230(1):105-115.

- Garcia-Villegas R, Escamilla J, Fiorentino R, Cerejido M. 2007. Potassium channels lost during harvesting of epithelial cells are restored with a kinetics that depends on channel species. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 20(5):405-416.
- Garcia-Villegas R, Escamilla J, Sanchez-Guzman E, Pasten A, Hernandez-Quintero M, Gomez-Flores E, Castro-Munozledo F. 2009. Pax-6 is expressed early in the differentiation of a corneal epithelial model system. *Journal of cellular physiology* 220(2):348-356.
- Gaudet R. 2008. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Molecular bioSystems* 4(5):372-379.
- Gonzalez. 2009. Identificación del RNAm de canales de K⁺ y Ca²⁺ expresados en células RCE1 de epitelio corneal. Tesis de licenciatura.
- Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E. 2007. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 42(1):1-57.
- Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T. 2010. Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PloS one* 5(7):e11654.
- Hernandez-Quintero M, Garcia-Villegas R, Castro-Munozledo F. 2002. Differentiation-dependent increases in lactate dehydrogenase activity and isoenzyme expression in rabbit corneal epithelial cells. *Experimental eye research* 74(1):71-82.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. 2002. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(11):7461-7466.
- Hu YJ, Wang YD, Tan FQ, Yang WX. 2013. Regulation of paracellular permeability: factors and mechanisms. *Molecular biology reports* 40(11):6123-6142.
- Ikari A, Atomi K, Takiguchi A, Yamazaki Y, Miwa M, Sugatani J. 2009. Epidermal growth factor increases claudin-4 expression mediated by Sp1 elevation in MDCK cells. *Biochemical and biophysical research communications* 384(3):306-310.
- Jin M, Wu Z, Chen L, Jaimes J, Collins D, Walters ET, O'Neil RG. 2011. Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PloS one* 6(2):e16713.
- Jones S, Rappoport JZ. 2014. Interdependent epidermal growth factor receptor signalling and trafficking. *The international journal of biochemistry & cell biology* 51:23-28.
- Kida N, Sokabe T, Kashio M, Haruna K, Mizuno Y, Suga Y, Nishikawa K, Kanamaru A, Hongo M, Oba A, Tominaga M. 2012. Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 463(5):715-725.
- Kirschner N, Rosenthal R, Gunzel D, Moll I, Brandner JM. 2012. Tight junctions and differentiation-- a chicken or the egg question? *Experimental dermatology* 21(3):171-175.
- Kojima T, Sawada N. 2012. Regulation of tight junctions in human normal pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1257:85-92.
- Kottgen M, Buchholz B, Garcia-Gonzalez MA, Kotsis F, Fu X, Doerken M, Boehlke C, Steffl D, Tauber R, Wegierski T, Nitschke R, Suzuki M, Kramer-Zucker A, Germino GG, Watnick T, Prenen J, Nilius B, Kuehn EW, Walz G. 2008. TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *The Journal of cell biology* 182(3):437-447.
- Lal-Nag M, Morin PJ. 2009. The claudins. *Genome biology* 10(8):235.
- Lee H, Iida T, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ. 2005. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(5):1304-1310.

- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103(3):525-535.
- Liedtke W, Friedman JM. 2003. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(23):13698-13703.
- Liedtke W, Tobin DM, Bargmann CI, Friedman JM. 2003. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 Suppl 2:14531-14536.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25(4):402-408.
- Ma R, Li WP, Rundle D, Kong J, Akbarali HI, Tsiokas L. 2005. PKD2 functions as an epidermal growth factor-activated plasma membrane channel. *Molecular and cellular biology* 25(18):8285-8298.
- Ma X, Nilius B, Wong JW, Huang Y, Yao X. 2011. Electrophysiological properties of heteromeric TRPV4-C1 channels. *Biochimica et biophysica acta* 1808(12):2789-2797.
- Ma X, Qiu S, Luo J, Ma Y, Ngai CY, Shen B, Wong CO, Huang Y, Yao X. 2010. Functional role of vanilloid transient receptor potential 4-canonical transient receptor potential 1 complex in flow-induced Ca²⁺ influx. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30(4):851-858.
- Mamenko M, Zaika OL, Boukelmoune N, Berrout J, O'Neil RG, Pochynyuk O. 2013. Discrete control of TRPV4 channel function in the distal nephron by protein kinases A and C. *The Journal of biological chemistry* 288(28):20306-20314.
- Margolis B, Rhee SG, Felder S, Mervic M, Lyall R, Levitzki A, Ullrich A, Zilberstein A, Schlessinger J. 1989. EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signaling. *Cell* 57(7):1101-1107.
- Martin E, Dahan D, Cardouat G, Gillibert-Duplantier J, Marthan R, Savineau JP, Ducret T. 2012. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 464(3):261-272.
- Martínez-Rendón J. 2009. Canales de potasio Kv1 y proliferación de la línea celular de epitelio corneal RCE1. Tesis de maestría.
- 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, Carmeliet G. 2008. TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell metabolism* 8(3):257-265.
- Mergler S, Garreis F, Sahlmuller M, Reinach PS, Paulsen F, Pleyer U. 2011. Thermosensitive transient receptor potential channels in human corneal epithelial cells. *Journal of cellular physiology* 226(7):1828-1842.
- Modregger J, Ritter B, Witter B, Paulsson M, Plomann M. 2000. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *Journal of cell science* 113 Pt 24:4511-4521.
- Moore C, Cevikbas F, Pasolli HA, Chen Y, Kong W, Kempkes C, Parekh P, Lee SH, Kontchou NA, Yeh I, Jockerst NM, Fuchs E, Steinhoff M, Liedtke WB. 2013. UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(34):E3225-3234.
- Nilius B, Flockerzi V. 2014. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface. *Handbook of experimental pharmacology* 223:v - vi.

- Nilius B, Prenen J, Wissenbach U, Bodding M, Droogmans G. 2001. Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 443(2):227-233.
- Nilius B, Voets T. 2013. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO reports* 14(2):152-163.
- Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T. 2004. TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *American journal of physiology Cell physiology* 286(2):C195-205.
- Ortiz-Melo MT, Sanchez-Guzman E, Gonzalez-Robles A, Valdes J, Gomez-Flores E, Castro-Munozledo F. 2013. Expression of claudins -2 and -4 and cingulin is coordinated with the start of stratification and differentiation in corneal epithelial cells: retinoic acid reversibly disrupts epithelial barrier. *Biology open* 2(2):132-143.
- Pan Z, Yang H, Mergler S, Liu H, Tachado SD, Zhang F, Kao WW, Koziel H, Pleyer U, Reinach PS. 2008. Dependence of regulatory volume decrease on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression in human corneal epithelial cells. *Cell calcium* 44(4):374-385.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108(5):705-715.
- Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. 2000. The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five-year review. *Cornea* 19(5):644-649.
- Reiter B, Kraft R, Gunzel D, Zeissig S, Schulzke JD, Fromm M, Harteneck C. 2006. TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(11):1802-1812.
- Rheinwald JG. 1980. Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods in cell biology* 21A:229-254.
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *Journal of cell science* 123(Pt 11):1913-1921.
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *The Journal of cell biology* 141(2):397-408.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular biology of the cell* 11(12):4131-4142.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *The Journal of cell biology* 137(6):1393-1401.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9(7):671-675.
- Shahidullah M, Mandal A, Delamere NA. 2012. TRPV4 in porcine lens epithelium regulates hemichannel-mediated ATP release and Na-K-ATPase activity. *American journal of physiology Cell physiology* 302(12):C1751-1761.
- Shin SH, Lee EJ, Hyun S, Chun J, Kim Y, Kang SS. 2012. Phosphorylation on the Ser 824 residue of TRPV4 prefers to bind with F-actin than with microtubules to expand the cell surface area. *Cellular signalling* 24(3):641-651.
- Sjo A, Magnusson KE, Peterson KH. 2010. Protein kinase C activation has distinct effects on the localization, phosphorylation and detergent solubility of the claudin protein family in tight and leaky epithelial cells. *The Journal of membrane biology* 236(2):181-189.

- Smith PL, Maloney KN, Pothen RG, Clardy J, Clapham DE. 2006. Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* activates TRPV4 channels. *The Journal of biological chemistry* 281(40):29897-29904.
- Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tominaga M. 2010. The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 285(24):18749-18758.
- Sokabe T, Tominaga M. 2010. The TRPV4 cation channel: A molecule linking skin temperature and barrier function. *Communicative & integrative biology* 3(6):619-621.
- Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. 2000. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature cell biology* 2(10):695-702.
- Strotmann R, Schultz G, Plant TD. 2003. Ca²⁺-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site. *The Journal of biological chemistry* 278(29):26541-26549.
- Sumioka T, Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Miyajima M, Yamanaka O, Saika S. 2014. Impairment of corneal epithelial wound healing in a TRPV1-deficient mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 55(5):3295-3302.
- Suzuki M, Hirao A, Mizuno A. 2003. Microtubule-associated [corrected] protein 7 increases the membrane expression of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4). *The Journal of biological chemistry* 278(51):51448-51453.
- Tamariz E, Hernandez-Quintero M, Sanchez-Guzman E, Arguello C, Castro-Munozledo F. 2007. RCE1 corneal epithelial cell line: its variability on phenotype expression and differential response to growth factors. *Archives of medical research* 38(2):176-184.
- Thorneloe KS, Sulpizio AC, Lin Z, Figueroa DJ, Clouse AK, McCafferty GP, Chendrimada TP, Lashinger ES, Gordon E, Evans L, Misajet BA, Demarini DJ, Nation JH, Casillas LN, Marquis RW, Votta BJ, Sheardown SA, Xu X, Brooks DP, Laping NJ, Westfall TD. 2008. N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[[(2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxypropanoyl]-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326(2):432-442.
- Todaka H, Taniguchi J, Satoh J, Mizuno A, Suzuki M. 2004. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *The Journal of biological chemistry* 279(34):35133-35138.
- Tsukita S, Furuse M. 1998. Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 3(9):569-573.
- Tsukita S, Furuse M. 2002. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Current opinion in cell biology* 14(5):531-536.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2(4):285-293.
- Venkatachalam K, Montell C. 2007. TRP channels. *Annual review of biochemistry* 76:387-417.
- Vincent F, Acevedo A, Nguyen MT, Dourado M, DeFalco J, Gustafson A, Spiro P, Emerling DE, Kelly MG, Duncton MA. 2009. Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochemical and biophysical research communications* 389(3):490-494.
- Vincent F, Duncton MA. 2011. TRPV4 agonists and antagonists. *Current topics in medicinal chemistry* 11(17):2216-2226.

- Voets T, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Boddling M, Droogmans G, Nilius B. 2002. Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *The Journal of biological chemistry* 277(37):33704-33710.
- Wang Y, Fu X, Gaiser S, Kottgen M, Kramer-Zucker A, Walz G, Wegierski T. 2007. OS-9 regulates the transit and polyubiquitination of TRPV4 in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 282(50):36561-36570.
- Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS. 2004. Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Experimental eye research* 78(1):125-136.
- Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B. 2002a. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *The Journal of biological chemistry* 277(16):13569-13577.
- Watanabe H, Vriens J, Janssens A, Wondergem R, Droogmans G, Nilius B. 2003a. Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca²⁺. *Cell calcium* 33(5-6):489-495.
- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. 2003b. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424(6947):434-438.
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B. 2002b. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277(49):47044-47051.
- Wegierski T, Lewandrowski U, Muller B, Sickmann A, Walz G. 2009. Tyrosine phosphorylation modulates the activity of TRPV4 in response to defined stimuli. *The Journal of biological chemistry* 284(5):2923-2933.
- Wu S, Jian MY, Xu YC, Zhou C, Al-Mehdi AB, Liedtke W, Shin HS, Townsley MI. 2009. Ca²⁺ entry via alpha1G and TRPV4 channels differentially regulates surface expression of P-selectin and barrier integrity in pulmonary capillary endothelium. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 297(4):L650-657.
- Xu F, Satoh E, Iijima T. 2003a. Protein kinase C-mediated Ca²⁺ entry in HEK 293 cells transiently expressing human TRPV4. *British journal of pharmacology* 140(2):413-421.
- Xu H, Zhao H, Tian W, Yoshida K, Roullet JB, Cohen DM. 2003b. Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation. SRC family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 mediates its response to hypotonic stress. *The Journal of biological chemistry* 278(13):11520-11527.
- Yang H, Wang Z, Capo-Aponte JE, Zhang F, Pan Z, Reinach PS. 2010. Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells. *Experimental eye research* 91(3):462-471.
- Yi X, Wang Y, Yu FS. 2000. Corneal epithelial tight junctions and their response to lipopolysaccharide challenge. *Investigative ophthalmology & visual science* 41(13):4093-4100.
- Zhang F, Yang H, Wang Z, Mergler S, Liu H, Kawakita T, Tachado SD, Pan Z, Capo-Aponte JE, Pleyer U, Koziel H, Kao WW, Reinach PS. 2007. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling. *Journal of cellular physiology* 213(3):730-739.
- Zhao Y, Huang H, Jiang Y, Wei H, Liu P, Wang W, Niu W. 2012. Unusual localization and translocation of TRPV4 protein in cultured ventricular myocytes of the neonatal rat. *European journal of histochemistry* : EJH 56(3):e32.

