

UCH - FC
Biotecnología
C. - 352
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

Activación por potencial eléctrico del canal TRPM8

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Juan Pablo Castillo Gutiérrez

Dr. Ramón Latorre De La Cruz
Director del Seminario de Título

Dr. Osvaldo Álvarez Araya
Prof. Patrocinante



Agosto de 2011
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por **el Sr. Juan Pablo Castillo Gutiérrez**

“Activación por potencial eléctrico del canal TRPM8”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Ramón Latorre De La Cruz
Director Seminario de Título

A blue ink signature of Ramón Latorre De La Cruz, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dra. Cecilia Vergara Montecinos
Presidente Comisión

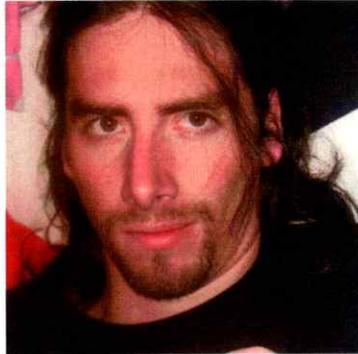
A green ink signature of Cecilia Vergara Montecinos, written over a horizontal line.

Dra. Magdalena Sanhueza Tohá
Evaluadora

A black ink signature of Magdalena Sanhueza Tohá, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, noviembre de 2011.

Biografía



Yo entre a estudiar la carrera de biotecnología el año 2004 sin saber mucho que quería hacer de mi vida en el futuro, hasta que en cuarto año, en el ramo de Fisiología General descubrí la Biofísica con el profesor Osvaldo Álvarez, disciplina de la cual me enamoré. Al año siguiente me puse a trabajar en el laboratorio de Ramón Latorre quien me terminó de motivar para entrar al programa de doctorado de la Facultad. Ahora 8 años después de haber empezado la aventura de la Universidad miro hacia atrás y estoy feliz de haber tomado el camino que tomé, pues siento que ahora verdaderamente estoy haciendo lo que me gusta.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi profesor Osvaldo Álvarez quien me enseñó con excepcional claridad, simpleza y paciencia la rama de la ciencia que logró cautivarme, la Biofísica.

Quiero agradecer también a mi tutor y maestro Ramón Latorre quien me acogió con entusiasmo en su laboratorio y me dejó actuar con completa libertad en los temas que me apasionan.

Quiero finalmente agradecer a David Baez quien logró hacer todos los experimentos que yo no pude concretar, y que permitieron terminar esta memoria.

Muchas gracias

Índice de contenidos

Introducción	1
TRPM8 y su dependencia de potencial	1
Modelos cinéticos de activación por potencial eléctrico	5
Hipótesis	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Materiales y Métodos	13
Resultados	19
Corrientes macroscópicas y análisis de ruido	19
Análisis de actividad de canales únicos	26
Dependencia de potencial y modelo de dos estados	30
TRPM8 y ajuste al modelo alostérico	33
Comparación entre ajustes a los dos modelos propuestos	38
Quiebre de la pendiente de $\ln(P_o)$ en función del voltaje	40
Desviaciones en los parámetros	41
El significado del parámetro D	42
Discusión	44
Apéndice I: Análisis de ruido no estacionario	49
Apéndice II: Aproximación de la pendiente de $\ln(P_o)$ para el modelo alostérico a probabilidades bajas.	51
Bibliografía	54

Índice de Tablas

Tabla I. Parámetros obtenidos del ajuste al modelo de dos estados	32
Tabla II. Parámetros obtenidos del primer método para ajustar al modelo alostérico	36
Tabla III. Parámetros obtenidos del segundo método para ajustar al modelo alostérico	37
Tabla IV. Parámetros estadísticos para determinar si efectivamente el modelo alostérico es mejor que el modelo de dos estados	39

Índice de Figuras

Figura 1: Modelos cinéticos de activación por potencial	10
Figura 2. Corrientes macroscópicas de TRPM8 en ovocitos de <i>X. laevis</i>	20
Figura 3. Comportamiento dinámico exponencial en el TRPM8	21
Figura 4. Pérdida de corriente por escisión del parche	22
Figura 5. Registros de corriente a 220 mV	23
Figura 6. Análisis de varianza y corriente promedio	24
Figura 7. P_o en función del voltaje	25
Figura 8. Eventos de canales únicos en parches con muchos canales	27
Figura 9. Corriente de eventos unitarios del TRPM8	28
Figura 10. Idealización de niveles abiertos y cerrados	28
Figura 11. P_o de los eventos de canal único	29
Figura 12. Ajuste de P_o a la función de Boltzmann	31
Figura 13. Ajuste de la constante L	34
Figura 14. Ajuste de P_o a distintos modelos	39
Figura 15. Significado del parámetro D	42

Abreviaturas y Constantes físicas

e	carga elemental	$1,6 \cdot 10^{-19} \text{ c}$
F	constante de Faraday.	96500 cmol^{-1}
P_o	probabilidad de encontrar un canal abierto	
R	constante universal de los gases ideales.	$8,614 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$
TRP	del inglés "Transient Receptor Potential"	
Q_{10}	medida de dependencia de temperatura definida como:	

$$\left(\frac{I_1}{I_2}\right)^{\frac{10}{T_1-T_2}}$$

Cantidades y símbolo de las unidades de medida

Tiempo	segundos	s, ms
Temperatura	grados Celsius	°C
Frecuencia	Hertz	Hz, kHz
Corriente eléctrica	Ampere	A, nA, pA
Resistencia eléctrica	Ohm	Ω , k Ω , M Ω , G Ω
Conductancia eléctrica	Siemens	S, pS
Carga eléctrica	Coulomb	c
Potencial eléctrico	Volt	V, mV
Energía	Joule	J, kJ

Resumen

Los canales de iones son proteínas integrales de la membrana celular y están involucrados en la percepción de la mayoría de los estímulos internos y externos. Actuando como transductores moleculares, los canales de iones transforman la energía del estímulo en energía mecánica que abre la compuerta del canal, que permite la generación del impulso nervioso. El TRPM8 es un canal que se activa cuando las temperaturas descienden de los 20°C, por lo que se le atribuye una gran importancia en cuanto a la percepción del frío en mamíferos. Este canal también es activado por la diferencia de potencial eléctrico de la membrana celular. Se desconoce, sin embargo, la naturaleza del acople que existe entre el sensor de voltaje y la compuerta que abre el canal, y cómo influye el estímulo térmico sobre este proceso. En este seminario se muestran resultados que permiten concluir que se puede tener activación de la compuerta del canal aún cuando la gran mayoría de los sensores de potencial están en estado de reposo, implicando que no existe un acople estricto entre el sensor de potencial eléctrico y la apertura del poro por donde pasa la corriente iónica. De estos resultados se infiere que el TRPM8 podría obedecer a un modelo de activación de tipo alostérico, por lo que eventualmente un estímulo térmico podría abrir el canal cuando todos los sensores de potencial están en reposo.

Abstract

Ion channels are integral proteins of the cell membrane and they are involved in the perception of most internal and external stimuli. Acting as molecular transducers, ion channels transform the energy of the stimulus into mechanical energy that opens the channel gate, to allow the generation of the nerve impulse. TRMP8 is an ion channel that activates when temperatures drop from 20°C, so it is thought to be very important in cold sensation in mammals. This channel is also activated by the difference in electric potential across the cell membrane. It is unknown, however, the nature of the coupling between the voltage sensor and the channel gate and how the thermal stimulus influences this process. In this thesis results are shown that demonstrate that it is possible to open a channel gate, even when most of the voltage sensors are in the resting state, implying that there is not a strict coupling between the voltage sensor activation and the channel gate opening. On the basis of these results one can infer that TRPM8 activation is best explained by an allosteric gating model, such that a thermal stimulus could open the channel when all the voltage sensors are in the resting state.

Introducción

TRPM8 y su dependencia de potencial

Los canales de iones son proteínas integrales de membrana presentes en todas las células de los sistemas vivos. La función que cumplen los canales es la de formar vías de paso para átomos cargados (iones) que viajan desde el citoplasma hacia el líquido extracelular y viceversa. La dirección que siguen los iones a través de los canales depende del gradiente electroquímico formado entre el borde interno y el borde externo de la membrana celular, por lo que se dice que es un tipo de transporte pasivo (Hille, 1992).

En las células excitables del sistema nervioso los canales de iones juegan un papel fundamental, ya que son estos los responsables de formar las vías de paso para la entrada de iones Na^+ y la subsiguiente salida de iones K^+ , que da como resultado el cambio en el potencial de membrana transitorio conocido como potencial de acción, capaz de auto-propagarse a lo largo de los axones.

Existen muchos tipos de canales de iones, que pueden diferenciarse por sus distintas características como el tipo de ion que puede permear a través de ellos (selectividad), la cantidad de iones que pasan por unidad de tiempo (conductancia), y el tipo de estímulo que cambian la probabilidad de encontrarlos en el estado conductor (dependencia de potencial eléctrico, segundos mensajeros, neurotransmisores, temperatura, etc.).

Existen canales de iones que son capaces de transformar estímulos térmicos en cambios del potencial de membrana. Estos cambios a su vez desencadenan potenciales de acción que finalmente son transmitidos hasta el sistema nervioso central permitiéndonos sentir

la temperatura del medio que nos rodea así como también la temperatura interna de nuestro cuerpo.

Por medio de técnicas moleculares fue posible clonar un canal presente en neuronas del ganglio raquídeo (DRG) y del ganglio trigémino (TG) que era activado al disminuir la temperatura en el rango comprendido entre 25 y 10 °C y también por mentol (un compuesto orgánico que nos da la sensación de frío), produciendo un aumento en la corriente iónica y la entrada de Ca^{2+} en las células. Este canal designa como TRPM8 y pertenece a la familia de canales de iones denominados "Transient Receptor Potential" (TRP) (McKemy y cols. 2002).

Los TRP están involucrados en la transducción de distintos estímulos sensoriales. Son canales tetraméricos, catiónicos no selectivos. Cada subunidad posee 6 segmentos transmembrana y sus extremos amino y carboxilo terminal citoplasmáticos, con una dependencia de potencial débil o ausente. Topológicamente tienen una estructura similar a la de los canales de potasio dependientes de potencial, que también poseen 6 segmentos de transmembrana y los amino y carboxilo terminales están localizados en el citoplasma (Minke & Cook, 2002). El segmento S4 de los canales TRP no posee las cargas positivas conservadas que poseen los canales dependientes de voltaje, pero se sugiere que este segmento podría ser el sensor de potencial en los TRP que son sensibles a voltaje (Voets y cols. 2007). Los segmentos de transmembrana S5-S6 de los TRP también forman el poro por donde transitan los cationes.

El TRPM8 es un canal catiónico que tiene 1097 aminoácidos. Es dependiente de potencial con una rectificación de salida débil, con una carga de $\sim 0.8 e$ asociada a la activación del canal, y con una conductancia unitaria de alrededor de 70 pS. Es activado

por temperaturas bajas y presenta una dependencia de temperatura muy alta entre los 17°C y 24°C, con un $Q_{10} \sim 24$ en ese intervalo de temperatura (Brauchi y cols. 2004).

Las bases moleculares detrás de la integración de estímulos térmicos y eléctricos que se traducen en la apertura de estos canales con la consiguiente entrada de cationes, aun no está del todo clara.

Un modelo publicado para la activación del TRPM8, supone la existencia de dominios o módulos que serían activados por temperatura o por el potencial eléctrico de membrana que actuarían de manera independiente. Este modelo supone así mismo que el canal puede encontrarse en su estado conductor (abierto) o no conductor (cerrado) sin que necesariamente los módulos estén activados. Estas suposiciones dan origen a un modelo de activación de tipo alostérico para ambos estímulos, térmico y eléctrico (Brauchi y cols. 2004, Latorre y cols. 2007).

Por otra parte la sola aplicación de potenciales positivos no logra activar completamente los canales mientras que la aplicación de mentol si lo logra. Esto podría indicar que la activación por potencial y agonistas en el TRPM8 siguen caminos distintos (Matta & Ahern, 2007). Este comportamiento apoya el modelo alostérico propuesto por Brauchi y cols. (2004)

Poco se sabe acerca del supuesto sensor de potencial en el TRPM8. Se cree que podría estar localizado en el segmento transmembrana S4, así como ha sido descrito para los canales dependientes de voltaje (Noda y cols. 1984).

Dos mutaciones puntuales en el segmento S4 del TRPM8, R842A y R856A, mostraron un cambio en la dependencia de potencial, lo que podría indicar que efectivamente el segmento S4 es el sensor de potencial (Voets y cols. 2007). Este estudio se llevó a cabo

midiendo la pendiente límite de las curvas de activación con rampas de voltaje en células HEK-293 expresando el canal TRPM8. Sin embargo, estos resultados no son muy concluyentes ya que las mutaciones R842A y R856A, produjeron una reducción de la dependencia de potencial aparente de $\sim 0.2 e$ y $\sim 0.3 e$ respectivamente, de un total de $\sim 0.9 e$, mostrando que por sí solas estas cargas no son capaces de sumar la carga total observada en el TRPM8 silvestre.

El resultado anterior difiere con estudios hechos en canales dependientes de potencial, donde mutaciones puntuales en el sensor de voltaje del canal de potasio *Shaker*, mostraron que la contribución de 4 cargas presentes en el segmento S4 eran capaces de dar cuenta de toda la dependencia de potencial del canal, dado que la neutralización de una de estas 4 cargas, traía consigo una disminución de carga equivalente de $1 e$, y la suma de cada una de las contribuciones individuales correspondía a un poco más de la carga total equivalente del canal silvestre. (Aggarwal and MacKinnon, 1996, Seoh y cols., 1996).

Estos resultados hacen pensar que las cargas responsables de la dependencia de potencial del TRPM8, podrían no ser las propuestas (R842 y R856) del segmento S4, y que las pequeñas variaciones observadas en la dependencia de potencial son efecto de alteraciones en las constantes de equilibrio de un modelo cinético más complicado que el de 2 estados que fue propuesto.

Modelos cinéticos de activación por potencial eléctrico

Para describir detalladamente la activación por potencial del TRPM8, es necesario estudiar un poco los dos modelos cinéticos que se han propuesto, de modo de comprender qué implica cada modelo y qué restricciones hay que tener en cuenta.

Las técnicas electrofisiológicas permiten calcular la probabilidad de encontrar un canal abierto (desde ahora P_o), y a partir de esta medida se ajustan los resultados obtenidos a los modelos teóricos.

Un canal, en general, tiene dos tipos de estados: abiertos y cerrados. La P_o se calcula como la suma de las probabilidades de todos los estados abiertos del canal dividida por la suma de las probabilidades de todos los estados abiertos y cerrados:

$$P_o = \frac{\sum O_i}{\sum O_i + \sum C_i} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde O_i y C_i representan las probabilidades de los distintos estados abiertos y cerrados respectivamente.

Para completar la expresión de P_o , es necesario expresar las probabilidades de los estados abiertos y cerrados en términos de las constantes de equilibrio que los relacionan. Las constantes de equilibrio involucradas dependen a su vez de una o más variables.

a. Modelo de dos estados

El modelo de dos estados es el modelo más simple para explicar la activación del canal por acción del potencial de membrana. Supone que el canal tiene sólo un estado cerrado, C (no conductivo), con el sensor de potencial en reposo, y un único estado abierto, O (conductivo), con el sensor de potencial en estado activado. En este tipo de modelos ocurre sólo un tipo de transición entre ambos estados. En la Figura 1A se observa un esquema de este modelo. El equilibrio entre los dos estados está comandado por la constante K que es función del potencial de membrana, y está definida tomando el estado cerrado como inicial y el abierto como final:

$$K_{(V_m)} = K_0 e^{\frac{zF}{RT} V_m} = e^{\frac{zF}{RT} (V_m - V_{1/2})} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde z corresponde a la carga involucrada en la activación del canal (transición de cerrado a abierto), y refleja la dependencia de potencial de esta transición; V_m es el potencial eléctrico de la membrana; $V_{1/2}$ es el potencial al cual la constante tiene valor 1, es decir la probabilidad de encontrar el canal abierto es igual a la de encontrarlo cerrado y, por lo tanto, $P_o = 0.5$; F es la constante de Faraday; T la temperatura absoluta y R la constante universal de los gases ideales (Hille, 1992). K_0 corresponde al valor de la constante de equilibrio cuando la diferencia de potencial eléctrico de la membrana es igual a 0 mV. Es necesario notar que el logaritmo de K es una función lineal del potencial de membrana.

De las ecuaciones 1 y 2 se tiene que la probabilidad de encontrar el canal abierto P_o está dada por:

$$P_o = \frac{1}{1 + K^{-1}} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{zF}{RT}(V_m - V_{1/2})}} \quad \text{Ecuación 3}$$

De esta última expresión, conocida como función de Boltzmann, vemos que el valor de P_o converge a 1 en el límite de los potenciales positivos, ya que como muestra la Ecuación 2, si $V_m \gg 0$, entonces $K \gg 1$, y $K^{-1} \ll 1$.

Por otro lado, para potenciales muy negativos el valor de la K^{-1} es mucho más grande que 1. Aplicando logaritmos a ambos lados de la ecuación 3 se obtiene:

$$\ln(P_o) \approx \frac{zF}{RT}(V_m - V_{1/2}) \quad \text{Ecuación 4}$$

Esto nos dice que para el límite de potenciales negativos, el logaritmo de P_o versus el potencial de membrana se comporta de manera lineal (Figura 1C).

b. Modelo alostérico de cuatro estados

En el modelo alostérico de activación por potencial el poro de conducción puede estar abierto o cerrado, sin necesidad de que el sensor de potencial esté activado; por lo tanto son posibles cuatro estados para el canal: C_0 = canal cerrado, sensor en reposo, C_1 = canal cerrado, sensor activo, O_0 = canal abierto, sensor en reposo, O_1 = canal abierto sensor activo. En la Figura 1B, se observa un esquema de este modelo de cuatro estados. La transición de cerrado a abierto en ausencia de activación por potencial, $C_0 \rightarrow O_0$, está comandada por la constante de equilibrio L , que para este caso suponemos que tiene una dependencia de potencial leve.

La activación del sensor de potencial con el canal cerrado, $C_0 \rightarrow C_1$, está determinada por la constante de equilibrio J . La activación del sensor de potencial tiene como consecuencia que el equilibrio cerrado-abierto queda determinado por LD . D , es denominado factor alostérico, y es un número positivo mayor que 1 (Figura 1B).

Ambas constantes de equilibrio mencionadas se expresan de la forma:

$$L_{(V_m)} = L_0 e^{\frac{z_L F}{RT} V_m} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$J_{(V_m)} = J_0 e^{\frac{z_J F}{RT} V_m} \quad \text{Ecuación 6}$$

Las constantes L y J son similares a la constante K del modelo de dos estados, pero la carga transportada en cada uno de los equilibrios cumplen la relación $z_L \ll z_J$, impuesta por la suposición de que la transición del canal de cerrado a abierto involucra muy poco

movimiento de carga, es decir que L tiene poca dependencia de potencial. (Horrigan & Aldrich, 1999, Brauchi y cols. 2004, Matta & Ahern, 2007).

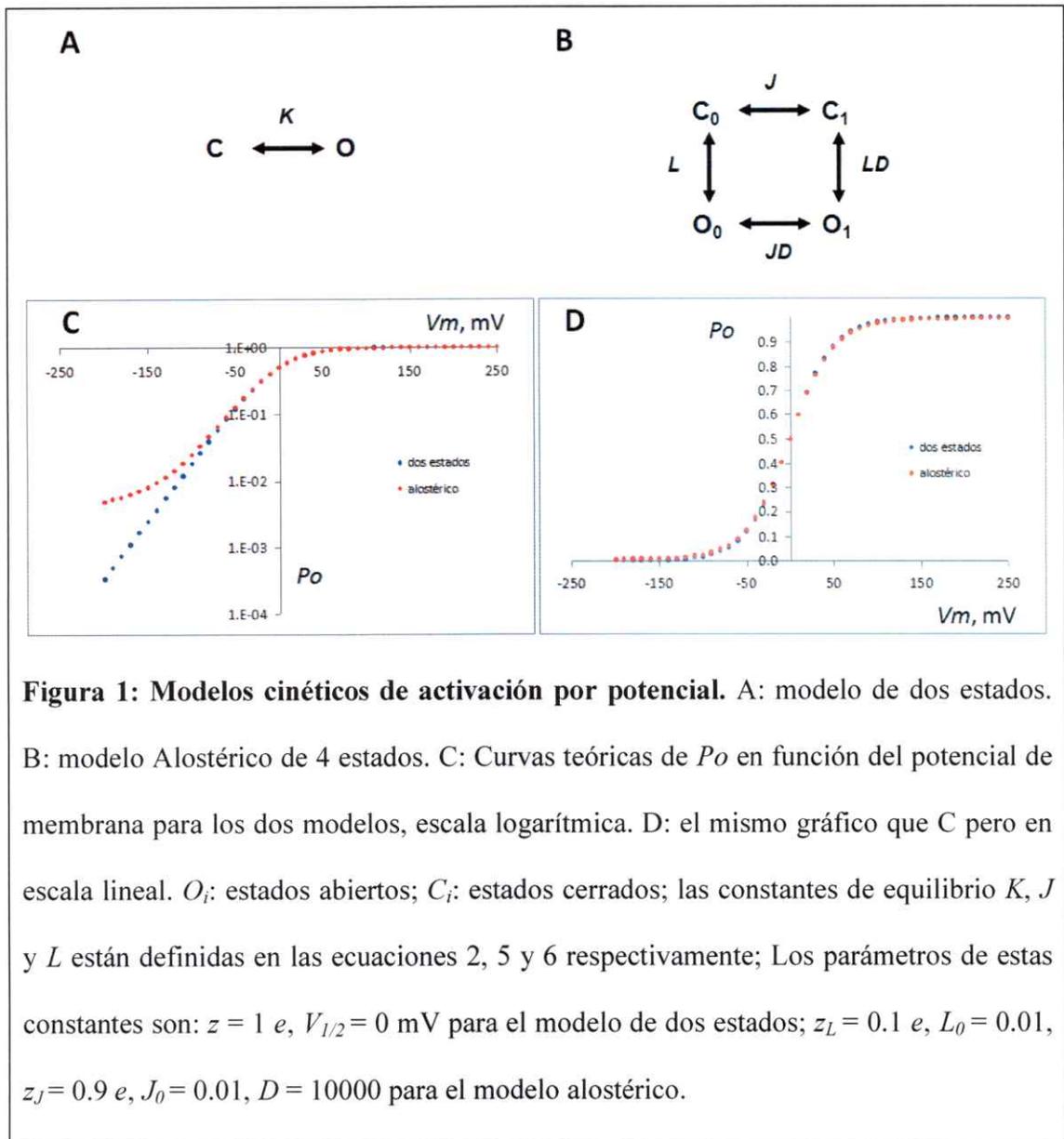
De la Ecuación 1 se puede deducir que la probabilidad del canal abierto, P_o , para el esquema cinético de la figura 1B es:

$$P_o = \frac{1}{1 + \frac{1+J}{L(1+JD)}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Para este modelo, P_o en función del voltaje tiene una forma un poco más complicada que el modelo de 2 estados, ya que existe un intervalo de voltajes donde la pendiente de la curva ($\ln P_o$) vs V_m tiene un valor parecido a $(z_L+z_J)F/RT$, que corresponde a la dependencia de potencial de ambas constantes J y L , pero a voltajes lo suficientemente negativos, la pendiente sufre un quiebre, haciendo que la P_o sea menos dependiente de potencial (Figura 1C). En este extremo de potenciales negativos P_o tiene la forma:

$$P_o \approx \frac{1}{1 + L^{-1}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Es decir que se comporta como un modelo de dos estados, pero la pendiente de la curva de ($\ln P_o$) tiene el valor $z_L F/RT$, que es menor que $z_J F/RT$. Se observa que para P_o mayores que 10^{-1} , ambos modelos son casi indistinguibles, mientras que para probabilidades menores que 10^{-1} los modelos tienen una clara diferencia (Figura 1C y 1D).



Hipótesis

Sobre la base de las evidencias expuestas anteriormente, se puede pensar que la activación por potencial del TRPM8 obedece a un modelo de tipo alostérico. Si esto es correcto, a potenciales lo suficientemente negativos el canal TRPM8 podría sufrir transiciones de cerrado a abierto con una dependencia de potencial menor a $z \approx 0.9 e$, que se observa entre 0 mV y 200 mV. Esta menor dependencia de potencial se observaría a voltajes donde casi todos los sensores de potencial están en reposo. Por lo tanto a estos potenciales donde la P_o es muy baja, la curva de $\ln P_o$ vs V_m sufriría un quiebre de pendiente, tendiendo a la dependencia de potencial de la transición que mueve menos carga.

Objetivo general

Calcular la probabilidad de encontrar el canal abierto en condiciones de muy baja probabilidad. Para eso se usarán membranas con muchos canales, utilizando análisis de ruido para contar los canales presentes en la membrana, y calcular la probabilidad del canal abierto analizando registros con actividad de canal único, a potenciales menores que -100mV.

Objetivos específicos

- Expresar el canal TRPM8 en la membrana de Ovocitos de *Xenopus laevis* y obtener registros de corrientes macroscópicas utilizando la técnica de *patch clamp* en modalidad *cell-attached*.
- Realizar conteo de canales presentes en el parche, utilizando la técnica de análisis de ruido no estacionario.
- Llevar el potencial de membrana a valores menores que -100mV de tal forma de obtener actividad de canal único, y calcular la probabilidad de tener un canal abierto, para estos potenciales.

Materiales y métodos

Expresión de TRPM8 en ovocitos de *Xenopus laevis*

Se obtuvo el RNA mensajero del TRPM8 a partir de un DNA construido con el vector de expresión para *Xenopus laevis* pBSTA y con la secuencia del TRPM8 de ratón disponible en el laboratorio del Dr. Ramón Latorre. Este vector fue linealizado con la enzima NotI (Fermentas) y posteriormente sometido a una reacción de transcripción *in vitro* con la enzima RNA polimerasa T7 (kit mMessege Machine, Ambion), la reacción fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración final del RNA fue de alrededor de 5 µg/µl. La preparación fue diluida en agua hasta una concentración de 2 µg/µl, separada en alícuotas de 2 µl y guardadas en un refrigerador a -20°C hasta que fueran utilizadas.

La micro-inyección de ovocitos se llevó a cabo con un micro-inyector Nanoliter 2000 (World Precision Instruments). Se inyectaron alrededor de 100ng de RNA en inyecciones de 50nl para cada ovocito. Los ovocitos fueron extraídos quirúrgicamente de una rana mantenida en condiciones de luz/oscuridad de 12hrs a 18°C. El procedimiento consistió en una incisión abdominal de alrededor de 5mm, en una rana hembra anestesiada con tricaina 2g/L (Dolical 80%, Lab. Centrovert) en agua sin cloro. La incisión fue realizada con la rana en hielo, a través de la cual se extrajeron lóbulos ováricos con cientos de ovocitos. La rana fue luego suturada y transferida a un recipiente de agua sin cloro.

Los lóbulos con cientos de ovocitos fueron almacenados en solución ND96: NaCl 96mM, KCl 2mM, CaCl₂ 1,8mM, MgCl₂ 1mM y HEPES 5mM pH 7,6.

Los ovocitos fueron luego disgregados mecánicamente y almacenados en solución OR2: NaCl 82,5mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 1mM y HEPES 5mM pH 7,6. Posteriormente los oocitos fueron desfoliculados con solución OR2 y colagenasa tipo IV (Boehringer) a una concentración de 1,3mg/ml, en un agitador orbital a 180 revoluciones por minuto durante una hora, y luego a 100rpm durante una hora, seguida cada agitación de un lavado con OR2.

La micro-inyección se realizó a cabo después de 6 horas de la desfoliculación. Los ovocitos inyectados se almacenaron en solución ND96 a 20°C durante 4 a 7 días, para hacer los experimentos electrofisiológicos.

Electrofisiología

Las corrientes fueron obtenidas utilizando la técnica de *patch clamp* en configuración *cell-attached* (Hamill y cols. 1981). La solución utilizada para llenar la pipeta de patch fue la misma para el baño y contenía: K⁺-MES 110 mM, EGTA 5 mM, GdCl₃ 0,06 mM, KCl 2 mM, HEPES 10 mM pH 7,4. La concentración de potasio se escogió de manera que el potencial de reposo del ovocito estuviera cercano a 0 mV, de manera que no hubiera error sobre el potencial eléctrico aplicado sobre el parche.

Las pipetas de *patch* se prepararon a partir de capilares de vidrio de 1.65 mm de diámetro externo (A-M Systems Inc.), estirados en un estirador de pipetas P-97 (Shutter Instruments). Las pipetas luego fueron pulidas en una micro-forja MF-830 (Narishige). La máxima resistencia de las pipetas utilizadas fue de 800 kΩ, con un diámetro de alrededor de 8 μm en la punta. El amplificador utilizado fue un Axopatch 200B (Axon

Instruments), en modo *Voltage Clamp*, con una sensibilidad de 0,1 mV/pA para las corrientes macroscópicas y de 10 mV/pA o 20 mV/pA para los registros de canal único.

Dado que las corrientes macroscópicas fueron de más de 10 nA, el error máximo de voltaje de membrana debido a la resistencia en serie fue de alrededor de 8 mV por cada 10 nA, error que fue corregido con el circuito compensador de resistencia en serie integrado en el amplificador.

La temperatura de la pieza fue siempre de 20°C para todos los experimentos que se muestran en esta memoria.

La adquisición de datos fue realizada con una tarjeta PCI 6052E (National Instruments), y una interfaz BNC 2110 (National Instruments). La frecuencia de adquisición fue de 50 kHz para los experimentos de corrientes macroscópicas y de análisis de ruido, y de 25 kHz para los experimentos de canal único.

Se utilizó un filtro Bessel análogo de 8 polos 900C/9L8L (Frequency Devices) a la salida del amplificador, con una atenuación de -3dB a 15 kHz para los experimentos de corrientes macroscópicas y de análisis de ruido, y a 5 kHz para los experimentos de canal único.

Se utilizó un software de adquisición desarrollado por el Dr. Patricio Orio (Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso) basado en la plataforma LABVIEW para el sistema operativo Windows XP (Microsoft), para dar los comandos de voltaje y registrar las corrientes obtenidas.

Los giga sellos obtenidos ($>1\text{G}\Omega$) fueron sometidos a 3 diferentes protocolos de voltaje. El primer protocolo de voltaje consistió en 2 ms de mantención a -80 mV, seguidos de 35ms de un pulso de prueba que fue variando desde 250 mV hasta -100 mV, en

intervalos de 10 mV, y luego el potencial fue llevado a -60 mV por 2 ms. El potencial de mantención fue de 0 mV y cada pulso fue separado del anterior por 3 s.

El segundo protocolo, utilizado para hacer análisis de ruido, constó 200 pulsos sucesivos, donde los primeros 8 ms se fijó el voltaje a -50 mV, luego se dio un salto a 220 mV por 32 ms, y luego a 0 mV por 60 ms. El voltaje de mantención fue de 0 mV, y cada pulso fue separado de otro por 300 ms.

En los protocolos de corrientes macroscópicas y análisis de ruido se utilizó un protocolo $-p/4$ para restar la corriente transitoria debido a la capacidad de la membrana (Armstrong & Bezanilla, 1974)

Una vez realizados los dos protocolos anteriores se procedió a ver la actividad de canales únicos, manteniendo el potencial fijo por 60 s o 30 s a potenciales entre 0 mV y -210 mV, utilizando el modo de adquisición continuo.

Todos los voltajes mencionados en los protocolos anteriores corresponden al voltaje de transmembrana.

Análisis de Datos

El análisis de los datos crudos se realizó en el programa Clampfit, de la plataforma PClamp 9.2 (Axon Instruments). En este programa se calculó la corriente promedio para cada pulso de voltaje en los experimentos de corriente macroscópica. También se utilizó para calcular la corriente promedio y varianza en los experimentos de análisis de ruido. Para estos dos tipos de experimentos no se utilizó ningún filtro digital. Para los registros de canal único, se utilizó un filtro Bessel pasa-bajos, de tal manera de observar claramente las transiciones (mínima frecuencia de corte: 750 Hz). Para calcular P_o , se

procedió a contar los eventos manualmente. El programa calculó Po en base al número de canales, obtenido del análisis de ruido del parche correspondiente.

Todo el análisis posterior se realizó usando el programa MS-Excel de la plataforma Office (Microsoft). Los modelos teóricos fueron ajustados minimizando el error cuadrático del modelo frente a los datos experimentales, utilizando el complemento Solver de MS-Excel para realizar la minimización:

$$E = \sum (A_{\text{exp}} - A_{\text{mod}})^2 \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde E es el error cuadrático a minimizar, A_{exp} es un dato experimental y A_{mod} es su contraparte correspondiente del ajuste a un modelo. Dado que el interés se centra en ajustar el modelo a probabilidades muy pequeñas se utilizó como dato el logaritmo natural de Po ($\ln Po$). Así el error cuadrático a minimizar toma la forma:

$$E = \sum \left(\ln \frac{Po_{\text{exp}}}{Po_{\text{mod}}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 9.1}$$

Para obtener Po relativa a voltajes positivos se midió el valor de la corriente promedio de los últimos 10 ms de cada pulso (I), y se dividió por el voltaje del pulso (Vm) para obtener la conductancia (G).

Luego se dividió este valor por la conductancia máxima obtenida en el experimento (G_{max}), de acuerdo con la expresión de corriente:

$$I = PoG_{max}Vm \quad \text{Ecuación 10}$$

$$G = PoG_{max} \quad \text{Ecuación 10.1}$$

Para contar los canales presentes en el parche se ajustaron los resultados de corrientes promedio (I) y varianza (σ^2) de corriente a una parábola de la forma:

$$\sigma^2 = iI - \frac{I^2}{N} \quad \text{Ecuación 11}$$

Con este ajuste se obtuvo los valores de conductancia unitaria (i) y de número de canales (N) presentes en el parche (Apéndice I). También se obtuvo Po absoluta a 220 mV, haciendo la razón entre la corriente máxima alcanzada en el protocolo de ruido y la corriente unitaria multiplicada por el número de canales:

$$Po_{abs} = \frac{I_{max}}{iN} \quad \text{Ecuación 12}$$

Posteriormente se normalizó Po relativa obtenida de las corrientes macroscópicas, con respecto al valor de Po absoluta a 220 mV.

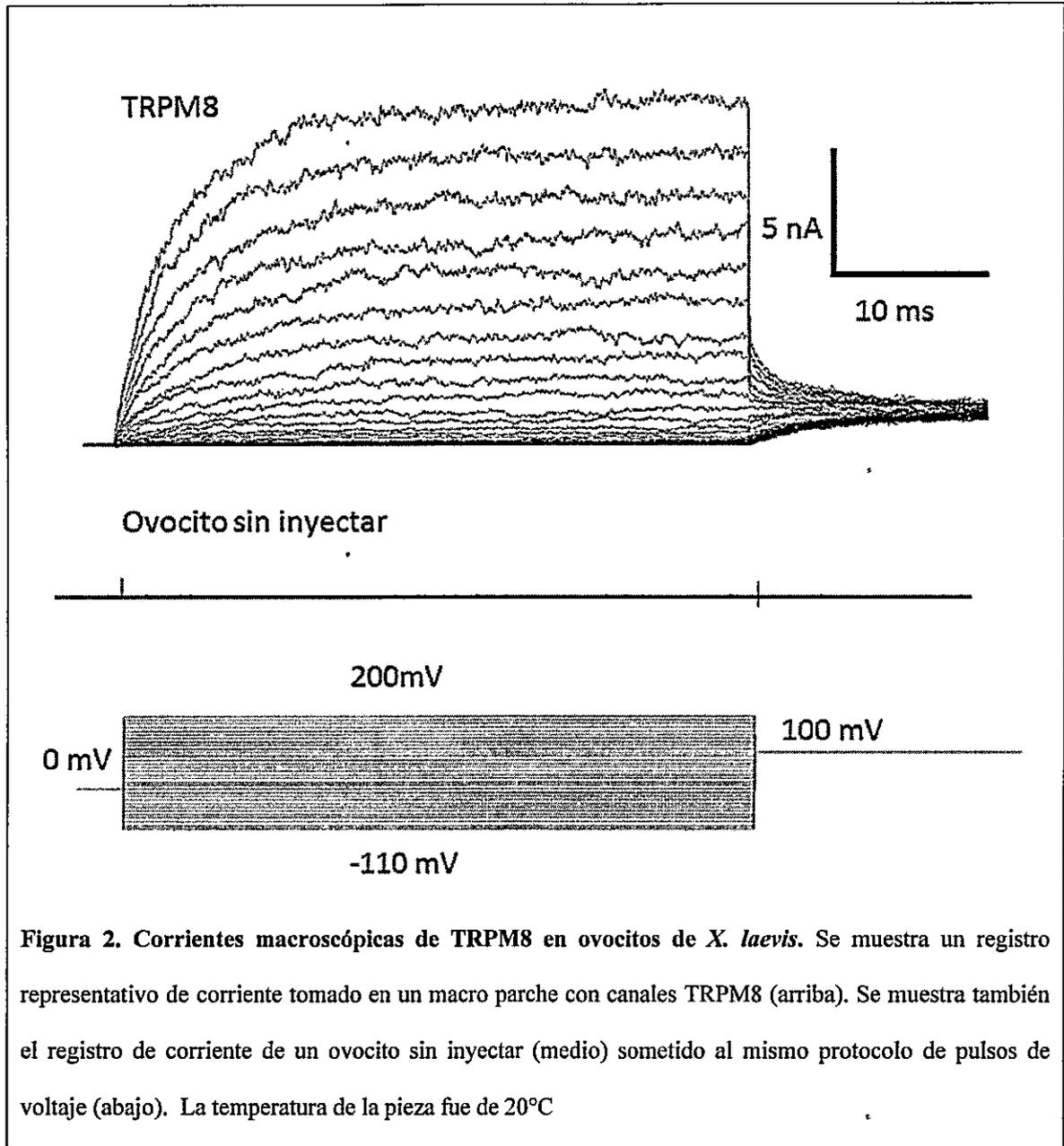
Resultados

Corrientes macroscópicas y análisis de ruido

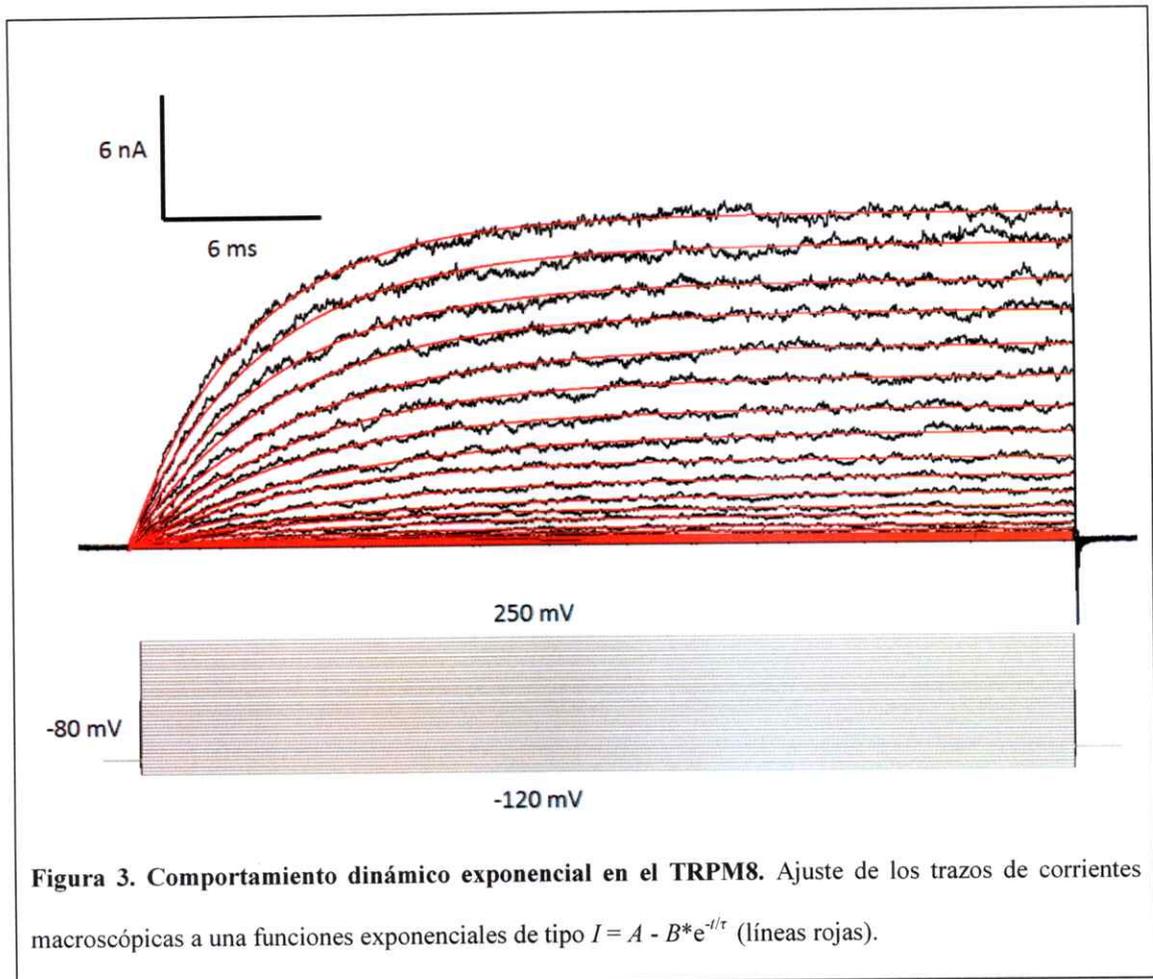
Se registró la corriente de macro parches obtenidos de la membrana de ovocitos de *Xenopus laevis* con la técnica de *patch clamp* en modalidad *cell attached*. Ya que el TRPM8 es un canal muy sensible a la temperatura de la pieza, todos los registros fueron obtenidos a 20°C.

Para poder calcular una P_o muy baja es necesario tener una cantidad grande de canales, por lo que los parches con menos de 1 nA a 250mV fueron descartados. La baja expresión de canales TRPM8 se puede solucionar si las corrientes macroscópicas se registran en membranas de ovocitos luego de 5 días post micro-inyección del RNA (Figura 2). Usando este protocolo experimental se puede obtener corrientes macroscópicas del orden de decenas de nA a 250 mV. Se observó que en macro-parches de ovocitos no inyectados no se registraron corrientes macroscópicas (Figura 2).

En todos los parches registrados expresando TRPM8 se observó una clara rectificación de salida, donde la corriente macroscópica se distingue del ruido instrumental a voltajes mayores que 80 mV (Figura 2).



El curso temporal de la corriente mostró una cinética exponencial, que se ajustó satisfactoriamente con una sola constante de tiempo (Figura 3), lo que podría sugerir que para voltajes mayores que 80 mV, hay principalmente un solo paso limitante para la apertura de los canales.



Una característica notable de las corrientes de TRPM8, es que la corriente desaparece casi completamente si el parche es escindido del ovocito (técnica de *patch clamp* modalidad *inside out*, Hamill y cols, 1981), incluso en parches en los que se registraban corrientes de decenas de nA con pulsos de 250 mV (Figura 4).



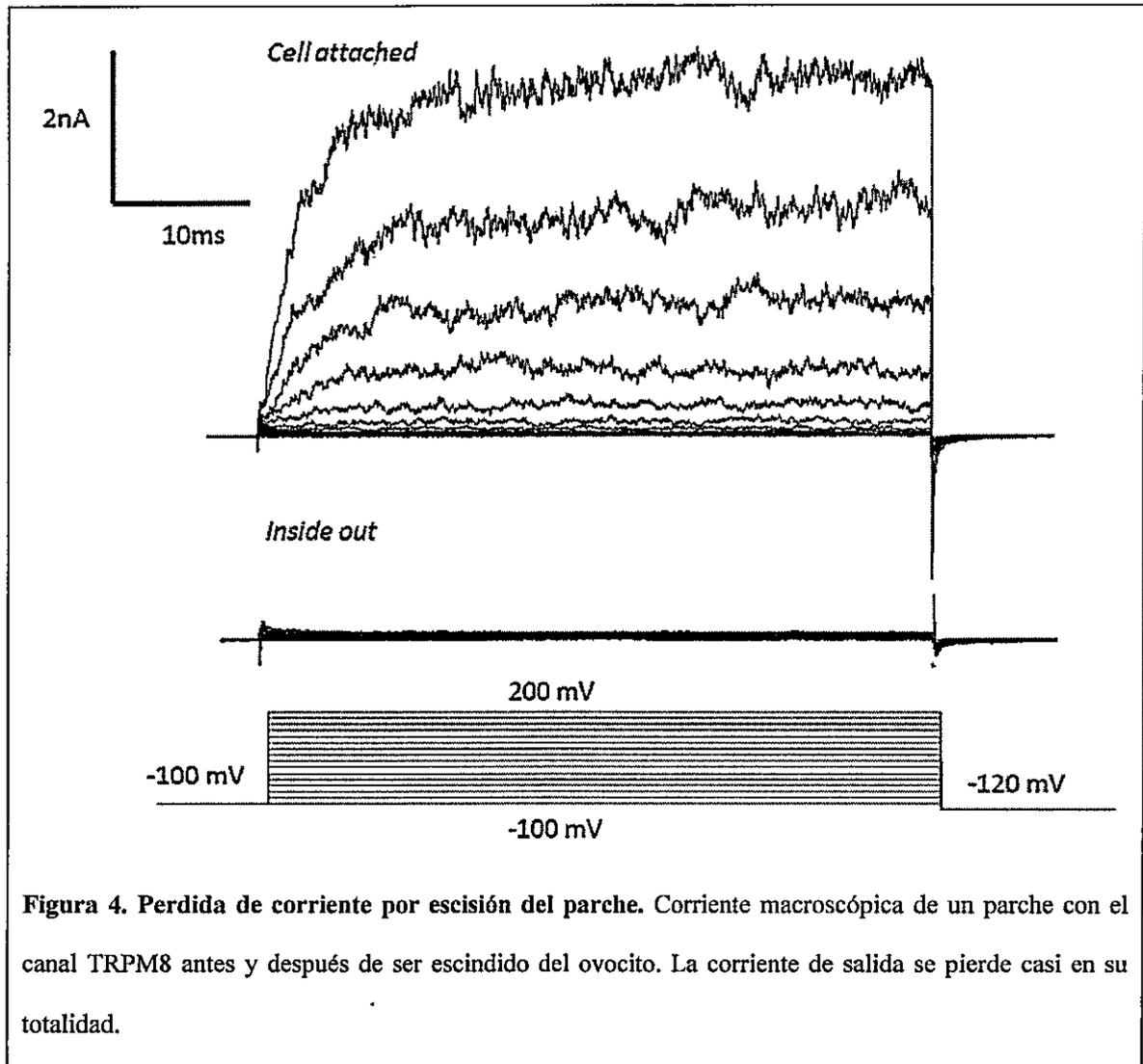
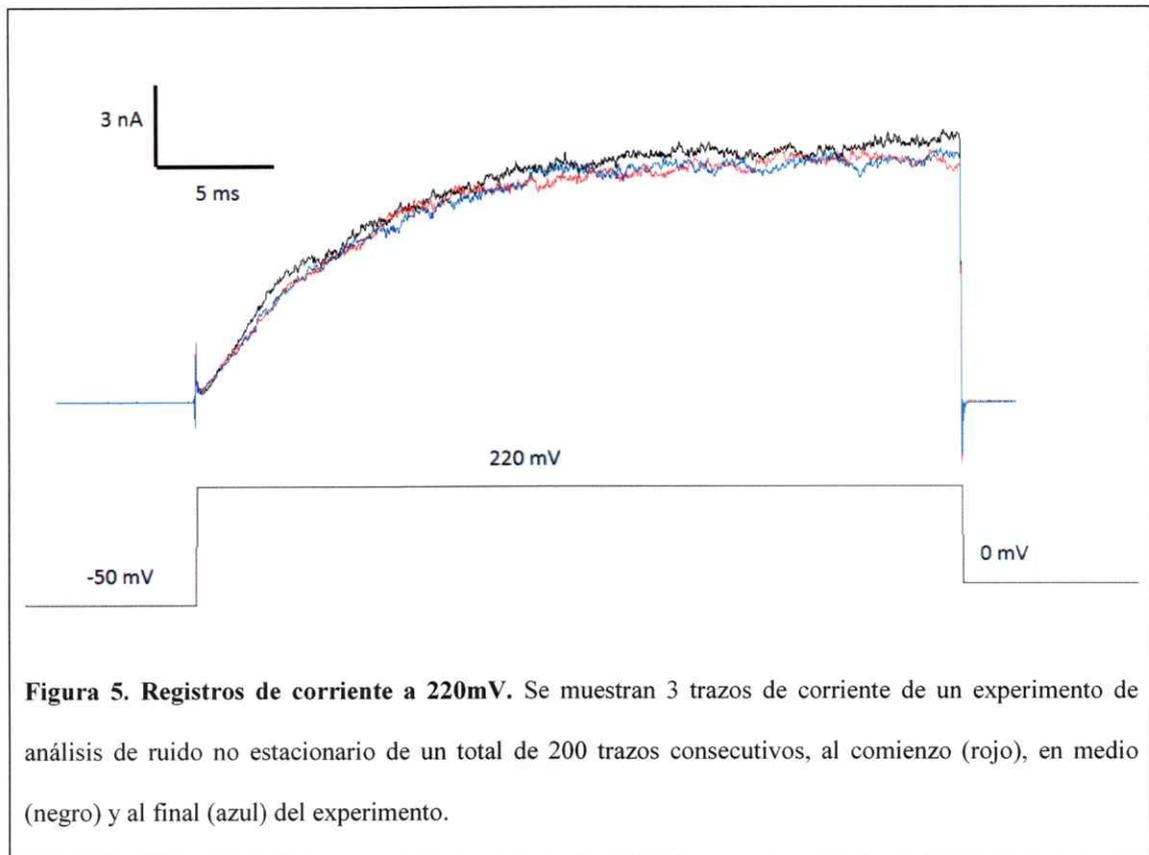


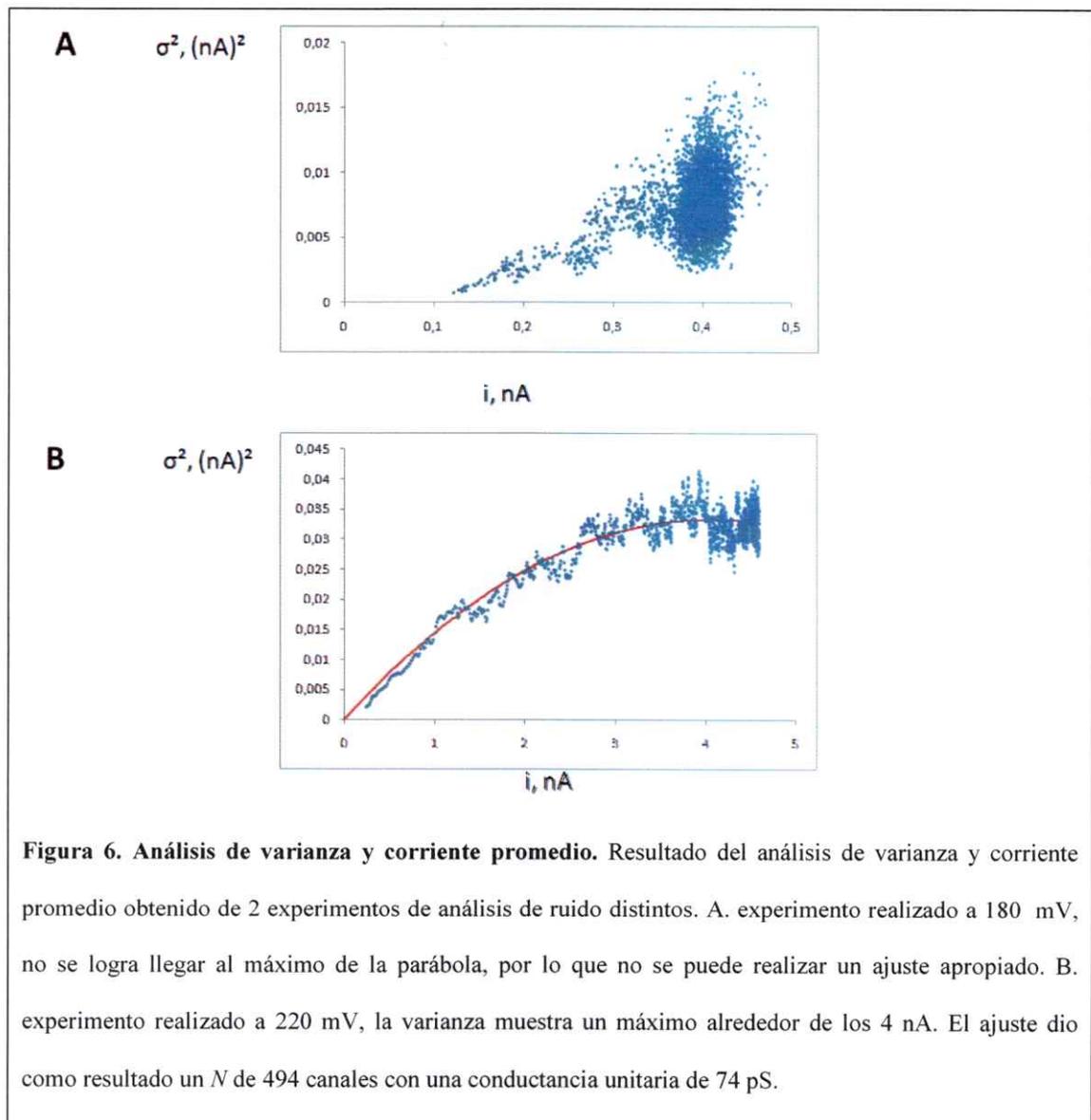
Figura 4. Perdida de corriente por escisión del parche. Corriente macroscópica de un parche con el canal TRPM8 antes y después de ser escindido del ovocito. La corriente de salida se pierde casi en su totalidad.

Luego de obtener la corriente macroscópica, se procedió a aplicar el protocolo de voltaje para análisis de ruido. Este consiste en 200 pulsos de voltaje idénticos que constan de un pre-pulso hiperpolarizante de -50mV de manera de cerrar los canales, seguido de un pulso despolarizante de 220 mV, de manera de abrir muchos canales. Las variaciones entre los 200 trazos de corriente se ocupan para obtener la corriente promedio y la varianza de la corriente (Figura 5). No se observó “rundown” de canales durante los experimentos.



Los valores de corriente promedio y varianza de la corriente fueron obtenidos utilizando el programa Clampfit 9.2. Ajustando los datos obtenidos a una parábola (Ecuación 11) es posible calcular la cantidad de canales presentes en el parche. Es necesario hacer notar que para que el ajuste a la Ecuación 11, se obtengan valores confiables de N , los datos deben describir el máximo de la parábola. (Figura 6). En la Figura 6A se observa que los datos presentan una tendencia parabólica, pero esta tendencia muestra que existe corriente de fuga. Además se puede notar que los datos no describen un máximo de varianza por lo que no se puede calcular de manera confiable el número de canales presentes en el parche. Sin embargo en la Figura 6B se muestra otro experimento en que

la curva pasa por el origen de coordenadas y alcanza un máximo a ~ 4 nA. El ajuste a la ecuación 11 dio una conductancia de 74 pS, un valor parecido al encontrado en la literatura (ver Brauchi y cols. 2004) y en congruencia con los análisis de canales únicos (ver más abajo), un N de 494 canales y una Po máxima de 0.57 calculada a partir de la corriente promedio máxima, registrada al final del pulso despolarizante.



Para tener una medida absoluta de P_o , se normalizó cada valor de G/G_{max} , obtenido de las corrientes macroscópicas (ver *Materiales y Métodos*, Ecuación 10.1), al valor de P_o obtenido a 220 mV, y se multiplicaron los valores obtenidos por la $P_{o_{max}}$ del resultado de análisis de ruido del mismo parche. De esta forma la P_o calculada de las corrientes macroscópicas a 220 mV tiene el mismo valor calculado con el análisis de ruido, y por lo tanto el resto de las P_o calculadas a distintos voltajes tendrían un valor parecido al absoluto. En la Figura 7 se observan los valores de P_o calculados para voltajes mayores que 0 mV los seis experimentos realizados.

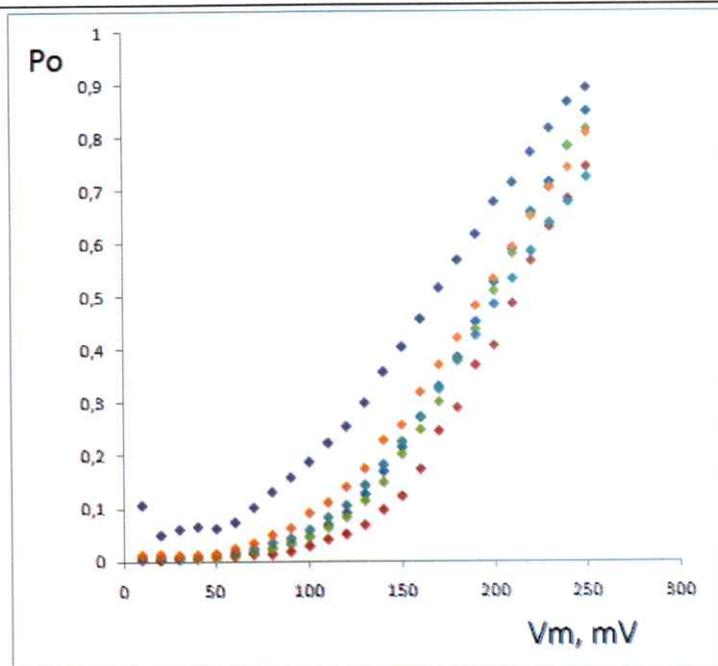


Figura 7. P_o en función del voltaje. P_o calculada para distintos voltajes de membrana obtenida del promedio de corriente de los últimos 10 ms de cada pulso del protocolo de corrientes macroscópicas, aplicando la Ecuación 10. Se muestran seis experimentos diferentes representados por distintos colores de los puntos.

Análisis de actividad de canales únicos

Los registros de canales únicos fueron tomados principalmente a voltajes negativos menores que -50 mV. En estos registros se observaron saltos discretos de corriente. Para realizar el análisis de los registros de canales únicos, éstos fueron procesados con un filtro Gauss digital pasa-bajos disponible en el programa Clampfit 9.2. La frecuencia a la cual la atenuación es de -3dB, fue elegida de acuerdo a la relación señal/ruido, de modo de que se observaran de manera clara los niveles abiertos y cerrado (Figura 8). Los saltos de corriente unitaria tuvieron una amplitud que varió de manera lineal con el voltaje, indicando que la corriente de canal abierto sigue la Ley de Ohm:

$$i = g(V_m - V_i) \qquad \text{Ecuación 13}$$

Donde i es la corriente unitaria del canal, g la conductancia unitaria, V_m el potencial de membrana y V_i es el potencial de inversión de la corriente.

El ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 13 da una conductancia unitaria g de 74 pS (Figura 9). El potencial de inversión V_i , en todos los casos fue cercano a 0 mV (Figura 9), sugiriendo que el canal es selectivo a cationes, en particular al potasio de la solución. Se comprobó que en macro parches de ovocitos sin inyectar no hubo actividad de canales únicos con una conductancia de alrededor de 80 pS en todo el intervalo de voltaje utilizado en este trabajo, por lo tanto se supone que toda la actividad de canales únicos con esta magnitud de corriente se debe a canales TRPM8.

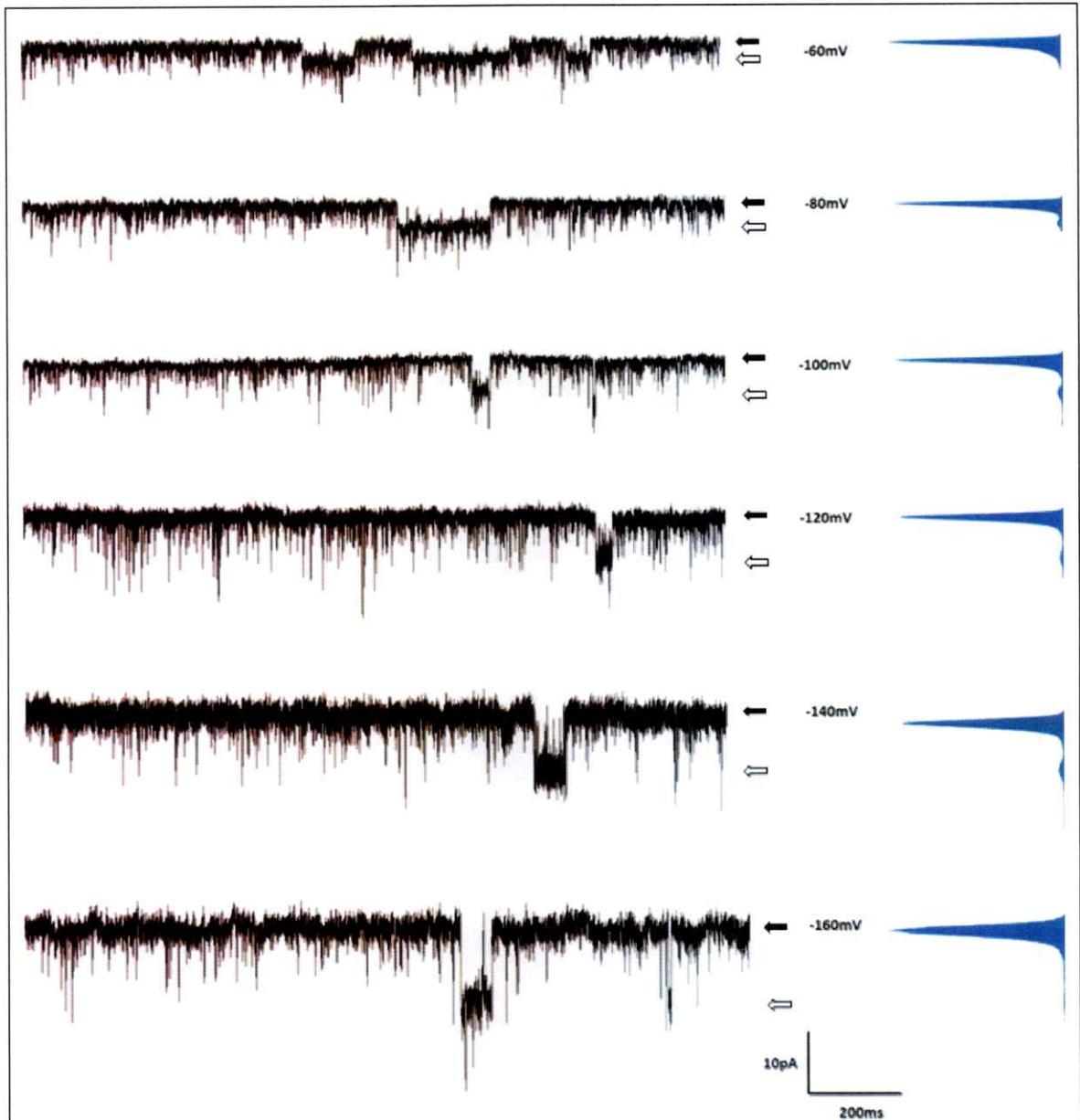


Figura 8. Eventos de canales únicos en parches con muchos canales. Se muestra una fracción de varios registros de corriente con actividad de canales únicos tomados a distintos voltajes. A la derecha de cada registro se muestra el nivel cerrado (flecha negra) y un canal abierto (flecha blanca). También se ilustra el tiempo relativo de cada nivel de corriente con un histograma. El tiempo total del registro fue de entre 5 s a 20 s.

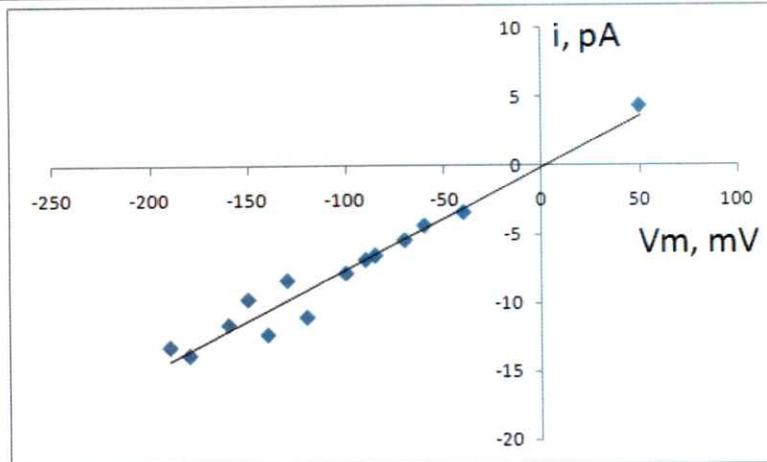


Figura 9. Corriente de eventos unitarios del TRPM8. Se grafica la amplitud de los eventos unitarios en función del voltaje de membrana. Es posible notar que la inversión de corriente ocurre a 0mV. La línea negra corresponde a un ajuste a la ecuación 13, donde $g = 74 \text{ pS}$ y $V_i = 0 \text{ mV}$.

Para el cálculo de P_o , los registros de canales únicos fueron analizados con el detector de eventos de Clampfit 9.2. El programa cuenta un evento cada vez que la corriente pasa por el punto medio entre un nivel de corriente y otro. El programa idealiza los eventos como escalones cuadrados de los distintos niveles de corriente (Figura 10), y puede calcular los tiempos acumulados en cada nivel.

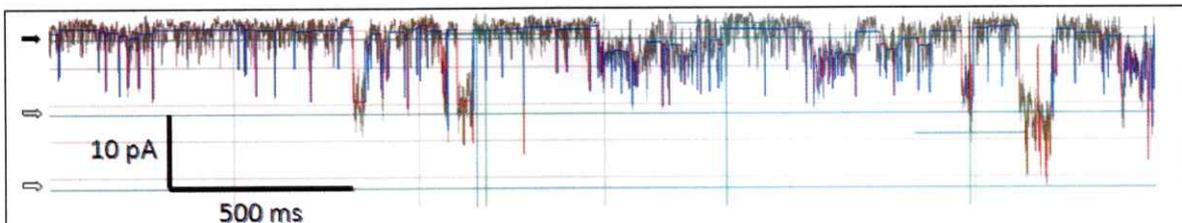


Figura 10. Idealización de niveles abiertos y cerrados. Trazo de corriente con actividad de canales únicos donde se han idealizado los distintos niveles de corriente. Las líneas azules muestran los tres niveles de corriente, uno cerrado (flecha negra) y dos abiertos (flechas blancas). Los trazos rojos y azules muestran las idealizaciones de las transiciones entre niveles de corriente.

Una vez obtenidos los tiempos acumulados de los distintos niveles de corriente, el programa es capaz de calcular P_o usando la función:

$$P_o = \frac{1}{N} \sum k P_k \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde P_k es la fracción de tiempo del registro en que k canales estuvieron abiertos simultáneamente. k es una variable que toma valores enteros positivos $k = 1, 2, 3, \dots, n$, donde n es el máximo número de canales que se abrieron simultáneamente en el registro. En los registros n tomó un valor máximo de 4, y un valor mínimo de 1. N es el número de canales presentes en el parche, obtenido del resultado de análisis de ruido. La Figura 11 muestra los valores de P_o calculada a partir de los registros de canales únicos.

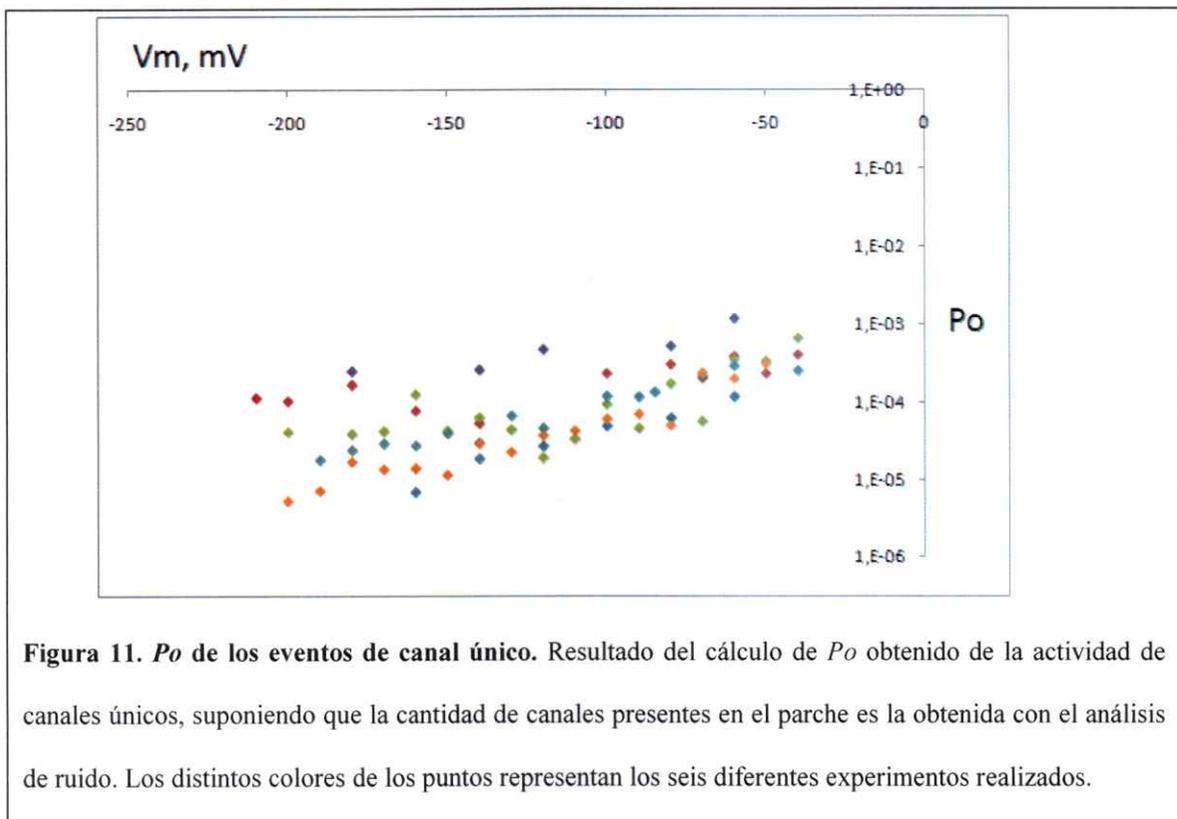


Figura 11. P_o de los eventos de canal único. Resultado del cálculo de P_o obtenido de la actividad de canales únicos, suponiendo que la cantidad de canales presentes en el parche es la obtenida con el análisis de ruido. Los distintos colores de los puntos representan los seis diferentes experimentos realizados.

Dependencia de potencial y modelo de dos estados

Como primera aproximación para el estudio de la dependencia de potencial de TRPM8, se ajustó la P_o calculada de las corrientes macroscópicas a una función de Boltzmann, asociada al modelo de 2 estados, para estimar la cantidad de cargas involucradas en el proceso de activación.

El ajuste de los datos a la función de Boltzmann (Ecuación 3), se llevó a cabo sólo con los trazos de corriente producidos por pulsos mayores o iguales a 50 mV, debido a que el valor de la conductancia promedio calculada a partir de las corrientes macroscópicas contiene errores cada vez más grandes a medida que se acerca al voltaje de inversión de corriente, en este caso 0 mV (Ecuación 10). En este intervalo de voltajes la probabilidad de encontrar el canal abierto cambia varios órdenes de magnitud (Figura 12). Para hacer comparable el peso del ajuste en todo el intervalo de P_o , la minimización se realiza sobre la suma de los cuadrados de la diferencia de logaritmos de P_o , o lo que es lo mismo, la suma de cuadrados del logaritmo de la razón $P_{o_{experimental}}/P_{o_{calculada}}$ (Ecuación 9.1).

En la Figura 12 se observa una curva representativa de P_o en función de V_m calculada de los experimentos de corrientes macroscópicas. Se observa que en el intervalo de voltajes entre 250 mV y 50 mV, la pendiente del logaritmo de P_o toma un valor cada vez mayor tendiendo asintóticamente a un máximo a medida que se disminuye el voltaje de membrana (Figura 12), como lo predice el modelo de dos estados (Ecuación 4). El mejor ajuste se muestra como una línea roja en las curvas P_o vs V_m .

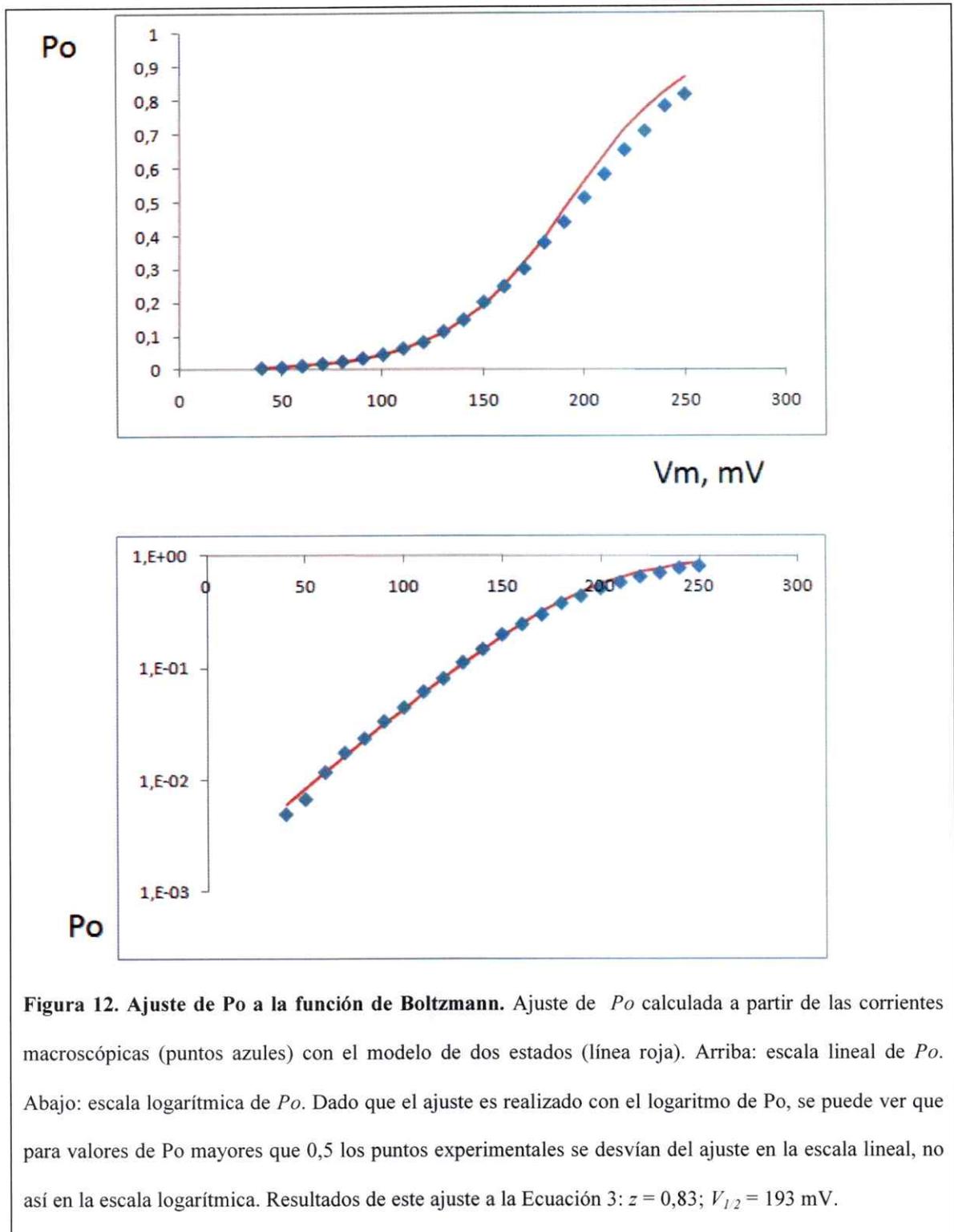


Figura 12. Ajuste de P_o a la función de Boltzmann. Ajuste de P_o calculada a partir de las corrientes macroscópicas (puntos azules) con el modelo de dos estados (línea roja). Arriba: escala lineal de P_o . Abajo: escala logarítmica de P_o . Dado que el ajuste es realizado con el logaritmo de P_o , se puede ver que para valores de P_o mayores que 0,5 los puntos experimentales se desvían del ajuste en la escala lineal, no así en la escala logarítmica. Resultados de este ajuste a la Ecuación 3: $z = 0,83$; $V_{1/2} = 193$ mV.

El valor promedio de z fue de 0.75 ± 0.1 , mientras que el valor de $V_{1/2}$ fue de 190 ± 15 mV, obtenido de seis parches distintos. Los detalles de cada ajuste para los seis experimentos están resumidos en la tabla I. Dado que la temperatura de la habitación fue 20°C , el valor de RT/F usado en los ajustes fue de 25mV. Es destacable que para este tipo de registros no es recomendable hacer un ajuste al promedio normalizado de datos, dado que si se promedian curvas con pendientes con valores de z idénticos, pero con distintos valores de $V_{1/2}$, la curva resultante tiene un valor de z subestimado (Horrigan y cols. 1999).

Exp.	z	V_o , mV
1	0.85	190
2	0.82	209
3	0.83	193
4	0.58	165
5	0.72	197
6	0.72	187
prom.	0.75	190
E.S.	0.10	15

Tabla I. Parámetros obtenidos del ajuste al modelo de dos estados a partir de los valores de P_o obtenidas de corrientes macroscópicas para cada uno de los seis experimentos analizados. Se muestra también el valor promedio y el error estándar de la muestra.

TRPM8 y Ajuste al Modelo Alostérico

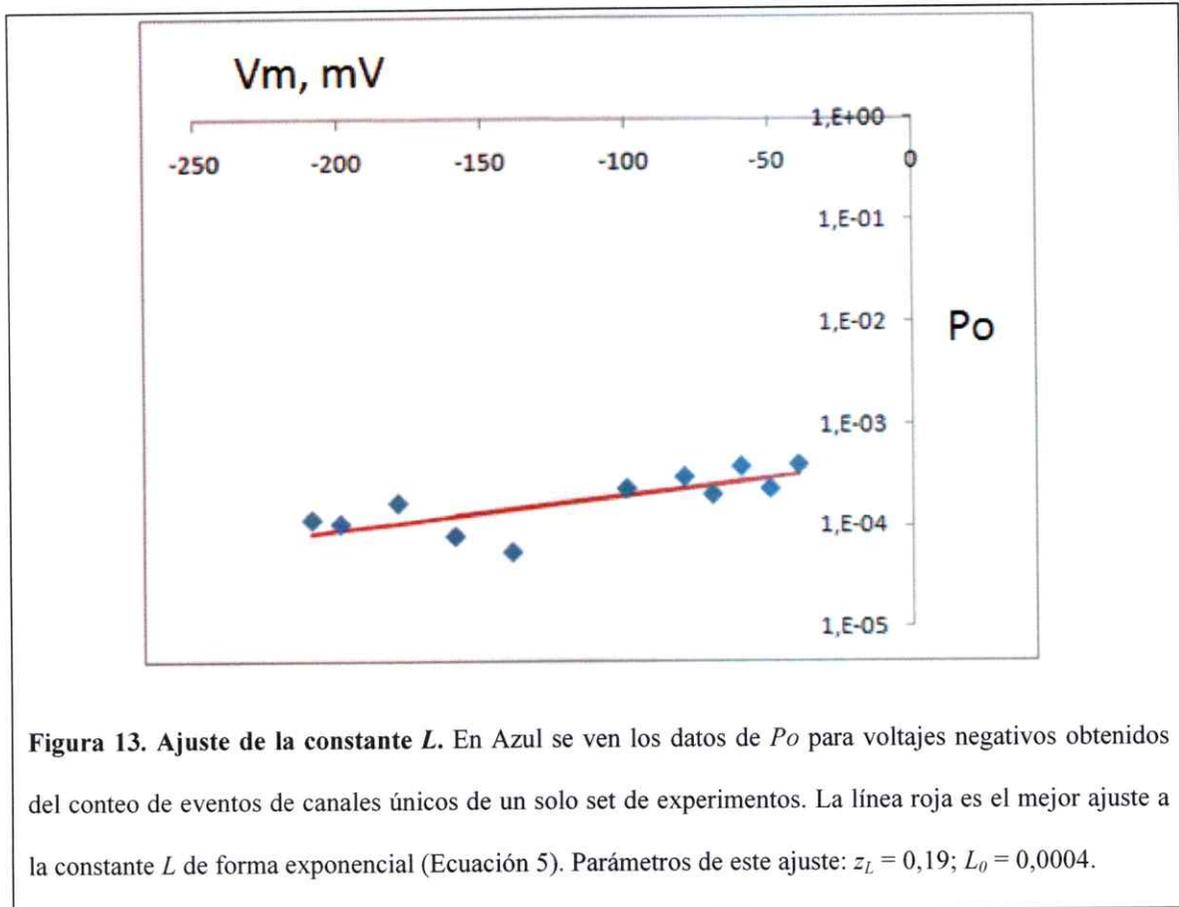
Dado que el modelo alostérico planteado posee 5 parámetros (L_0 , z_L , J_0 , z_J y D), es necesario analizar detalladamente el comportamiento del modelo a lo largo del intervalo de voltaje estudiado. Para poder realizar el ajuste de los parámetros, podemos dividir el intervalo total de voltaje, en intervalos más pequeños donde el modelo teórico tiene comportamientos peculiares, que serán vistos a continuación. La forma de ajustar el modelo es realizando minimizaciones del error para las distintas aproximaciones.

Tal como fue ya mencionado, podemos suponer que la magnitud de JD es menor que 1 para voltajes muy negativos (Ecuación 6) y, dado que definimos D como un número positivo mayor que 1, si $JD < 1$, se cumple que $J \ll 1$. De esta forma podemos ver que el valor de P_0 toma la forma de la Ecuación 8. Como también suponemos que la constante L tiene valores mucho menores que 1, podemos hacer la siguiente aproximación:

$$\lim_{v_m \rightarrow -\infty} P_0 = \frac{1}{1 + L^{-1}} \approx L \quad \text{Ecuación 15}$$

Esto quiere decir que es posible ajustar directamente los parámetros de la constante L (Ecuación 5) con los valores de P_0 para voltajes muy negativos. El procedimiento de ajuste fue el mismo que el utilizado para el ajuste al modelo de dos estados (Ecuación 9.1). Para este caso, se ajustaron los parámetros de la constante L con los valores de P_0 obtenidos del intervalo de voltajes menores que -80 mV (Figura 13), que corresponden a los registros de canales únicos.

Los parámetros z_L y L_0 tomaron valores de $0,26 \pm 0,09$ y $0,00034 \pm 0,00034$ respectivamente. En la Tabla II se resumen los parámetros obtenidos para el ajuste de la constante L .



Por otro lado, para voltajes positivos lo suficientemente grandes, podemos considerar que la magnitud de la constante $J > 1$, y por lo tanto $JD \gg 1$. Para este caso podemos aproximar Po a la siguiente expresión:

$$\lim_{V_m \rightarrow \infty} Po \approx \frac{1}{1 + \frac{J}{LJD}} = \frac{1}{1 + \frac{1}{LD}}$$

Ecuación 16

Dado que L es una constante con una débil dependencia de potencial, suponemos que esta varía poco en el intervalo de voltajes positivos más grandes alcanzados en los experimentos, y por lo tanto el producto LD determina la Po máxima a la cual puede llegar el modelo variando el voltaje. Podemos calcular LD suponiendo que a 250 mV está la mayoría de los sensores de voltaje activados:

$$L_{250mV}D = \frac{Po_{250mV}}{1 - Po_{250mV}} \quad \text{Ecuación 17}$$

Para esto es necesario obtener el valor de L a 250 mV, utilizando los parámetros encontrados en el ajuste anterior (Tabla II). El parámetro D calculado de esta forma tuvo un valor promedio de 2343 ± 3310 .

En el intervalo de voltaje restante, se cumple que $JD > 1$, pero $J < 1$, y podemos aproximar Po a:

$$Po \approx \frac{1}{1 + \frac{1}{LJD}} = \frac{1}{1 + \frac{1}{L_0 J_0 D} e^{-\frac{(z_L + z_J)F}{RT} V_m}} \quad \text{Ecuación 18}$$

Esta función tiene la misma forma que una función de Boltzmann (Ecuación 3), donde la dependencia de potencial z corresponde a la suma de las contribuciones de dependencia de potencial de las constantes L y J , y donde:

$$V_{1/2} = -\frac{RT}{F} \frac{1}{(z_L + z_J)} \ln(L_0 J_0 D)$$

Ecuación 19

Y por lo tanto se puede aproximar los parámetros J_0 y z_J a partir de los parámetros calculados de la constante L y del primer ajuste al modelo de 2 estados. Utilizando este razonamiento, los valores calculados de z_J y J_0 fueron de $0,50 \pm 0,14 e$ y $0,019 \pm 0,022$ respectivamente (Tabla II).

Exp.	L_0	z_L	D^*	z_J^*	J_0^*
1	0,00015	0,31	1700	0,54	0,006
2	0,00040	0,19	1089	0,63	0,002
3	0,00011	0,15	9041	0,68	0,002
4	0,00100	0,20	1143	0,38	0,019
5	0,00020	0,30	661	0,42	0,026
6	0,00018	0,40	426	0,32	0,060
prom.	0,00034	0,26	2343	0,50	0,019
E.S.	0,00034	0,09	3310	0,14	0,022

Tabla II. Parámetros obtenidos del primer método para ajustar al modelo alostérico a partir de los valores de P_0 obtenidas de canales únicos y los parámetros del ajuste a la función de Boltzmann obtenidas de las corrientes macroscópicas (ver Tabla I). Los parámetros marcados con asteriscos (*) corresponden a valores calculados siguiendo el procedimiento descrito en el texto. Se muestra también el valor promedio y el error estándar de la muestra.

Se utilizó también una segunda aproximación para calcular los parámetros z_J , J_0 y D , la cual consistió en dos minimizaciones sucesivas del error cuadrático (Ecuación 9.1). La primera minimización consistió en ajustar solamente los parámetros D y J_0 , dejando los

parámetros z_L , L_0 y z_J fijos. Los valores utilizados para z_L y L_0 fueron los obtenidos anteriormente, mientras que el valor de z_J fue fijado como igual al parámetro z obtenido del ajuste al modelo de dos estados (Tabla I). Una vez realizado este ajuste, se realiza una segunda minimización del error cuadrático dejando los cinco parámetros libres. Es necesario hacer notar que se debe hacer este procedimiento en dos pasos para evitar que el algoritmo utilizado por SOLVER llegue a “mínimos locales”.

Los valores de z_L , L_0 , z_J , J_0 y D se ajustaron respectivamente a: $0,27 \pm 0,12$; $0,00026 \pm 0,00019$; $0,72 \pm 0,08$; $0,014 \pm 0,014$; 1375 ± 1800 . Los valores de este procedimiento de dos pasos están resumidos en la Tabla III. Las magnitudes de los parámetros obtenidos en este segundo ajuste son similares a los obtenidos con el primer método (comparar Tablas II y III). En la Figura 14 se muestra un set de datos con el ajuste al modelo alostérico, así como también dos ajustes al modelo de dos estados (ver más abajo).

Exp.	L_0	z_L	D	z_J	J_0
1	0,00012	0,39	683	0,61	0,012
2	0,00039	0,19	815	0,76	0,002
3	0,00010	0,15	5011	0,83	0,002
4	0,00059	0,15	997	0,78	0,013
5	0,00020	0,32	482	0,66	0,017
6	0,00018	0,41	261	0,68	0,040
prom.	0,00026	0,27	1375	0,72	0,014
E.S.	0,00019	0,12	1800	0,08	0,014

Tabla III. Parámetros obtenidos del segundo método para ajustar al modelo alostérico a partir de los valores de P_0 obtenidas en todo el intervalo de voltajes. Se muestra también el valor promedio y el error estándar de la muestra.

Comparación entre ajustes a los dos modelos propuestos

Para averiguar si efectivamente el modelo alostérico describe mejor el comportamiento de P_o que el modelo de dos estados, se realizó una prueba estadística F , que determina con una cierta confianza si para una misma muestra de datos el ajuste es mejor con una u otra función, con distinto número de parámetros.

Para realizar la comparación, primero se debe realizar un ajuste a un modelo de dos estados con nuevos parámetros que comprenda el intervalo completo de voltaje estudiado (entre -210 mV y 250 mV). Los resultados de este nuevo ajuste se pueden ver en la tabla IV, junto con su respectivo error cuadrático (Ecuación 9.1). La contraparte del modelo alostérico está representada por los parámetros del segundo ajuste realizado (Tabla III). Con ambos ajustes se calcula un valor de F , igual al cambio relativo del error cuadrático dividido por el cambio relativo de los grados de libertad (g.d.l.):

$$F = \frac{(EC1 - EC2) / EC2}{(gdl1 - gdl2) / gdl2} \quad \text{Ecuación 20}$$

Donde $EC1$ representa el error cuadrático del modelo de dos estados y $EC2$ el error cuadrático del modelo alostérico. $gdl1$ y $gdl2$ son los grados de libertad del modelo de dos estados y del modelo alostérico respectivamente, que se calcula como el número de datos experimentales, menos el número de parámetros de cada modelo, menos 1. El valor de F para que estadísticamente el ajuste del modelo alostérico sea mejor que el modelo de dos estados, con una probabilidad de error de 0,01 es de ~ 4.31 (valor obtenido de una tabla F). La Tabla IV muestra que para los seis experimentos el valor de

F calculado es mayor que 4,31 y por lo tanto el ajuste al modelo alostérico es estadísticamente mejor en todos los experimentos realizados.

Exp.	EC1	gdl1	EC2	gdl1	F
1	1,32	34	0,67	31	10
2	15,2	39	2,14	36	73
3	17,2	45	7,18	42	20
4	2,86	33	0,65	30	34
5	4,69	42	1,39	39	31
6	5,48	44	1,58	41	34

Tabla IV. Parámetros estadísticos para determinar si efectivamente el modelo alostérico es mejor que el modelo de dos estados. Esto es cierto con una probabilidad de error menor que 0,01, ya que todos los valores de F calculados son mayores que 4,31.

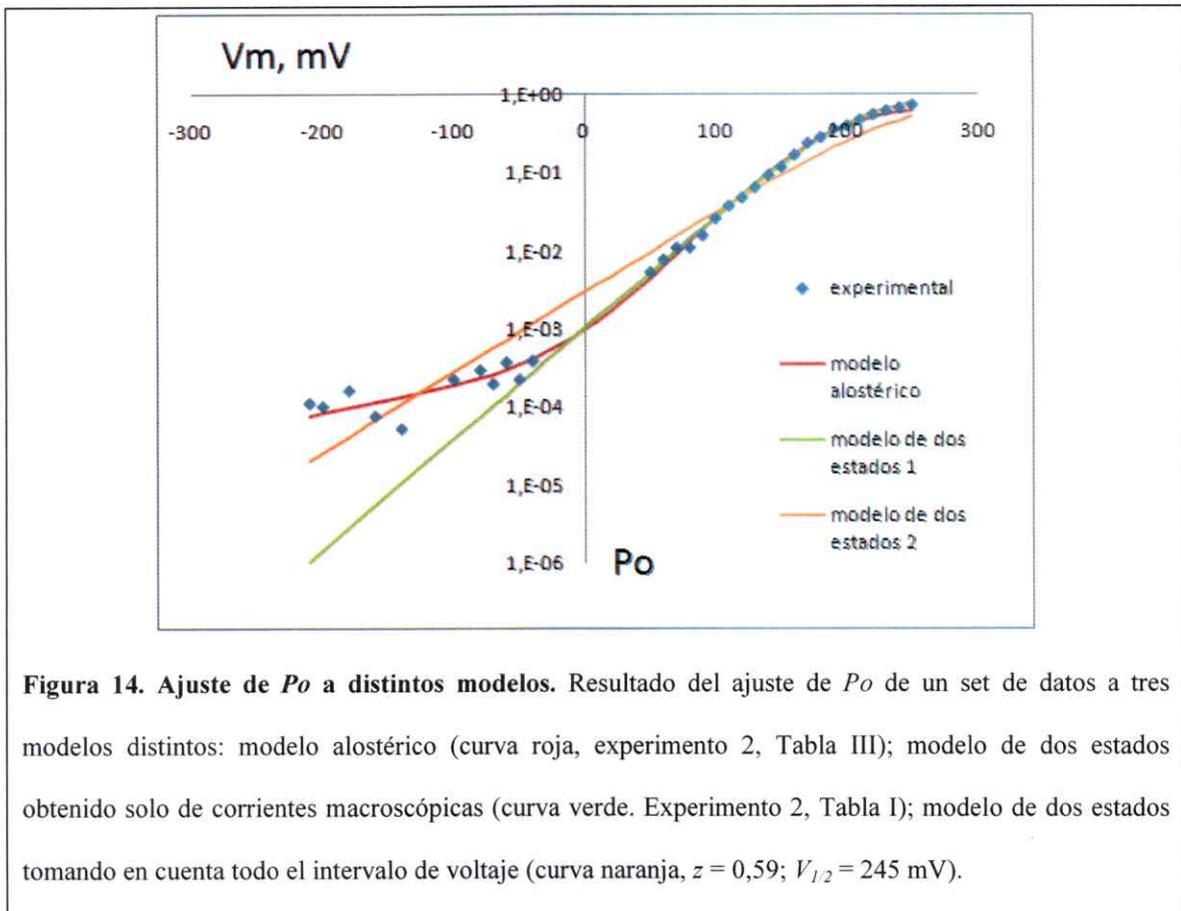


Figura 14. Ajuste de P_o a distintos modelos. Resultado del ajuste de P_o de un set de datos a tres modelos distintos: modelo alostérico (curva roja, experimento 2, Tabla III); modelo de dos estados obtenido solo de corrientes macroscópicas (curva verde. Experimento 2, Tabla I); modelo de dos estados tomando en cuenta todo el intervalo de voltaje (curva naranja, $z = 0,59$; $V_{12} = 245$ mV).

Quiebre de la pendiente de $\ln P_o$ en función del voltaje

Se puede observar en la Figura 14 que un set de datos experimentales son bien descritos por un modelo de dos estados en el intervalo de voltajes mayores que 50 mV (trazo verde), sin embargo para voltajes menores este modelo se aleja de los resultados.

Para el modelo alostérico, la pendiente de $\ln P_o$ con respecto al voltaje para probabilidades pequeñas esta dado por (Apéndice II):

$$\frac{d \ln P_o}{dV_m} \approx \frac{z_L F}{RT} + \frac{z_J F}{RT} \frac{JD}{(JD+1)} - \frac{z_J F}{RT} \frac{J}{(J+1)} \quad \text{Ecuación 21}$$

Como vimos, en el intervalo donde se observa la mayor variación de P_o en función del voltaje, $J < 1$ pero $JD > 1$. Si se observa la Ecuación 21, dado que $JD/(1+JD) \approx 1$ y J es pequeño con respecto a 1 y podemos aproximarla a:

$$\frac{d \ln P_o}{dV_m} \approx \frac{z_L F}{RT} + \frac{z_J F}{RT} (1 - J) \approx \frac{z_L F + z_J F}{RT} \quad \text{Ecuación 22}$$

Esto dice que la dependencia de potencial en el intervalo donde JD es mayor que 1, es la contribución de las 2 dependencias de potencial involucradas, comportándose como un modelo secuencial de activación por potencial (Sigg & Bezanilla, 1997).

Ahora si forzamos al potencial de membrana de manera tal que $JD < 1$, la Ecuación 21 se aproxima a:

$$\frac{d \ln P_o}{dV_m} \approx \frac{z_L F}{RT} \quad \text{Ecuación 23}$$

Es decir que la pendiente tiene ahora un valor menor que en el intervalo anterior. El punto de "quiebre de pendiente" por lo tanto puede ser calculado en el voltaje donde se cumple que $JD = 1$. Este quiebre en la pendiente se puede observar mirando el ajuste al modelo alostérico en la figura 14 (trazo rojo), en este caso el quiebre de pendiente ocurre en $V_m = -14$ mV.

Desviaciones en los parámetros

Se puede observar en las tablas II y III que los parámetros L_0 , J_0 y D tienen una desviación estándar de una magnitud similar al promedio. Puede parecer a primera vista que el modelo alostérico propuesto tiene poco valor, pero es muy importante recalcar que los dos parámetros más importantes en el contexto de este trabajo son las dependencias del potencial z_L y z_J , que tienen una desviación estándar de una magnitud similar a la calculada con el modelo de dos estados. Diferencias en los parámetros L_0 , J_0 y D representan corrimientos de las curvas P_0 en el eje del voltaje, que a su vez dependen de la energía entre estados abiertos y cerrados. Las variaciones de los parámetros de equilibrio L_0 , J_0 y D entre experimentos por lo tanto puede deberse a variables no controladas que influyen en la diferencia de energía entre estados abiertos y cerrados (un ejemplo podría ser la tensión de la membrana). Además podemos recalcar que la relación entre la magnitud de los tres parámetros en cuestión y las energías involucradas es de carácter exponencial, por lo que variaciones pequeñas en las energías involucradas, se ven reflejadas como variaciones mayores en la magnitud de estos parámetros.

El significado del parámetro D

Si nos situamos a voltajes negativos donde la mayoría de los sensores de voltaje están en reposo, P_o está descrita aproximadamente por la Ecuación 15, mientras que si nos situamos en voltajes donde la mayoría de los sensores están activados, P_o se aproxima a la Ecuación 16. Ambas ecuaciones tienen la misma forma, pero la segunda está desplazada hacia la izquierda, puesto que L es una función exponencial y D es una constante (Figura 15).

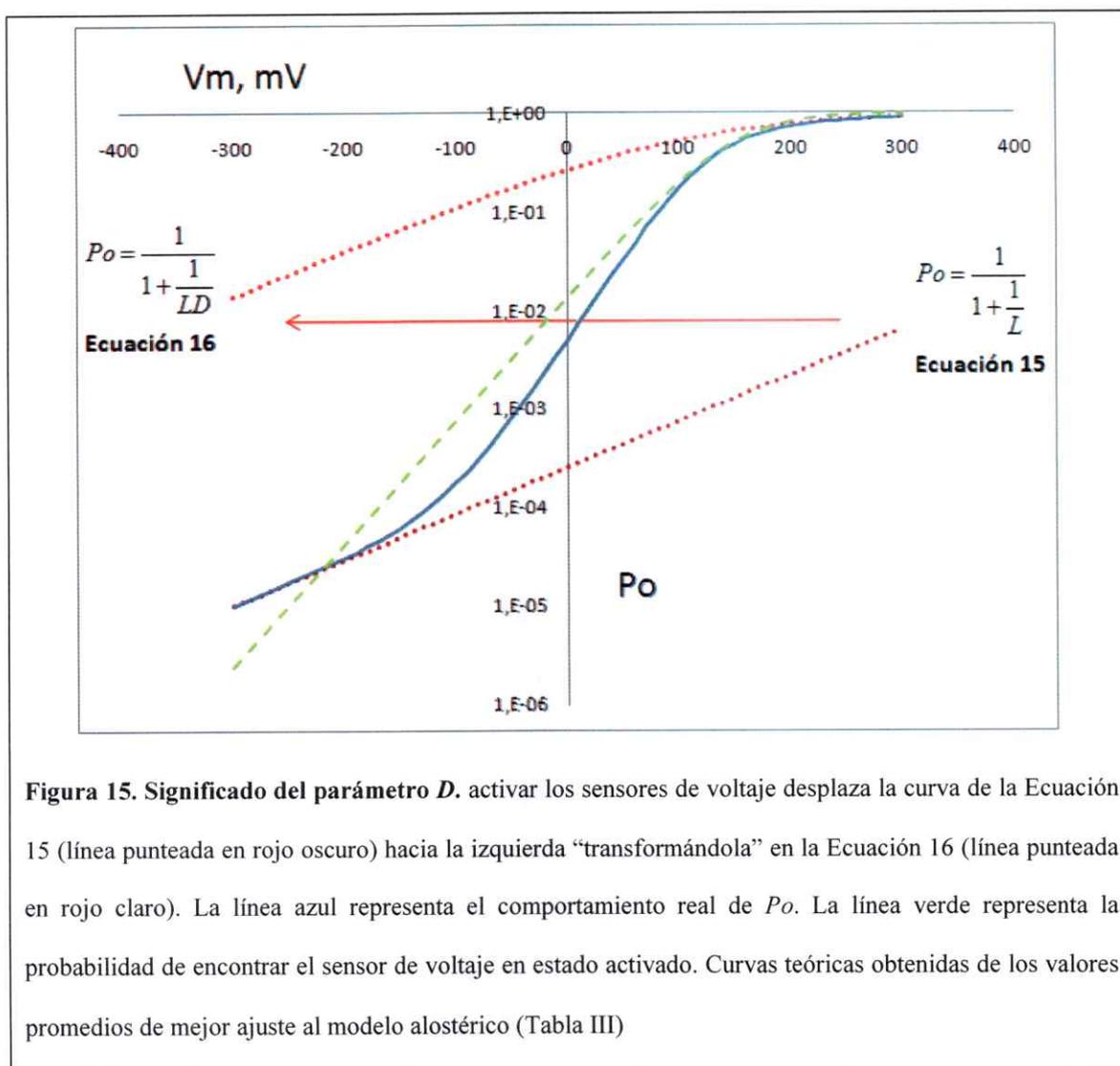


Figura 15. Significado del parámetro D . activar los sensores de voltaje desplaza la curva de la Ecuación 15 (línea punteada en rojo oscuro) hacia la izquierda “transformándola” en la Ecuación 16 (línea punteada en rojo claro). La línea azul representa el comportamiento real de P_o . La línea verde representa la probabilidad de encontrar el sensor de voltaje en estado activado. Curvas teóricas obtenidas de los valores promedios de mejor ajuste al modelo alostérico (Tabla III)

En general, las constantes de equilibrio (por ejemplo L), son funciones exponenciales de la diferencia de energía entre dos estados definidos, y desplazar estas funciones exponenciales supone aportes o pérdidas de energía para el proceso de transición de un estado a otro.

Podemos entender entonces el significado físico del parámetro D como la energía entregada por el sensor de voltaje en estado activado para contribuir a la apertura del poro. El aporte energético es igual a $RT \ln D$, y dado que el valor promedio de D es de 1375 ± 1800 , la cantidad de energía promedio es de $16,7 \pm 2,5$ kJ/mol a 20°C (ó $7,26*RT$).

Es muy importante que este proceso de transducción respete la conservación de energía, es decir que la energía entregada por el sensor según el ajuste, no sea mayor que la energía que realmente puede recolectar. Podemos calcular la energía eléctrica recolectada por el sensor multiplicando la cantidad de carga desplazada ($z_j F$) por la magnitud del intervalo de voltaje donde ocurre la transición. Para el sensor de voltaje con un valor de $z_j = 0,72$, el desplazamiento del 99% de la carga del sensor ocurre en un intervalo de ~ 320 mV, por lo que la energía resultante es de $22,2$ kJ/mol. Este valor es mayor que el aporte calculado del ajuste ($16,7$ kJ/mol) por lo que no se está violando la conservación de energía. Es relevante tener en consideración este punto al momento de realizar los ajustes, pues para los efectos de la minimización, D es un número que podría tomar valores arbitrariamente grandes, especialmente si P_o experimentalmente toma valores cercanos a 1 (Ecuación 16).

Discusión

El TRPM8 ha sido postulado como uno de los actores principales en lo que respecta a sensación de temperaturas bajas en mamíferos. Se ha mostrado que animales knockout para el gen del TRPM8 tienen problemas evitando estímulos térmicos nocivos, de entre 15°C y 5°C (Colburn y cols. 2007).

El hecho de que el TRPM8 sea activado por bajas temperaturas y por despolarización, no es trivial ya que al potencial de reposo la corriente de entrada de cationes, despolariza más aún la membrana activando más este canal, lo que puede ser considerado como un circuito con realimentación positiva, lo que hace que el sistema sea mucho más rápido y por lo tanto, se alcance más rápidamente el umbral del potencial de acción (p- ej., Hodgkin, 1967).

No existen datos cristalográficos de la estructura de los canales TRP, por lo que hasta el momento solo se supone que el sensor de potencial, así como en los canales dependientes de voltaje, sería el segmento S4. El sensor de potencial de los canales dependientes de potencial de la familia Kv, a la cual pertenece uno de los canales de potasio más estudiados, *Shaker*, tiene una secuencia particular donde existen varios residuos positivamente cargados, cada uno separado por dos residuos hidrófobos. Se ha demostrado que esta estructura es altamente especializada, ya que al agregar cargas positivas en posiciones donde naturalmente hay residuos hidrófobos, disminuye la dependencia de potencial (Ahern & Horn. 2004, Gonzalez y cols. 2010). Dado que en los TRP esta estructura especializada no está, es válido pensar que aunque existan algunas cargas en el segmento S4, este supuesto sensor no tenga ninguna funcionalidad.

Sin embargo, la hipótesis que el segmento S4 formaría parte del sensor de potencial fue puesta a prueba mutando la única carga positiva existente en el S4 del TRPM8 y otros 4 residuos en el lazo que une el segmento S4 con el S5. Se hallaron dos cargas que modificaron aparentemente la dependencia de potencial: R842 y R856. Estas cargas, R842 y R856, redujeron la dependencia de potencial en 0,2 *e* y 0,3 *e* respectivamente, de un total calculado de 0,9 *e*. (Voets y cols. 2007). La metodología utilizada en ese estudio para calcular la dependencia de potencial, fue el cálculo de la pendiente límite a partir de 5 rampas de voltaje promediadas. Sin embargo, esta metodología puede ser cuestionable para P_o muy bajas debido a la gran dispersión de los puntos introducida por el ruido instrumental. Además se sabe que el cálculo de la dependencia total de potencial con el uso de la pendiente límite es dependiente del modelo, ya que para ciertos modelos de activación por potencial se subestima o sobreestima el número de cargas involucradas (Sigg & Bezanilla, 1997).

Los datos obtenidos en esta memoria muestran un quiebre en la curva de $\ln P_o$ en función del potencial de membrana, lo que evidencia que existen transiciones que son muy poco dependientes de potencial, y apuntaría a que existe un acople de tipo alostérico entre el sensor de potencial y la apertura compuerta que impide el paso de los iones a través del poro del canal.

Los datos aquí presentados, junto a otros antecedentes bibliográficos mencionados anteriormente, sustentan que el TRPM8 efectivamente posee un mecanismo de activación alostérico. Este hecho podría explicar un aparente cambio de dependencia de potencial en los experimentos donde se neutralizaron las cargas del segmento S4, R842 y R856, del TRPM8. Esta explicación se basa en que en un modelo alostérico en que se

altera el equilibrio de del sensor de potencial J_0 sin alterar el valor de z_j , se produce una aparente disminución del parámetro z si se ajusta a una función de Boltzmann (Ecuación 3). Esto se ha observado antes para el canal de potasio activado por calcio BK, donde la mutación R207Q produce este desplazamiento del equilibrio en J_0 (Horrigan y cols. 1999).

Lo anterior podría indicar que las cargas del segmento S4 no son las que efectivamente son transportadas en el proceso de activación. Desafortunadamente la única forma de comprobar si esta hipótesis es correcta, es medir "gating currents" y construir curvas Q/V (Aggarwal & MacKinnon, 1996), lo que podría ser infructuoso dado que se requeriría de una expresión muy profusa para obtener una buena relación señal/ruido.

Por otro lado, una dependencia de potencial tan débil podría sugerir que las cargas involucradas, que son al menos 4 suponiendo que las subunidades del tetrámero son equivalentes, recorren menos de un cuarto del campo eléctrico. Podríamos proponer la hipótesis que en el TRPM8 no ocurren los grandes rearrreglos conformacionales (traslaciones, giros o cambios de inclinación) de las hélices de los segmentos de transmembrana que forman el sensor de potencial y que se han propuesto en el caso de los canales de K^+ dependientes de potencial (Bezanilla, 2002; Tombola y cols. 2005; Long y cols. 2007; Chanda & Bezanilla, 2008). De hecho, se ha encontrado que una dependencia de potencial tan débil como la del TRPM8, presente en el canal de potasio KcsA, es consecuencia de un residuo de glutamato presente en la hélice del poro (E71) que es capaz de sensar el potencial eléctrico, y que si este residuo es neutralizado, la dependencia de potencial (z) cae desde 0,72 hasta 0,052 (Cordero-Morales y cols. 2006).

Además, recientemente se ha reportado que en el TRPV1, otro canal termosensible que se activa con altas temperaturas y que también presenta una débil dependencia de potencial, tiene una constricción importante en el lado extracelular del vestíbulo que existe en la vía de paso de los iones al interior del canal. Se cree que esta constricción es lo suficientemente estrecha para comportarse como la compuerta de activación que permite al canal estar abierto o cerrado (Salazar y cols. 2008), a diferencia de los canales de potasio que tienen su compuerta en el extremo intracelular de dicho vestíbulo, formado por el entrecruzamiento de los extremos intracelulares de las hélices S6 (Doyle y cols. 1998, Long y cols. 2005).

Este hecho no es trivial ya que se propone que el acople electromecánico que existe entre el sensor de potencial de los canales de potasio dependientes de potencial y la compuerta de activación, es posible gracias a interacciones que se forman entre el *loop* S4-S5 y una parte de la hélice S6, por lo que el segmento S4 estaría íntimamente ligado a la compuerta de activación por intermedio de este *loop*. Además la misma hélice S6 tiene en medio de su estructura una secuencia *PXP* (Long y cols. 2005) o una glicina (Jiang y cols. 2002) que actúa en forma de bisagra y que permitiría separar los extremos intracelulares de las hélices S6, abriendo la compuerta de activación en los canales de potasio. En el TRPM8 no existe tal secuencia *PVP* o glicina en la hélice S6 y se ha demostrado que la constricción del poro formado por los extremos de las hélices S6 es lo suficientemente amplia como para que iones puedan permear a través de esta (Salazar y cols. 2008).

Todos estos antecedentes permiten pensar que el sensor de potencial, la compuerta de activación y la estructura que realiza el acople electromecánico en el TRPM8 podrían

involucrar estructuras totalmente distintas a las postuladas para los canales de potasio dependientes de potencial, lo que a su vez podría explicar los cambios aparentes de dependencia de potencial encontrados en las mutaciones del segmento S4 del TRPM8 como desplazamientos de equilibrio de las constantes involucradas sin cambio en la carga total transportada a través del campo eléctrico desarrollado en la membrana celular, sobre la base del modelo alostérico propuesto anteriormente.

Los resultados obtenidos en la presente memoria apoyan fuertemente el modelo alostérico de activación por potencial eléctrico ya que muestran comportamientos que no pueden ser explicados de otra manera a lo largo del intervalo de potenciales estudiados.

Para poder explicar más detalladamente cómo es el proceso de activación por potencial en el TRPM8 es necesario realizar estudios que revelen donde se encuentra realmente el sensor de potencial, cual es la compuerta que abre o cierra el canal y qué clase de estructura realiza el acople entre estas dos partes. Es de esperar que si se obtiene en el futuro esta información sea posible también hacer alguna aproximación para explicar mejor la inusual dependencia de temperatura que tiene este canal, suponiendo que ambos estímulos (eléctrico y térmico), actúan de alguna forma similar sobre la compuerta que abre el canal, pero a través de vías estructuralmente distintas, dada la naturaleza de tipo alostérica del acople entre sensores y compuerta.

Apéndice I

Análisis de ruido no estacionario

El análisis de ruido es utilizado para calcular la cantidad de canales presentes en la membrana del parche. Se basa en el ruido de la señal de corriente producido por la apertura y cierre aleatorios de los canales presentes en el parche durante un registro.

Llamaremos p a la probabilidad de encontrar un canal abierto, y q a la probabilidad de encontrarlo cerrado. En general un canal tiene 2 estados conductivos: está abierto o está cerrado, por lo tanto:

$$(p + q) = 1$$

La corriente promedio que pasa por el canal durante un intervalo de tiempo es la corriente unitaria del canal, multiplicada por la probabilidad de encontrar abierto este canal:

$$I = pi$$

Donde i es la corriente unitaria del canal.

La varianza de la corriente (σ^2) es el promedio de las desviaciones cuadráticas respecto de la corriente promedio. Esto se calcula como la desviación cuadrática del estado abierto respecto del promedio, $(pi-i)^2$, multiplicada por la probabilidad del estado abierto, más la desviación cuadrática del estado cerrado respecto del promedio, $(ip-0)^2$, multiplicada por la probabilidad del estado cerrado:

$$\sigma^2 = p(ip - i)^2 + q(ip - 0)^2 = p(-iq)^2 + q(ip)^2 = i^2(pq^2 + qp^2) = i^2(pq(q + p)) = i^2pq$$

Para una membrana que tiene N canales, la corriente promedio y varianza respectivamente son:

$$I = Npi$$

$$\sigma^2 = Ni^2pq = Ni^2p(1-p) = Ni^2p - Ni^2p^2 = iNpi - N(ip)^2 = iI - I^2/N$$

De esta forma obtenemos una expresión que nos permite obtener la corriente unitaria del canal i y la cantidad de canales presentes en la membrana N , analizando la varianza de la corriente en función de la corriente promedio. Podemos observar que para varios valores de corriente promedio la varianza de la corriente describe una parábola, de modo que los parámetros buscados pueden obtenerse ajustando los datos a una parábola de la forma:

$$I = Ax^2 + Bx + C$$

Donde se observa fácilmente que $B = i$, $A = -I/N$ y C corresponde a la varianza con corriente unitaria iguala 0, es decir debido al ruido instrumental.

Esta teoría expuesta es válida para cualquier canal, no importando la cantidad de estados abiertos o cerrados que este tenga, siempre y cuando los estados abiertos tengan **la misma conductancia** (es decir que no existan subniveles de conductancia).

Para realizar análisis de ruido en membranas con muchos canales dependientes de potencial es necesario tener un parche que tenga corrientes macroscópicas. Se inicia el pulso con un potencial tal que los canales estén cerrados, y luego se da un pulso despolarizante donde se obtengan probabilidades de canal abierto lo más altas posibles, luego de llegar a un nivel estacionario de corriente se repite el pulso muchas veces.

Los registros de corriente macroscópica obtenidos son analizados por isócronas, es decir dado un cierto tiempo en cada trazo de corriente se recolectan los valores de la corriente de cada registro y se obtienen los valores de promedio y varianza de corriente para ese tiempo. Los resultados son ajustados una parábola de la forma $Ax^2 + Bx + C$. Para que el ajuste sea confiable, los resultados deben formar un máximo global, de manera de estimar correctamente el número de canales. (Alvarez y cols. 2002).

Apéndice II

Aproximación de la pendiente de $\ln(P_o)$ para el modelo alostérico a probabilidades bajas.

Teniendo en cuenta la ecuación 7:

$$P_o = \frac{1}{1 + \frac{(1+J)}{L(1+JD)}} = \frac{1}{1+A}$$

Si $P_o < 0.1$, entonces $A > 9$. Por lo tanto podremos suponer que $A+1 \approx A$, y por lo tanto:

$$P_o = \frac{1}{1+A} \approx \frac{1}{A} = \frac{L(1+JD)}{(1+J)}$$

Ahora tomamos logaritmos a ambos lados y derivamos respecto a V:

$$\frac{d}{dV} (\ln P_o) = \frac{d}{dV} \left(\ln \frac{L(1+JD)}{(1+J)} \right)$$

Aplicando la regla de la cadena:

$$\frac{d}{dV} (\ln P_o) = \frac{(1+J)}{L(1+JD)} \frac{d}{dV} \left(\frac{L(1+JD)}{(1+J)} \right)$$

Ahora aplicamos la regla del producto para diferenciar:

$$\frac{d}{dV} (\ln P_o) = \frac{(1+J)}{L(1+JD)} \left(\frac{(1+JD)}{(1+J)} \frac{dL}{dV} + L \frac{d}{dV} \left(\frac{(1+JD)}{(1+J)} \right) \right)$$

Podemos simplificar el primer término, y diferenciar el segundo con la regla del cociente:

$$\frac{d}{dV}(\ln Po) = \frac{1}{L} \frac{dL}{dV} + \frac{(1+J)}{(1+JD)} \frac{1}{(1+J)^2} \left((1+J) \frac{d}{dV}(1+JD) - (1+JD) \frac{d}{dV}(1+J) \right)$$

$$\frac{d}{dV}(\ln Po) = \frac{1}{L} \frac{dL}{dV} + \frac{(1+J)}{(1+JD)} \frac{1}{(1+J)^2} \left((1+J)D \frac{dJ}{dV} - (1+JD) \frac{dJ}{dV} \right)$$

$$\frac{d}{dV}(\ln Po) = \frac{1}{L} \frac{dL}{dV} + \frac{1}{(1+JD)} \frac{1}{(1+J)} \left((1+J)D \frac{dJ}{dV} - (1+JD) \frac{dJ}{dV} \right)$$

$$\frac{d}{dV}(\ln Po) = \frac{1}{L} \frac{dL}{dV} + \frac{D}{(1+JD)} \frac{dJ}{dV} - \frac{1}{(1+J)} \frac{dJ}{dV}$$

Dado que L y J son funciones exponenciales del voltaje, tenemos que:

$$\frac{dL}{dV} = \frac{d}{dV} \left(L_0 e^{\frac{z_L F V}{RT}} \right) = \frac{z_L F}{RT} L_0 e^{\frac{z_L F V}{RT}} = \frac{z_L F}{RT} L$$

$$\frac{dJ}{dV} = \frac{d}{dV} \left(J_0 e^{\frac{z_J F V}{RT}} \right) = \frac{z_J F}{RT} J_0 e^{\frac{z_J F V}{RT}} = \frac{z_J F}{RT} J$$

Tenemos finalmente que:

$$\frac{d}{dV} (\ln P_0) = \frac{z_L F}{RT} + \frac{z_J F}{RT} \frac{JD}{(1+JD)} - \frac{z_J F}{RT} \frac{J}{(1+J)}$$

Bibliografía

Aggarwal S. & MacKinnon R. 1996. Contribution of the S4 segment to gating charge in the shaker K⁺ channel. *Neuron*. 16: 1169-1177

Ahern C. & Horn R. 2004. Specificity of charge-carrying residues in the voltage sensor of potassium channels. *J. Gen Physiol*. 123: 205-216.

Alvarez O., Gonzales C. & Latorre R. 2002. Counting channels: a tutorial guide on ion channel fluctuation analysis. *Advan. Physiol. Educ.* 26: 327-341

Armstrong C. & Bezanilla F. 1974. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the sodium channels. *J. Gen. Physiol*. 63: 533-552.

Bezanilla F. 2002. Voltage Sensor Movements. *J. Gen. Physiol*. 120: 465-473

Brauchi S., Orio P. & Latorre R. 2004. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *PNAS*. 101: 15494-15499.

Cordero-Morales J., Cuello L. & Perozo E. 2006. Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nat. Struct. & Mol Biol*. 13: 319-322.

Chanda B. & Bezanilla F. 2008. A common pathway for charge transport through voltage-sensing domains. *Neuron*. 57: 345-351

Colburn R., Lubin M., Stone D., Wang Y., Lawrence D., D'andrea M., Brandt M., Liu Y., Flores C. & Qin N. 2007. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*. 54; 379-386.

Doyle D., Cabral J., Pfuetzner R., Kuo A., Gulbis J., Cohen S., Chait B. & MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. 280: 69-77.

Gonzalez V., Stack K., Boric K. & Naranjo D. 2010. Reduced voltage sensitivity in a K⁺ channel voltage sensor by electric field remodelling. *PNAS*. 107: 5178-5183

Hamill O., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 391: 85-100.

Hille B. 1992. Classical biophysics of the squid giant axon. Ionic channels of excitable membranes 2nd ed. Sinauer. pp 23-58.

Hodgkin A. 1967. The nature of the permeability changes and calculation of the action potential. The conduction of nervous impulse. Liverpool University Press. pp 56-70.

Horrigan F., Cui J., & Aldrich R. 1999. Allosteric Voltage Gating of Potassium Channels I: mSlo Ionic Currents on the Absence of Ca²⁺. *J. Gen. Physiol*. 114: 277-304

Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B. & MacKinnon R. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*. 417: 523-526

Latorre R., Brauchi S., Orta G., Zaelzer C. & Vargas G. 2007. Thermo TRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium*. 42: 427–438

Long S., Campbell E. & MacKinnon R. 2005. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science*. 309: 903-908

Long S., Tao X., Campbell E. & MacKinnon R. 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*. 450: 376-382

Matta J. & Ahern G. 2007. Voltage is a Partial Activator of Rat Thermosensitive TRP Channels. *J. Physiol*. 585: 469-482.

McKemy D., Neuhauser W. & Julius D. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 416: 52-58.

Minke, B. & Cook, B. 2002. TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol. Rev.* 82: 429-473

Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi T, Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Raftery M.A., Hirose T., Inayama, S. & Hayashida H., Miyata T., & Numa S. 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*. 312: 121–127.

Salazar H., Jara-Oseguera A., Hernandez-García E., Lorente I., Arias-Olguin I., Soriano-Garcia M., Islas L. & Rosenbaum T. 2008. Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. *Nat. Struct & Mol. Biol.* 16: 704-710.

Sigg D. & Bezanilla F. 1997. Total charge movement per channel, the relation between gating charge displacement and the voltage sensitivity of activation. *J. Gen. Physiol.* 109: 27-39.

Seoh S., Sigg D., Papazian D. & Bezanilla F. 1996. Voltage sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron.* 16: 1159-1167.

Tombola F., Pathak M. & Isacoff E. 2005. How far will you go to sense voltage?. *Neuron.* 48: 719-725.

Voets, T. Owsianik, G. Janssens, A. Talavera, K & Nilius, B. 2007. TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat. Chem. Biol.* 3: 174-182.