

CIRCULACIÓN RENAL EN UN MODELO MURINO DE HIPERTENSIÓN ESENCIAL

Universidad de Valladolid

Instituto de Biología y Genética Molecular

Máster en Investigación Biomédica

Memoria de Trabajo Fin de Máster

Jorge Rojo Mencía

Director de trabajo: **José Ramón López López**

Valladolid, Septiembre de 2019.



Índice

Glosario de Abreviaturas	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Hipertensión	3
1.2. Presión Arterial	4
1.3. Regulación del tono vascular.....	5
1.4. Canales iónicos	7
1.5. Familia TRP	8
1.6. TRPM3	10
1.7. Modelo de estudio	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
3.1. Diseño del equipo de medida de flujo renal <i>ex vivo</i>	14
3.2. Diseño experimental.....	17
3.3. Extracción de RNA y PCR cuantitativa	18
3.4. Análisis de los datos de flujo	19
3.5. Análisis estadístico	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Expresión de TRPM3 en riñón.....	20
4.2. Curvas Dosis-Respuesta frente a Phe y Ang II	21
4.3. Activación de TRPM3 mediante PS.....	23
5. DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIONES	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28

Glosario de Abreviaturas

- **ACE**: enzima convertidora de angiotensina (“Angiotensin-Converting Enzyme”).
- **Ang II**: angiotensina II.
- **BPH**: cepa de ratones hipertensos (“Blood-Pressure High”).
- **BPN**: cepa control de ratones normotensos (“Blood-Pressure Normal”).
- **GPCR**: receptor acoplado a proteínas G (“G-Protein Coupled Receptor”).
- **KO**: gen inactivado (“Knock-Out.”).
- **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa (“Polymerase Chain Reaction”).
- **Phe**: fenilefrina (“phenylephrine”).
- **PS**: sulfato de pregnenolona (“Pregnenolone Sulfate”).
- **RAAS**: sistema renina-angiotensina-aldosterona (“Renin-Angiotensin-Aldosterone System”).
- **RT-qPCR**: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (“quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”).
- **TRP**: receptor de potencial transitorio (“Transient Receptor Potential”).
- **TRPM3**: receptor de potencial transitorio tipo melastina 3 (“Transient Receptor Potential Melastin-like 3”).
- **VDCC**: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (“Voltage-Dependent Calcium Channels”).
- **VSMC**: células de músculo liso vascular (“Vascular Smooth Muscle Cells”).
- **WT**: genotipo salvaje (“Wild Type”).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hipertensión

La hipertensión o presión arterial elevada es el principal factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares, que causan unos 17 millones de muertes al año, aproximadamente un tercio de las muertes totales en el mundo. De éstas, 9.4 millones son debidas directamente a complicaciones derivadas de la hipertensión, siendo la principal causa en el 45% de las cardiopatías y el 51% de los accidentes cerebrovasculares (OMS, 2013).

De media, el 40% de los adultos mayores de 25 años es diagnosticado de hipertensión en todo el mundo, afectando en mayor medida a hombres que mujeres (Figura 1). Si bien la prevalencia de la enfermedad está siendo controlada y reducida en los países más desarrollados gracias al seguimiento de los pacientes, el uso de medicamentos y a la concienciación en el estilo de vida, en países de ingresos medios y bajos este número está en aumento junto con el incremento de la población y la adquisición de hábitos de vida no saludables (sedentarismo, mala alimentación, tabaquismo y consumo de alcohol) (OMS, 2013).

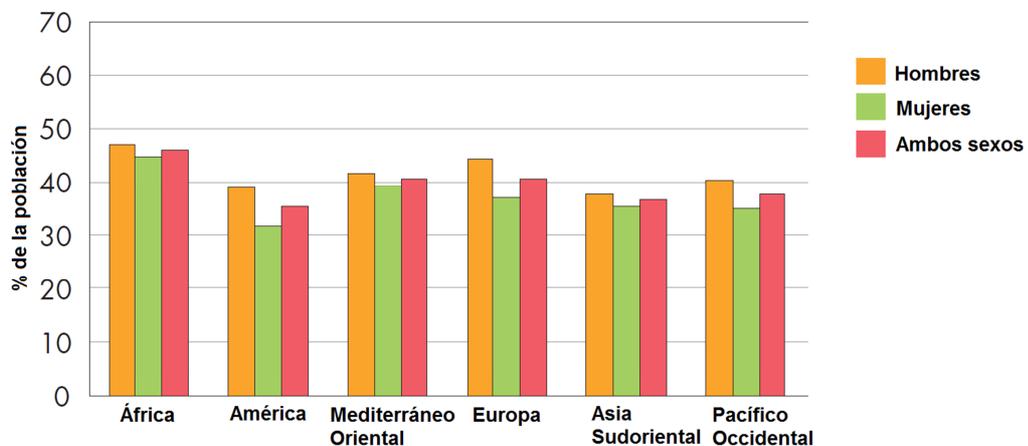


Figura 1. Prevalencia de la hipertensión en adultos mayores de 25 años, estandarizado por edades, según regiones de la Organización Mundial de la Salud. (Modificado de OMS, 2010).

La tensión arterial se valora mediante la medida de dos parámetros, la presión arterial sistólica y presión arterial diastólica. Se considera tensión arterial normal en un adulto a una presión sistólica de 120 mmHg y una presión diastólica de 80 mmHg. Valores por encima de 140 y 90 mmHg respectivamente son calificados como hipertensión.

La hipertensión se clasifica en primaria o esencial, que incluye al 90% de los casos, y secundaria, donde encontramos el 10% restante. La hipertensión esencial aparece a

mediana y avanzada edad, es asintomática y no está provocada por una patología determinada, sino por la combinación de factores genéticos y ambientales, como obesidad, sedentarismo, alcoholismo, consumo excesivo de sal y otros hábitos de vida no saludables (Poulter *et al.*, 2015; Álvarez Miguel, 2019). En contraste, la hipertensión secundaria aparece normalmente antes de los 40 años, sin antecedentes familiares, y es desencadenada por una patología identificable, como un desorden renal o endocrino o el uso de determinados fármacos (Poulter *et al.*, 2015).

1.2. Presión arterial

Fisiológicamente es más útil emplear los conceptos de presión arterial media y presión de pulso. La presión de pulso (P_P) es la diferencia entre la presión arterial sistólica (P_S) y la presión arterial diastólica (P_D), es decir, la variación de presión que experimenta la arteria durante el ciclo cardíaco. Debido que la diástole ocupa una mayor parte del ciclo cardíaco la presión arterial media (\overline{PA}) se calcula como la suma de la presión diastólica y un tercio de la presión de pulso:

$$P_P = P_S - P_D$$

$$\overline{PA} = P_D + P_P/3$$

La presión arterial media es directamente proporcional al flujo o gasto cardíaco (GC) y a la suma de las resistencias periféricas (RPT):

$$\overline{PA} = GC \times RPT$$

En la hipertensión esencial el gasto cardíaco se mantiene normal, siendo ocasionada por un aumento en las resistencias periféricas, que dependen principalmente del estado contráctil de los vasos.

Los vasos de resistencia, pequeñas arterias y arteriolas con un diámetro inferior a 300 μm , son las encargadas de regular el flujo (Q) y la presión (ΔP) que llega a cada órgano mediante la regulación de la resistencia vascular (R) (**Ley de Darcy**):

$$Q = \frac{\Delta P}{R}$$

Este control se consigue mediante la variación de su diámetro a través de la contracción o relajación de su capa media muscular, ya que de acuerdo con la **Ley de**

Poiseuille, la resistencia del vaso es inversamente proporcional al radio de éste elevado a la cuarta potencia (Touyz *et al.*, 2018).

$$\text{Resistencia} = \frac{8 L \eta}{\pi r^4}$$

L: longitud; η : viscosidad; r: radio.

De esta forma, pequeños cambios en el lumen o diámetro del vaso provocan grandes modificaciones en la resistencia y por lo tanto en el flujo que llega a un determinado órgano, regulando así el flujo sanguíneo según los requerimientos del organismo de cada momento.

1.3. Regulación del tono vascular

El mantenimiento del estado de contracción (tono vascular) adecuado por parte de las células del músculo liso vascular (VSMCs) es un proceso altamente regulado por multitud de factores extrínsecos e intrínsecos. Estos procesos son dependientes de la entrada de calcio al citosol por medio de la apertura de canales de Ca^{2+} regulada por cascadas de señalización intracelulares (Te Riet *et al.*, 2015; Touyz *et al.*, 2018; Liu y Khalil, 2018). La activación de estas vías comienza por la unión de un agonista a su receptor de membrana, un receptor acoplado a proteínas G (GPCRs). La activación de estos GPCRs libera la subunidad α de la proteína G_q y ésta activa la fosfolipasa C (PLC), que convierte fosfatidil inositol (PI) en inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). IP_3 se une a sus receptores en el retículo sarcoplásmico produciendo la liberación de calcio desde este compartimento intracelular al citosol. El DAG activa la proteína quinasa C (PKC), la cual fosforila una serie de proteínas que participan directa o indirectamente en la contracción muscular induciendo la despolarización de la membrana de las VSMCs a través del cambio en el estado de apertura de diversos canales iónicos. El cierre de canales de K^+ induce la despolarización de la membrana, lo cual es sentido por canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (VDCCs) provocando su apertura e incrementando la concentración de Ca^{2+} citosólico, promoviendo la contracción de las células de músculo liso y con ello el incremento de la resistencia vascular y de la presión sanguínea (Figura 2) (Nilius *et al.*, 2007; Chen y Coffman 2015; Patel *et al.*, 2017).

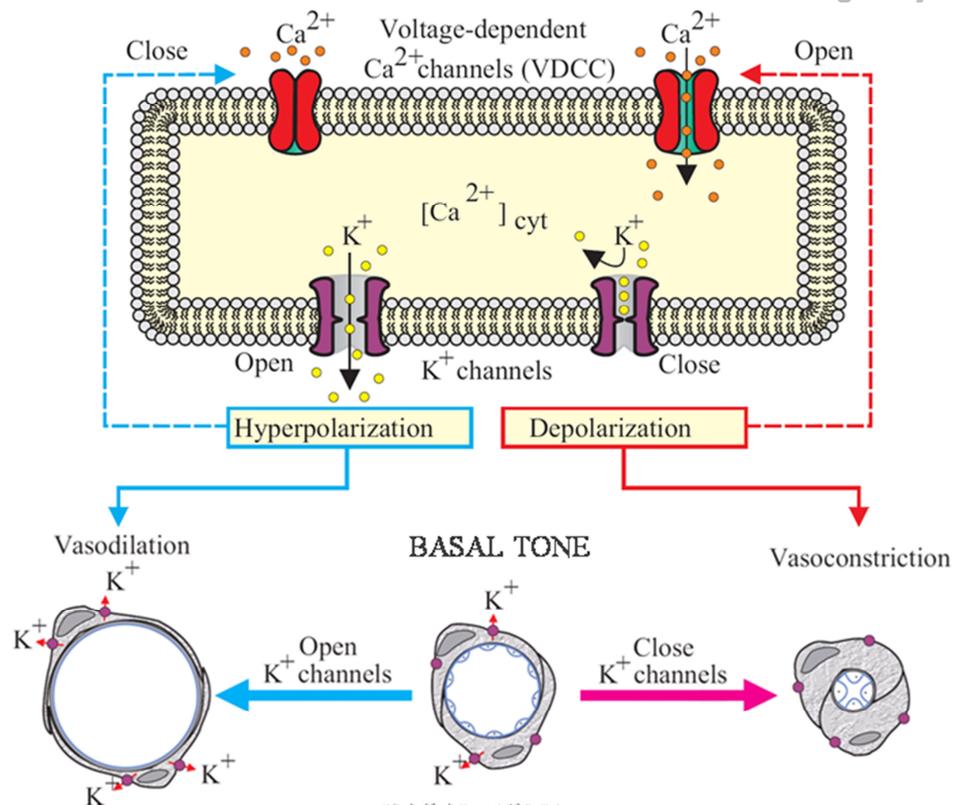


Figura 2. Regulación del tono vascular en función del estado hiperpolarizado/despolarizado de la membrana celular. El cierre de canales de K^+ produce la despolarización que activa la entrada de Ca^{2+} al citosol a través de canales de calcio dependientes de voltaje promoviendo la contracción del vaso. (Modificada de Jackson, 2000).

Dos de los importantes mecanismos (extrínsecos) de activación de estas vías son el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y el sistema nervioso simpático.

El sistema RAAS juega un papel primordial en la regulación de la presión sanguínea regulando el tono vascular y el nivel de líquido extracelular en el organismo. Una caída en la presión arterial, bajos niveles de sodio y la actividad del sistema nervioso simpático vía activación de receptores β_1 adrenérgicos promueven la síntesis y liberación de renina por las células granulares del riñón. La renina hidroliza la proteína α -2-globulina o angiotensinógeno, liberada por el hígado, formando angiotensina I, que viaja por el torrente sanguíneo hasta tejidos diana como los capilares pulmonares o células epiteliales renales y es captada por la enzima convertidora de angiotensina (ACE, "Angiotensin-Converting Enzyme"). ACE se encuentra anclada a la membrana de las células endoteliales de los vasos sanguíneos y actúa eliminando dos aminoácidos carboxilo-terminales del precursor de 10 aminoácidos angiotensina I y liberando el octapéptido funcional, la angiotensina II (Patel *et al.*, 2017) (Figura 3).

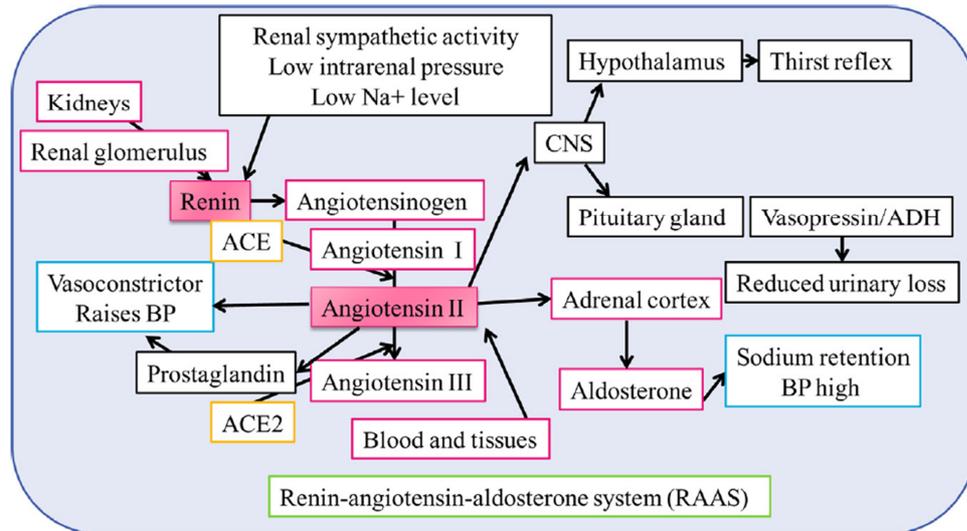


Figura 3. Mecanismo de actuación y regulación del sistema RAAS. (Tomado de Patel *et al.*, 2017).

La angiotensina II tiene un papel vasopresor al inducir la contracción de las células de músculo liso vascular mediante la unión a diversos GPCRs, siendo el más importante AT_1 . Cuando la angiotensina II se une a AT_1 se activa la cascada de señalización intracelular antes explicada desencadenando la entrada de calcio al interior celular que lleva a la contracción de las fibras musculares (Chen y Coffman, 2015; Patel *et al.*, 2017). Complementado esta vía, la Ang II estimula la secreción de aldosterona en la corteza suprarrenal que actúa promoviendo la reabsorción de sodio en la nefrona y el aumento del líquido extracelular (Constanzo, 2018).

Aunque este es el esquema central del funcionamiento de RAAS, se trata de un sistema altamente complejo que es regulado por multitud de otros factores en todos sus puntos y que actúa sobre una gran variedad de procesos fisiológicos, como se muestra en la figura 3 (Te Riet *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2017).

La estimulación de la vasoconstricción por parte del sistema nervioso simpático ocurre a través de receptores α_1 -adrenérgicos, GPCRs activados por las catecolaminas endógenas adrenalina y noradrenalina, liberadas por la glándula adrenal y las terminaciones de los nervios del sistema nervioso simpáticos, respectivamente (O'Connell *et al.* 2014).

1.4. Canales iónicos

Las células de músculo liso vascular expresan una gran variedad de canales iónicos implicados en la regulación de su estado contráctil y el tono vascular. Las familias más

Jorge Rojo Mencía

relevantes son: canales de K⁺ (voltaje-dependientes, K_v; activados por Ca²⁺, K_{Ca}; rectificadores anómalos, K_{ir}; y dependientes de ATP, K_{ATP}), canales de Ca²⁺ (L-type, T-type, N-type, P/Q-type y R-type), canales operados por receptor (ROCs, “Receptor-Operated Channels”), canales mecanosensitivos (SOCs, “Stretch-Operated Channels”), donde se incluye la familia de los TRPs (“Transient Receptor Potential”), y canales de Cl⁻ (Tykocki *et al.*, 2017; Álvarez Miguel, 2019).

En los últimos años se está produciendo un gran avance en el conocimiento de la familia de canales TRP. Han sido encontrados participando en multitud de procesos fisiológicos y fisiopatológicos en diferentes tejidos y su estudio está ampliando horizontes en el entendimiento de diversas enfermedades y abriendo nuevas vías para el desarrollo de tratamientos, entre ellas la hipertensión (Nilius *et al.*, 2007).

1.5. Familia TRP

La familia de proteínas TRP (“Transient Receptor Potential”) comprende un grupo diverso de canales catiónicos que juegan un papel importante en la señalización y homeostasis del Ca²⁺. Consta de 28 miembros divididos en 6 subfamilias según su homología de secuencia (Figura 4): 7 TRPC (Canónicos), 6 TRPV (“Vanilloid-like”), 8 TRPM (“Meslastin-like”), 1 TRPA (“Ankyrin”), 3 TRPP (“Polycystin-like”) y 3 TRPML (“Mucolipin-like”) (Nilius *et al.*, 2007; Benemei *et al.*, 2015).

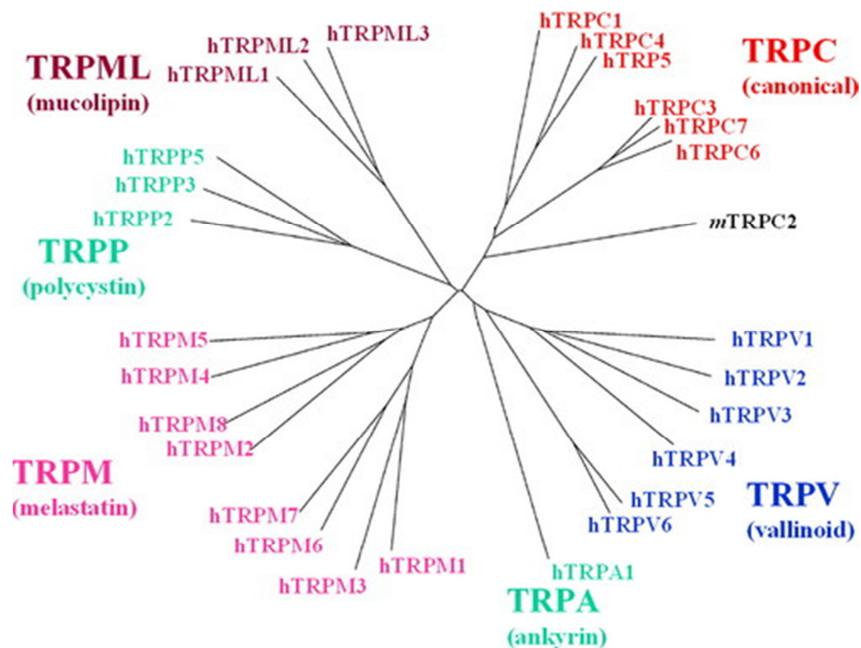


Figura 4. Árbol filogenético de la familia de canales TRP en mamíferos. (Modificado de Nilius *et al.*, 2007).

Comparten una estructura común de 6 segmentos transmembrana con un bucle intramembrana o “loop” entre los segmentos 5 y 6 que conforma el poro del canal (Figura 5). El canal funcional requiere la asociación de 4 subunidades TRP, en forma homo- o heterotetramérica. Pueden ser activados por una gran variedad de estímulos físicos y químicos tanto endógenos como exógenos, generando corrientes catiónicas de entrada que llevan a la despolarización de la membrana y la modulación de señales celulares que regulan gran cantidad de respuestas celulares y tisulares, como la despolarización neuronal o la contracción del músculo liso vascular (Nilius *et al.*, 2007).

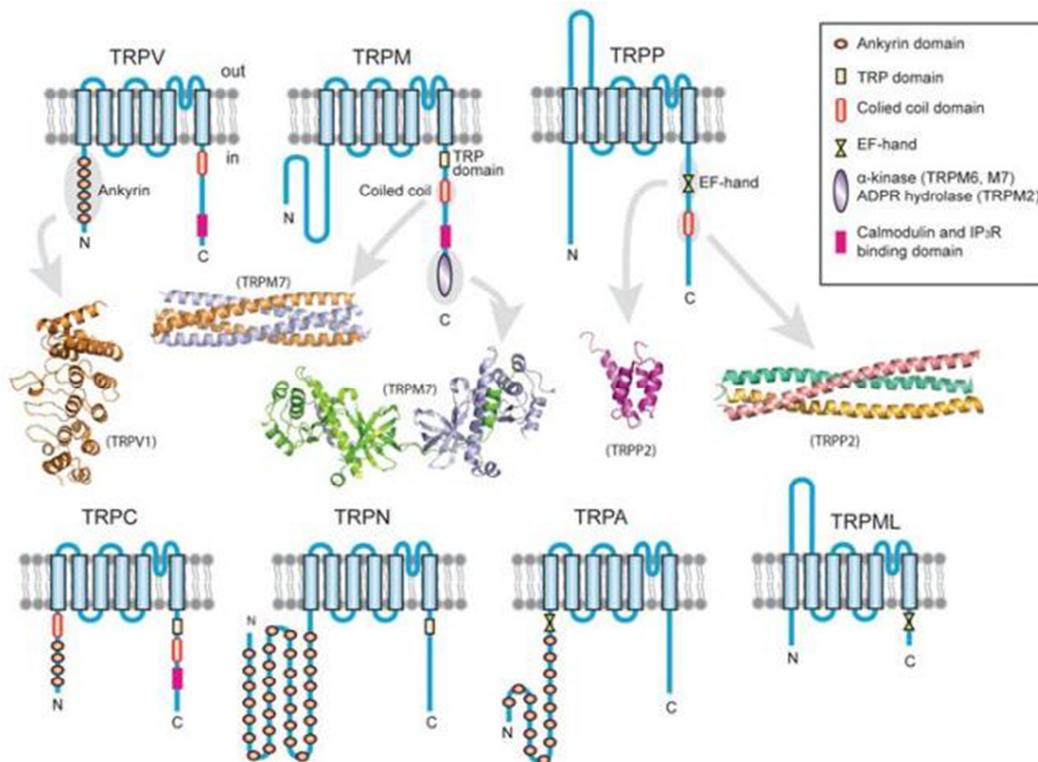


Figura 5. Organización estructural en dominios en relación a la membrana plasmática de las diferentes subfamilias de canales TRP. (Modificado de Li *et al.*, 2011).

La subfamilia TRPM está formada por 8 miembros que pueden ser agrupados en 4 grupos por su identidad de secuencia aminoacídica: TRPM1 (melastina) y TRPM3, TRPM2 y TRPM8 (participan en la sensación del frío (Ordás *et al.*, 2019)), TRPM4 y TRPM5 (no permeables a Ca^{2+} , participan en el sentido del gusto (Chen *et al.*, 2019)) y TRPM6 y TRPM7 (con dominios kinasa en su región C-terminal, en el dominio citoplasmático (Grimm *et al.*, 2003)). Todos ellos comparten en su conjunto una alta similitud estructural y funcional y están presentes de forma universal en todos tipos celulares del organismo, participando en multitud de procesos fisiológicos (Chen *et al.*, 2019).

1.6. TRPM3

TRPM3 es un canal catiónico inespecífico de 1325 residuos aminoacídicos y su estructura no ha sido aún descifrada. Estudios funcionales revelan que este canal presenta corrientes de entrada de Ca^{2+} . Ha sido hallado de forma abundante tanto en cerebro humano como de ratón y riñón humano (Grimm *et al.*, 2003).

El sulfato de pregnenolona (PS), compuesto neuroesteroideo, ha sido identificado como un agonista de TRPM3 capaz de inducir la apertura del canal y la corriente de entrada de Ca^{2+} (Naylor *et al.*, 2010; Alonso-Carbajo *et al.*, 2019).

TRPM3 tiene un papel importante en la regulación de la presión sanguínea. El estudio de Naylor *et al.* (2010) defiende que la activación de TRPM3 produce un efecto vasoconstrictor en arteria aorta, junto con una inhibición de la secreción de interleucina-6 (citoquina proinflamatoria), pero que también tiene actividad constitutiva, lo que sugiere que puede estar regulado mediante inhibición por colesterol y neuroesteroides. En contraste con estos datos TRPM3 también ha sido hallado en las terminaciones de los nervios perivasculares de arterias mesentéricas, donde su activación promueve un efecto vasodilatador (Alonso-Carbajo *et al.*, 2019).

Datos previos del laboratorio muestran que los ratones KO (“Knock-Out”) para TRPM3 presentan una menor presión arterial que sus controles WT (“Wild Type”), lo que indica que TRPM3 participa en el control de la presión sanguínea (Figura 6). Además en los ratones TRPM3 KO el tratamiento con angiotensina (con bombas subcutáneas) no indujo hipertensión mientras que en los animales control la angiotensina indujo la hipertensión y se observó un aumento de la vasodilatación inducida por PS. Esto parece indicar que el papel de TRPM3 en el fenotipo hipertensivo puede depender de su función en otros tejidos no vasculares (Alonso-Carbajo *et al.*, 2019).

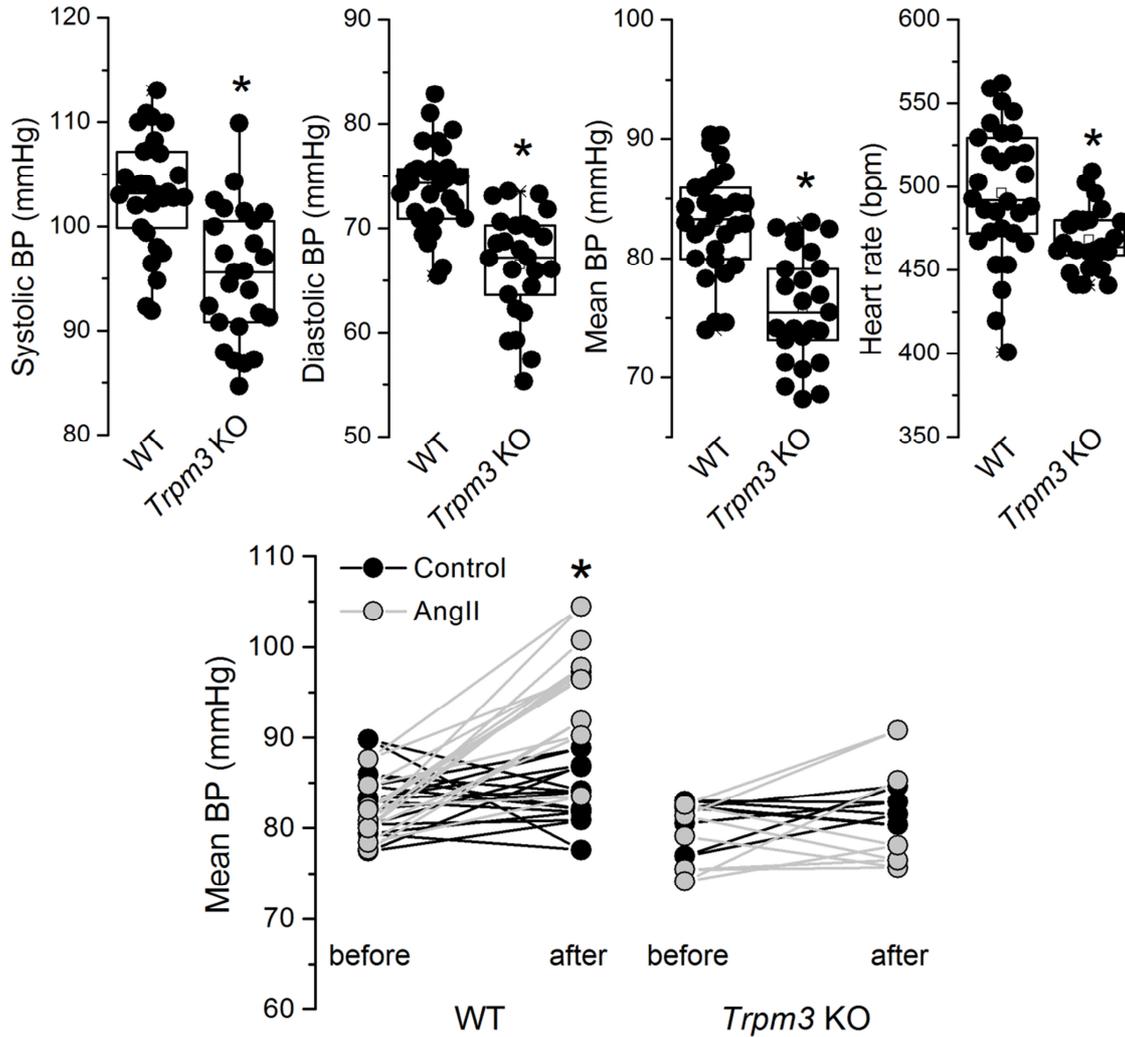


Figura 6. Arriba: Distribución de valores de presión sistólica, presión diastólica, presión arterial media y frecuencia cardiaca en ratones *Trpm3* KO y WT. **Abajo:** valores de presión arterial media en ratones *Trpm3* KO y WT antes y después del tratamiento continuado con angiotensina II.

1.7. Modelo de estudio

Dada la complejidad de la enfermedad y su carácter sistémico, es necesario utilizar un modelo animal mamífero. De estos, los modelos murinos cuentan con una gran cantidad de ventajas dado su tamaño, su rapidez de reproducción y la facilidad de manipulación, no obstante, también presentan limitaciones a la hora de reproducir las características propias de la hipertensión humana. Existen diversos modelos murinos que podemos dividir en dos categorías, genéticos y no genéticos. Éstos últimos pueden ser producidos por varios métodos, como la inducción de la hipertensión farmacológicamente (con angiotensina), quirúrgicamente (por ejemplo, mediante la compresión unilateral de la arteria renal), por la dieta (con la administración de una dieta rica en sal) o por estrés (como la exposición continuada a un frío moderado). Sin

embargo, estos modelos no genéticos no son adecuados para simular la hipertensión primaria o esencial (Lerman *et al.*, 2005).

Un modelo genético por selección fenotípica reproduce mejor la hipertensión esencial humana. Entre los posibles modelos escogemos el de los ratones espontáneamente hipertensos (BPH, “Blood Pressure High”). Este modelo fue desarrollado a partir del cruce de 8 cepas distintas, seleccionando y segregando a los individuos en función de sus valores de presión arterial hasta la obtención de 3 líneas diferenciadas, hipertensos (BPH), hipotensos (BPL, “Blood Pressure Low”) y normotensos (BPN, “Blood Pressure Normal”), obtenidos a partir de los individuos no seleccionados. Estas cepas se mantienen por cruces endogámicos hasta la actualidad (Schlager, 1974).

2. OBJETIVOS

Trabajos previos del grupo de investigación sugieren la contribución del canal TRPM3 en la hipertensión a través de su función en tejidos no vasculares. Este canal presenta una elevada expresión en el riñón, órgano con un papel importante en la regulación de la presión arterial, por lo que el objetivo global de este trabajo es explorar el efecto del canal TRPM3 sobre el flujo renal en un modelo murino de hipertensión esencial.

Los objetivos concretos son:

Primero, a nivel técnico, implementar un sistema capaz de medir el flujo renal *ex vivo* para ratones, controlando la presión de perfusión y midiendo el flujo renal con el fin de observar las variaciones en la resistencia de los vasos.

Segundo, a nivel fisiológico, determinar el papel del canal catiónico TRPM3 en la modulación del flujo renal por agonistas de receptores acoplados a proteínas G_q en un modelo de hipertensión esencial.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del equipo de medida de flujo renal *ex vivo*

La puesta a punto de los experimentos necesarios requirió del diseño y construcción de un equipo *ex profeso* capaz de perfundir el riñón manteniendo la integridad y el funcionamiento de los vasos del sistema circulatorio renal y medir la variación en la resistencia ejercida por éstos. Según la ecuación del flujo, el flujo es el cociente entre la diferencia de presión (ΔP) y la resistencia (R).

$$\text{Flujo} = \frac{\Delta P}{R}$$

El riñón es perfundido a una presión constante suministrada por una bomba y la pérdida de presión a lo largo del circuito es despreciable, de forma que la presión de perfusión en la arteria renal será la diferencia entre la presión suministrada por la bomba y la presión en la vena renal. Dado que la vena renal está abierta al medio, la presión a la salida del riñón es igual a 0, por lo que la presión de perfusión en el riñón será igual a la presión suministrada por la bomba.

$$P_{\text{perfusión}} = P_{\text{bomba}} - P_{\text{venosa}} = P_{\text{bomba}} - 0$$

$$P_{\text{perfusión}} = P_{\text{bomba}}$$

Dado que el riñón se perfunde a través de la arteria renal a una presión constante mientras se mide el flujo, las variaciones en éste son el resultado únicamente de cambios en la resistencia de los vasos intrarrenales. Los vasos que determinan fundamentalmente la resistencia son las arteriolas aferente y eferente del glomérulo (Figura 7).

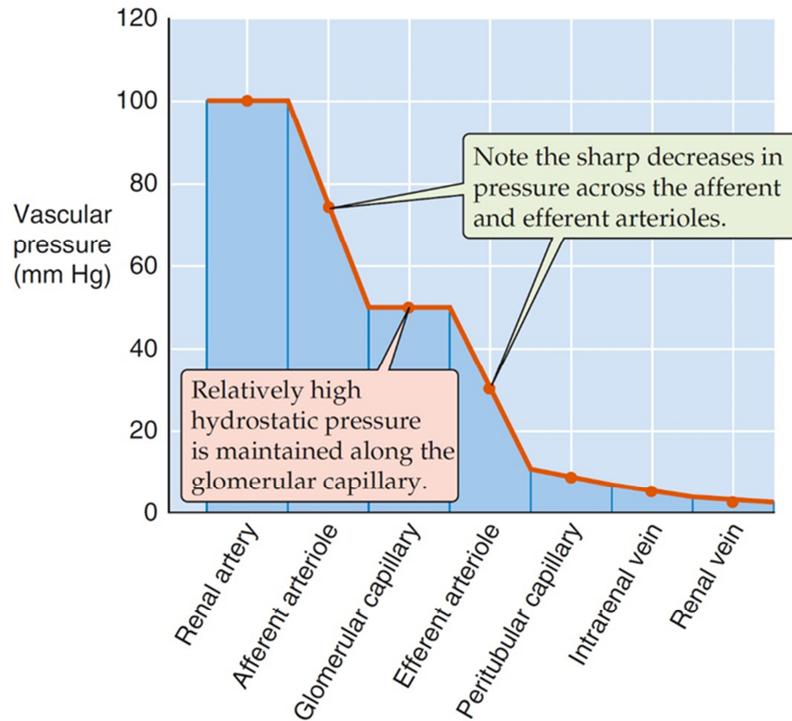


Figura 7. Variación de la presión a lo largo del lecho vascular renal, donde se observa que la caída de la presión se produce a lo largo de las arteriolas aferente y eferente del glomérulo. (Tomado de Boron y Boulpaep, 2012).

Para obtener estos registros el equipo cuenta con un medidor de flujo que utiliza un sistema de tecnología CMOSens® (Sensirion AG Switzerland, 2019), capaz de medir la velocidad a la que discurre un fluido gracias a pequeñas diferencias de temperatura. El fluido pasa por un capilar y el sistema aplica una minúscula cantidad de calor en un punto. Dos sensores de temperatura, situados de forma equidistante antes y después de la fuente de calor, miden las pequeñas diferencias de temperatura entre ambos puntos, las cuales son directamente proporcionales a la velocidad del flujo (Figura 8). Estos sensores están asociados a un microchip que amplifica la señal analógica, la digitaliza y la envía al ordenador para ser analizada.

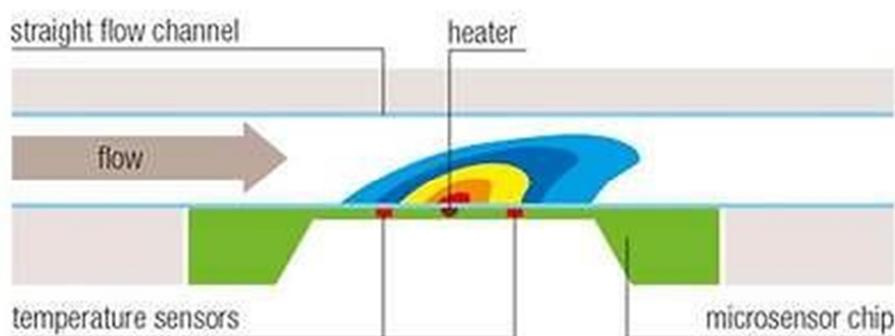


Figura 8. Esquema del funcionamiento del medidor de flujo. (Tomada de Sensirion AG Switzerland, 2019).

El equipo consta de las siguientes partes:

- Bomba
- Placa calefactora
- Soluciones
- Llaves
- Medidor de flujo
- Cámara
- Aspirador
- Soluciones auxiliares

El funcionamiento del equipo durante el experimento seguiría el siguiente esquema (Figura 9): la bomba suministra la presión deseada de forma contante a las botellas que contienen las soluciones experimentales, las cuales reposan sobre la placa calefactora manteniéndolas a 37°C. De cada botella parte un tubo que pasa por una llave. Éstas permiten abrir o cerrar el flujo de cada tubo de manera individual, seleccionando qué solución pasa por el sistema en cada momento y llega al tubo colector, donde convergen todos, continuando hacia el medidor de flujo, que recoge los datos en tiempo real. La solución sale del medidor de flujo hacia la cámara, pasando antes por una llave de paso de 3 vías que permite purgar el sistema, y acaba en una fina cánula.

En la cámara, acoplada a una placa calefactora a 37°C, se coloca el riñón con la arteria renal canulada y sujeta mediante hilo. Para la colocación del riñón en su posición es necesario que la cámara se encuentre bajo la lupa.

A la cámara llega por otra entrada la solución de lavado, que constituirá el baño en el que se encuentre el riñón durante el desarrollo del experimento y será renovada de forma constante, lavando así las soluciones experimentales que salen por la vena después de recorrer la circulación renal. La cámara se mantiene limpia y a un volumen constante gracias a una bomba aspiradora que retira el exceso de soluciones acumulado.

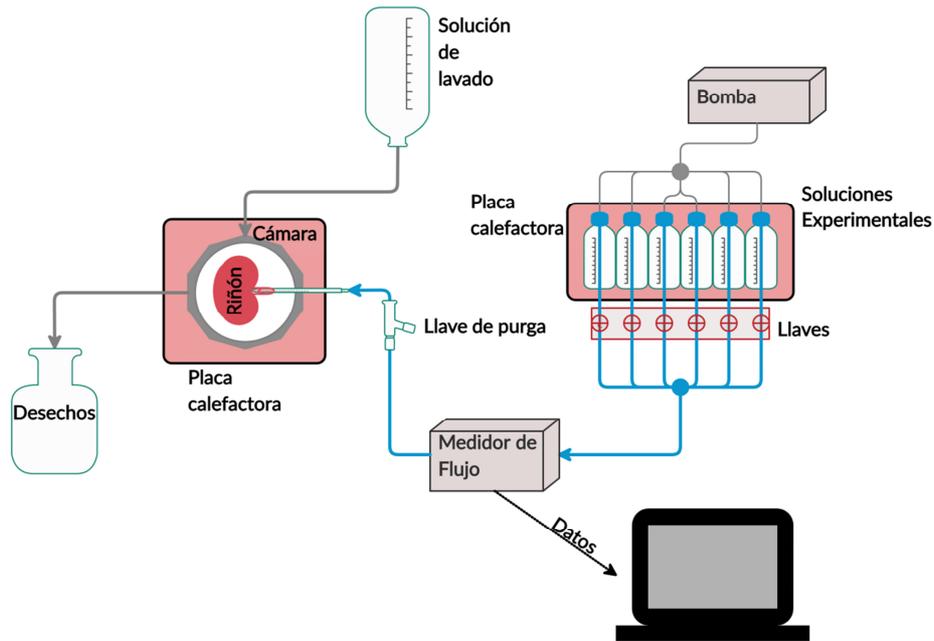


Figura 9. Arriba: esquema de los elementos del equipo de perfusión renal y su disposición. **Abajo:** fotografía del equipo de perfusión renal durante la realización de un experimento.

3.2. Diseño experimental

El procedimiento experimental consta de 3 fases:

1. Cirugía:
 - a. Sedación y sacrificio del animal por dislocación cervical.
 - b. Extracción de los riñones manteniendo la integridad de los vasos que lo acompañan.
 - c. Limpieza y eliminación de la grasa visceral circundante.
2. Montaje:
 - a. Preparación de las soluciones con los agonistas.
 - b. Purgado del equipo.
 - c. Canulación del riñón por la arteria renal en la cámara.

- d. Lavado interno del riñón, eliminación de la sangre.
 - e. Incremento de la presión hasta la seleccionada para la realización del experimento y reposo.
3. Experimento:
- a. Curva dosis-respuesta frente a agonistas (fenilefrina o angiotensina II) con lavado entre cada punto. Se realizan 4 puntos por experimento. Durante la aplicación de una dosis intermedia (cercana a la $E_{0.5}$) se prueba el efecto del PS (10 μ M).

3.3. Extracción de RNA y PCR cuantitativa

Los riñones fueron extraídos y diseccionados para separar la corteza de la médula renal, bajo la lupa, bañados en solución SMDS (“Smooth Muscle Dissociation Solution”), a 4°C, las muestras se conservan en RNALater hasta la extracción del RNA.

Las muestras son homogeneizadas en reactivo TRIZOL (Invitrogen) en un tubo con bolas cerámicas de dos tamaños diferentes (kit CK14 y CK28 Precellys®) en un homogeneizador de tejido Precellys (Bertin Instruments) y después se aísla el RNA total a partir de la capa acuosa resultante tras añadir cloroformo y centrifugar. El RNA se precipita primero con isopropanol, después con etanol al 70% y tras lavar se resuspende el pellet en agua desionizada. El RNA se conserva a -80°C hasta su utilización.

Tras sintetizar el cDNA (First Strand cDNA Synthesis Kit, ThermoFisher) se llevó a cabo la PCR cuantitativa, se utilizó el gen que codifica para RPL18 como de control endógeno. El ensayo TaqMan para el control endógeno RPL18 consta de los siguientes elementos:

- Primer Forward: 5'-AAGACTGCCGTGGTTGTGG-3'
- Primer Reverse: 5'-AGCCTTGAGGATGCGACTC-3'
- Sonda: 5'-FAM-TTCCCAAGCTGAAGGTGTGTGCA-BHQ1-3'

El ensayo para detectar el gen que codifica para TRPM3 es comercial (Mm01210379_m1, Applied Biosystems, ThermoFisher). Para cada muestra se realizó la reacción por triplicado. En cada experimento se realizó un control NTC (“Non-Template Control”) por duplicado.

Jorge Rojo Mencía

Los valores de Ct para *Trpm3* se normalizan frente a los obtenidos para *L18*. Los datos se expresan como diferencia de expresión relativa o “Fold Increase” de las muestras de ratones hipertensos frente a los normotensos, es decir $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{hipertensos}} - \Delta Ct_{\text{normotensos}}$ o como abundancia relativa, es decir como $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct_{\text{Trpm3}} - Ct_{\text{L18}}$, que representa la expresión del gen diana en las muestras de ratones normotensos e hipertensos normalizada respecto a *L18*.

3.4. Análisis de los datos de flujo

El medidor de flujo toma datos con una frecuencia de 3.125 Hz, de manera que para dar un valor de tiempo en minutos a cada dato se divide el número de cada dato entre la frecuencia y 60 segundos. De esta manera podemos construir una gráfica donde veamos cómo evoluciona el flujo a lo largo del tiempo durante el experimento.

Debido a que las soluciones experimentales tienen que recorrer el espacio del sistema que separa el tubo colector del riñón (volumen muerto), que corresponde a un volumen de 600 μl , se genera un retardo entre que se aplica un estímulo y que éste llega realmente al riñón. Para corregir este defecto es necesario el tratamiento de los datos, realizando la integral del flujo y dividiéndola entre el volumen muerto de forma que podemos representar el flujo acumulado medido en unidades de volumen muerto.

Ahora podemos corregir el dato de tiempo en que se aplica cada estímulo, sumándole el tiempo que ha tardado en recorrer una unidad de volumen muerto, es decir, el tiempo transcurrido desde la apertura de la llave, registrada por el programa, hasta que la solución experimental llega realmente al riñón, y poder así determinar el momento en el que es aplicado y retirado cada agonista.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Microsoft Excel. Los resultados mostrados en las gráficas de barras se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se utiliza la prueba t de Student para comprobar si las diferencias entre dos grupos son significativas, se consideran diferencias significativas cuando $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** y $p < 0,001$ ***.

4. RESULTADOS

4.1. Expresión de TRPM3 en riñón

Estudios anteriores muestran una alta expresión de TRPM3 en el riñón (Grimm *et al.*, 2003). Para localizar estas diferencias de expresión a lo largo de las diferentes capas del órgano se diseccionó el órgano y se analizó por separado muestras de corteza y médula renal de ratones BPN y BPH machos y hembras. Los resultados de PCR cuantitativa mostraron una expresión mucho mayor en corteza de ratones BPH, tanto machos como hembras, y una clara diferencia a nivel de la médula, donde los datos de expresión entre machos normotensos e hipertensos son semejantes, mientras que en hembras hipertensas se ve aumentada la presencia de mRNA TRPM3 respecto a sus controles normotensas (Figura 10).

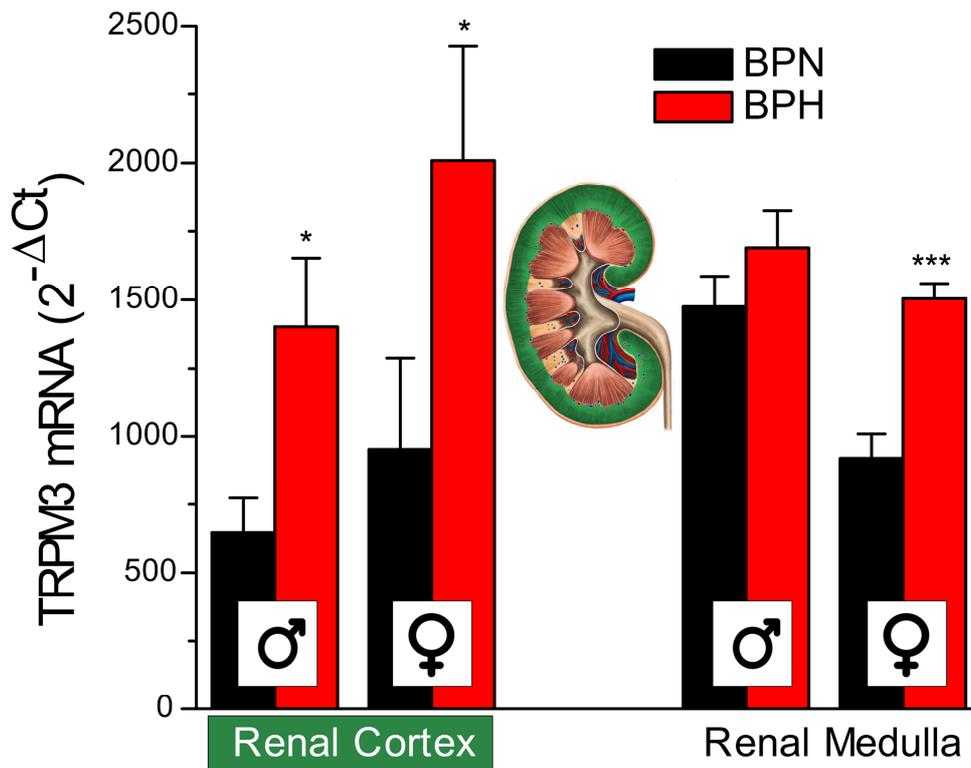


Figura 10. Análisis de la distribución de la expresión de TRPM3 mRNA en corteza y médula renal de ratones BPN y BPH machos y hembras.

También se analizaron las diferencias en el órgano completo entre ratones con fenotipo normotenso e hipertenso, donde se observa que existen claras diferencias en la expresión del canal, presentando los ratones BPH cerca del doble de mRNA de TRPM3 que sus controles BPN (Figura 11). Debido a la disponibilidad de los animales, los análisis del riñón completo solo pudieron ser realizados en machos.

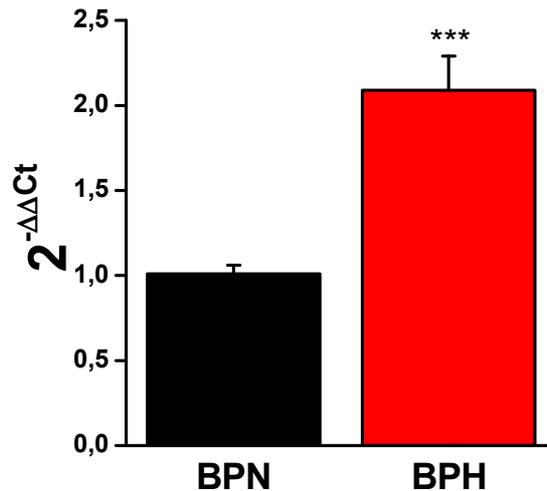


Figura 11. Diferencias de expresión de TRPM3 mRNA entre ratones machos BPN y BPH cuantificadas por el método de Fold Increase ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

4.2. Curvas Dosis-Respuesta frente a Phe y Ang II

Para medir el efecto sobre la circulación renal de la activación de las cascadas de señalización mediadas por agonistas de GPCRs, en ratones normotensos e hipertensos se llevaron a cabo experimentos de perfusión renal con el diseño experimental antes indicado. Se midió la respuesta contráctil frente a dos agonistas: la angiotensina II (Figura 12) y la fenilefrina (Figura 13), análogo de noradrenalina activador de receptores α_1 -adrenérgicos. La respuesta frente a ambos agonistas (Figura 14) se ajusta a una función del tipo $E(\%) = E_{max} / \{ (E_{0.5} / [Agonista]) + 1 \}$, donde $E(\%)$ es la respuesta expresada en decrecimiento del flujo, E_{max} es el efecto máximo alcanzable a dosis saturantes y $E_{0.5}$ es la dosis en la que se logra un 50% de respuesta. Tanto ratones normotensos como hipertensos presentan una mayor sensibilidad frente a angiotensina II, pero ésta produce un efecto moderado aun a concentraciones saturantes, mientras que son menos sensibles a fenilefrina, pero ésta es capaz de cerrar casi por completo la circulación renal a dosis elevadas (Tabla 1).

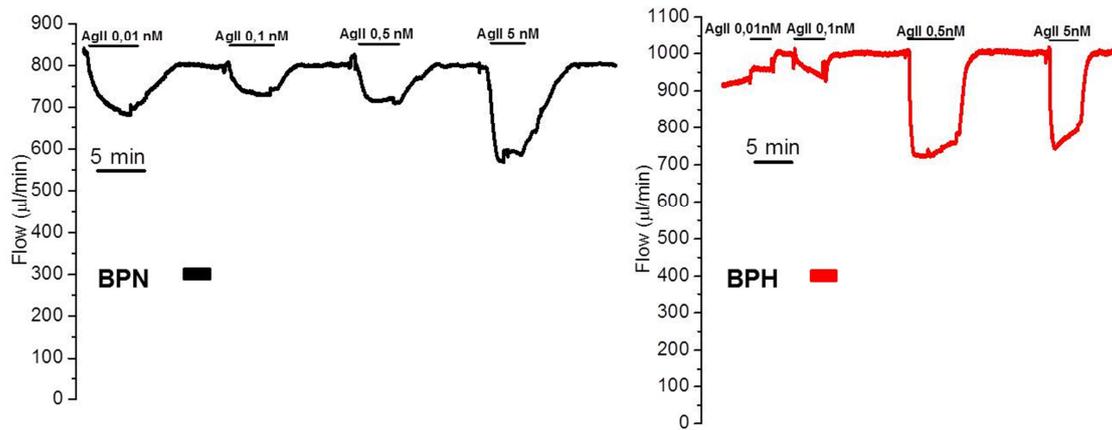


Figura 12. Ejemplos de la variación del flujo a lo largo de un experimento de perfusión renal frente a la aplicación de diferentes dosis de angiotensina II (0.01, 0.1, 0.5 y 5 nM) en ratones BPN y BPH.

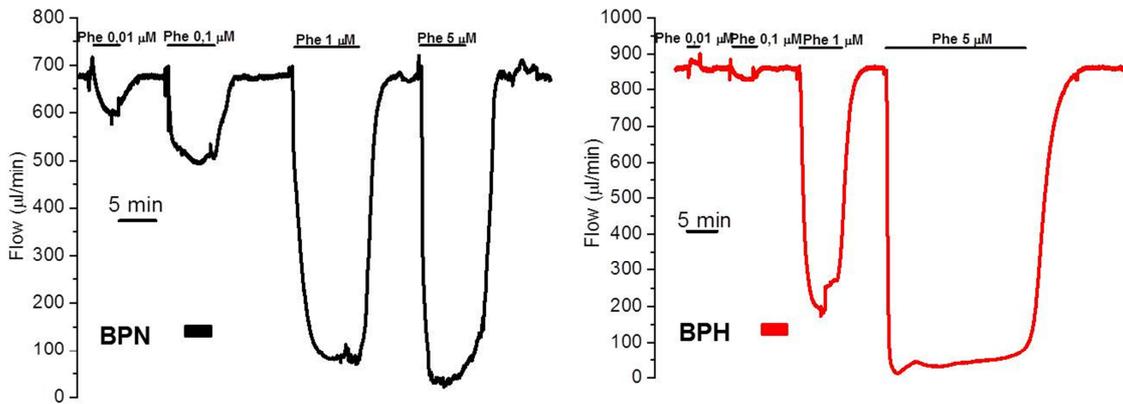


Figura 13. Ejemplos de la variación del flujo a lo largo de un experimento de perfusión renal frente a la aplicación de diferentes dosis de fenilefrina II (0.01, 0.1, 1 y 5 µM) en ratones BPN y BPH.

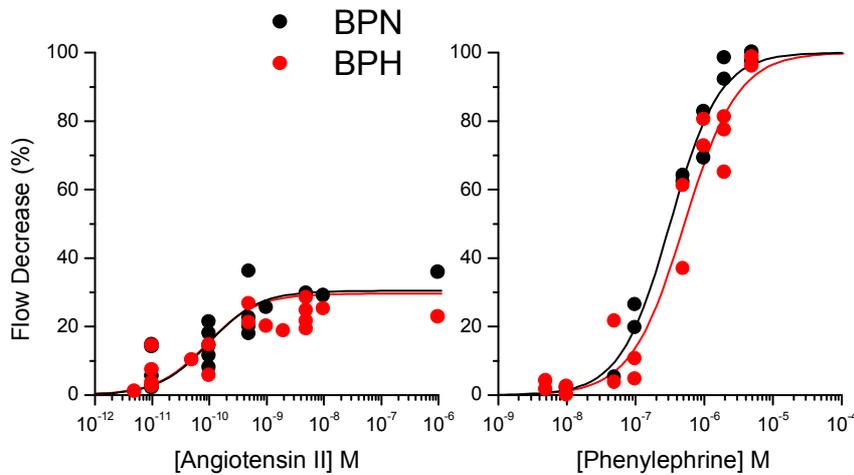


Figura 14. Curvas dosis-respuesta frente a angiotensina II (izquierda) y fenilefrina (derecha).

	BPN		BPH	
	Ang II	Phe	Ang II	Phe
E_{max}	29.63 ± 2.97	100	30.45 ± 2.64	100
E_{0.5}	88.04 pM ± 38.70	0.31 μM ± 0.29	97.90 pM ± 38.60	0.51 μM ± 0.74

Tabla 1. Valores de ajuste a la ecuación $E(\%) = E_{max} / \{ (E_{0.5} / [Agonista]) + 1 \}$ para los agonistas angiotensina y fenilefrina en ratones BPN y BPH. E(%): respuesta expresada en decrecimiento del flujo, E_{max}: efecto máximo, E_{0.5}: dosis al 50% de respuesta.

4.3. Activación de TRPM3 mediante PS

Con el fin de estudiar el papel de TRPM3 en la contracción de las células de músculo liso vascular se activa el canal con sulfato de pregnenolona (PS). Se realiza un experimento de perfusión renal preconstruyendo los vasos con un estímulo de fenilefrina o angiotensina cercano a su E_{0.5} (Figura 15). La activación TRPM3 produce una reducción similar del efecto vasoconstrictor de la fenilefrina en ratones BPN y BPH. Por el contrario, cuando se activa TRPM3 durante un estímulo de angiotensina en riñones de ratón normotenso se produce una potenciación del efecto vasoconstrictor y con ello una reducción aún más acentuada del flujo renal, mientras que en ratones hipertensos produce una disminución de efecto vasoconstrictor de la angiotensina, restituyendo parte del flujo basal (Figuras 15 y 16).

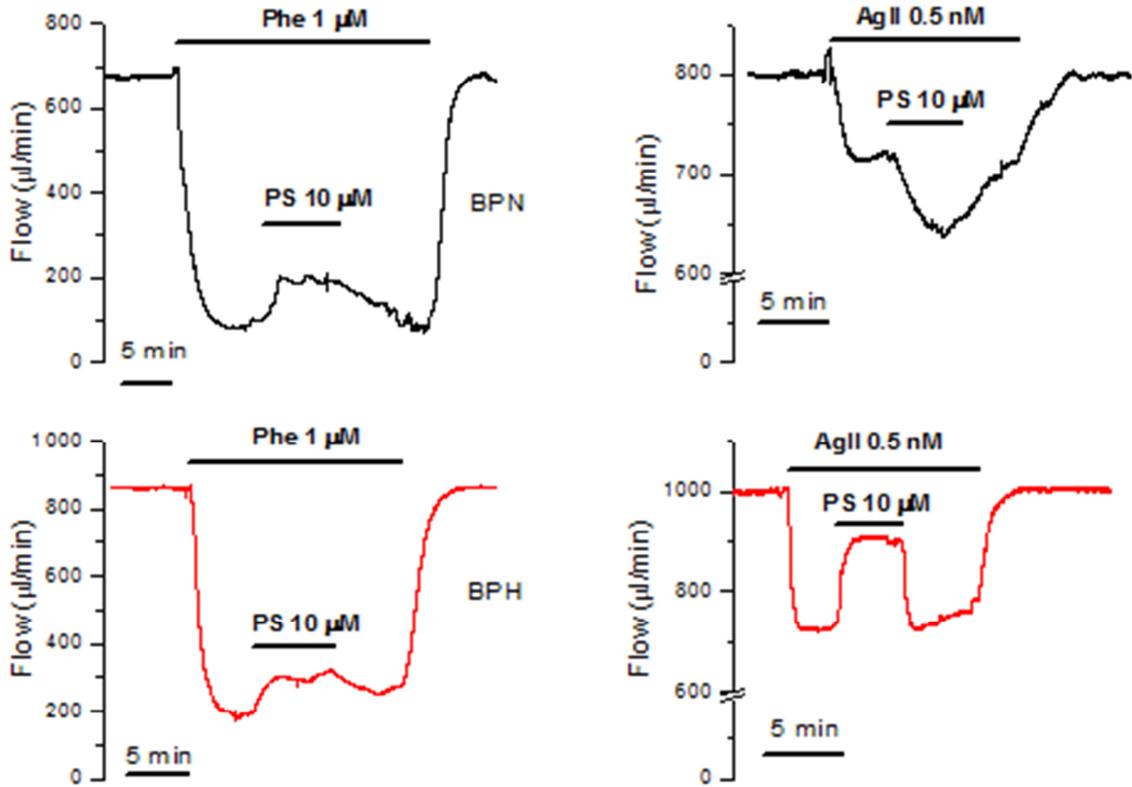


Figura 15. Ejemplos de 4 experimentos donde se estudia el efecto en de la activación de TRPM3 con PS durante un estímulo contráctil de fenilefrina (izquierda) y angiotensina II (derecha) en el flujo renal en BPN (arriba) y BPH (abajo).

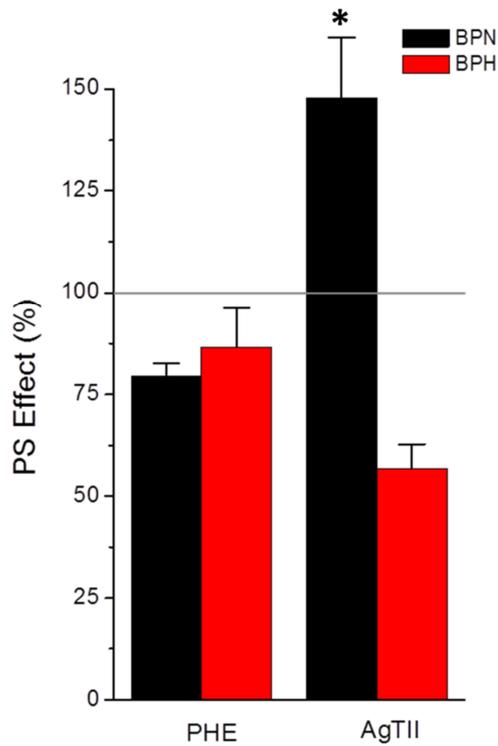


Figura 16. Gráfico de barras que muestra las medias de la variación del efecto vasoconstrictor de la fenilefrina y la angiotensina tras la activación del canal TRMP3 con PS.

5. DISCUSIÓN

Datos previos del laboratorio mostraron que ratones KO de TRPM3 son hipotensos y además cuando se intenta inducir la hipertensión con un modelo de infusión de angiotensina con bombas osmóticas, estos ratones no desarrollan la hipertensión. Esto sugiere que este canal contribuye a la modulación de la presión arterial y que su contribución fisiológica global es aumentar el tono vascular. En este trabajo se explora la contribución de canal TRPM3 a la regulación del flujo renal en la hipertensión arterial. Para ello estudiamos el efecto de la activación del canal sobre la respuesta del flujo renal a dos agonistas vasoconstrictores en un modelo murino de hipertensión.

Los datos de expresión de la literatura muestran que la expresión del canal TRPM3 en humano es elevada en riñón (GeneCards®) aunque se han descrito diferencias según la especie que muestran que no se detectan en riñón de ratón (Grimm *et al.*, 2003). En este trabajo hemos estudiado los niveles de expresión mRNA de TRPM3 en riñón de ratones hipertensos y normotensos de ambos sexos. Hemos encontrado niveles de expresión altos en todos los casos. En animales normotensos los machos presentan el doble de expresión en médula que en corteza renal, mientras que en las hembras la expresión es igual en ambas capas renales. En su conjunto los ratones hipertensos expresan más TRPM3 en riñón. En los machos el incremento es significativo solo en corteza, mientras que en las hembras se observa este incremento tanto en corteza como en médula (Figura 10).

Para este trabajo hemos puesto a punto un equipo con el que se consigue inferir la resistencia ejercida por la vasculatura renal a través de las variaciones en el flujo manteniendo una presión constante. Permite además perfundir a un mismo riñón con diferentes soluciones y concentraciones de agonista en un mismo experimento y medir respuesta del sistema vascular (Figura 9). También es posible, aunque no ha sido objeto de este estudio, evaluar el comportamiento de los vasos a diferentes presiones.

Con este equipo estudiamos la respuesta de la vasculatura renal a dos agonistas de GPCRs, la fenilefrina y la angiotensina. Cuando comparamos la respuesta en animales BPN y BPH no observamos diferencias en flujo renal en respuestas a ninguno de los dos agonistas (Figura 14). Cabe destacar que el flujo renal es más sensible a la angiotensina ($E_{0.5}$ del orden de 90 pM) pero su efecto máximo es relativamente moderado (una reducción de entorno al 35% del flujo) mientras que la fenilefrina es menos sensible, es necesaria una mayor concentración para conseguir efecto (la $E_{0.5}$ es del orden de 0.4 μ M) pero el efecto vasoconstrictor total es mayor, llegando a bloquear casi por completo la circulación renal (Tabla 1).

Jorge Rojo Mencía

Estudios anteriores realizados en aorta han demostrado que TRPM3 desarrolla diferentes papeles en funcionamiento de las células de músculo liso vascular en este tejido. En VSMCs en estado proliferativo TRPM3 está implicado en la regulación de la secreción, mientras que cuando las células se encuentran en un fenotipo contráctil el canal regula la contracción (Naylor *et al.*, 2010). Esto contrasta con los resultados obtenidos por (Alonso-Carbajo *et al.*, 2019), donde se observa que TRPM3 tiene un papel vasodilatador en arterias de resistencias a través de los nervios perivasculares.

La activación TRPM3 en riñón mediante sulfato de pregnenolona (PS) produce una disminución del efecto vasoconstrictor de la fenilefrina (en torno al 80% de la respuesta contráctil original) tanto en ratones BPN como BPH, que se observa como un aumento del flujo debido a la disminución de la resistencia arterial en el riñón. En cambio, cuando se activa TRPM3 durante un estímulo de angiotensina los efectos son claramente contrarios entre ratones normotensos e hipertensos. En BPN el efecto de la angiotensina se ve potenciado al activar TRPM3, aumentando la vasoconstricción renal y reduciendo el flujo en un 150% de la respuesta frente al agonista solo, mientras que en BPH el TRPM3 produce de nuevo la disminución de la respuesta vasoconstrictora en cerca del 60% del efecto de partida (Figura 16).

El método de medida de la resistencia vascular desarrollado en este estudio aporta una visión global de lo que está sucediendo en la circulación del órgano al completo, lo que permite un acercamiento más próximo al estado fisiológico in vivo. No obstante, esto plantea una serie de limitaciones a la hora de obtener conclusiones en cuanto al modo en que actúa TRPM3 en la regulación del tono de los vasos, ya que en un órgano al completo entran en juego multitud de factores diferentes más allá del control ejercido por las células del músculo liso vascular, como son el epitelio vascular, los nervios perivasculares o la función endocrina del propio riñón. Además, el tamaño muestral analizado es aun relativamente pequeño y sería interesante ampliar estos resultados con una población mayor.

Para esclarecer el papel que desempeña TRPM3 en la fisiología vascular renal sería necesario conocer su localización exacta a lo largo de la nefrona, las diferencias de expresión entre las arterias aferente y eferente y combinar estos resultados con experimentos de miografía, donde se observe el efecto de su activación en éstas arterias de forma aislada. También sería interesante conocer si TRPM3 tiene un papel en la reabsorción de sodio en el túbulo contorneado proximal, lo que podría afectar a la variación del líquido circulante y por ende incrementar la presión arterial.

6. CONCLUSIONES

1. Hemos puesto a punto un equipo y un método experimental capaz de perfundir el sistema vascular renal al completo y medir las variaciones en la resistencia de los vasos y el flujo frente a estímulos químicos y físicos.
2. El canal TRPM3 muestra una elevada expresión de muestras de riñón de ratones BPN y BPH. La expresión de TRPM3 es mayor en ratones hipertensos.
3. La respuesta del flujo renal a fenilefrina y angiotensina no cambia entre ratones normotensos e hipertensos.
4. El activador del TRPM3, sulfato de pregnenolona, participa en la regulación del flujo renal en respuesta a angiotensina. En ratones normotensos tiene un efecto potenciador de la respuesta mientras que en hipertensos tiene un efecto reductor.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Carbajo, L., Alpiza, Y. A., Startek, J. B. López-López, J. R., Pérez-García, M. T. y Talavera, K. (2019). "Activation of the Cation Channel TRPM3 in Perivascular Nerves Induces Vasodilation of Resistance Arteries." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 129: 219–30.
- Álvarez Miguel, I. (2019). *Remodeling of Vascular Smooth Muscle Ion Channels Involved In Purinergic Signaling*. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- Benemei, S., Patacchini, R., Trevisani, M. y Geppetti, P. (2015). "TRP Channels." *Current Opinion in Pharmacology*, 22: 18–23.
- Boron, W. y Boulpaep, E. (2012). *Medical Physiology*. 2ª ed. Filadelfia (EEUU). Elsevier.
- Chen, D. y Coffman, T. M. (2015). "AT1 Angiotensin Receptors - Vascular and Renal Epithelial Pathways for Blood Pressure Regulation." *Current Opinion in Pharmacology*, 21: 122–26.
- Chen, Y., Xu Z., Tingting Y., Ruixue B., Zhanmei H., Hao D., Jian L. y Jin Z. (2019). "Emerging Structural Biology of TRPM Subfamily Channels." *Cell Calcium*, 79: 75–79.
- Constanzo, L. S. (2018). *Physiology*, 6ª ed. Filadelfia (EEUU). Elsevier.
- Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G. y Harteneck, C. (2003). "Molecular and Functional Characterization of the Melastatin-Related Cation Channel TRPM3." *Journal of Biological Chemistry*, 278 (24): 21493–501.
- Jackson, W. F. (2000). "Ion Channels and Vascular Tone." *Hypertension*, 35: 173–78.
- Lerman, L., Chade, A. R., Sica, V. y Napoli, C. (2005). "Animal Models of Hypertension: An Overview." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 146 (3): 160–63.
- Li, M., Yu, Y. y Yang, J. (2011). "Structural Biology of TRP Channels." *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 704: 1–23
- Liu, Z. y Khalil, R. F. (2018). "Evolving Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction Highlight Key Targets in Vascular Disease." *Biochemical Pharmacology*, 153: 91–122.
- Naylor, J., Li, J., Milligan, C. J., Zeng, F., Sukumar, P., Hou, B., Sedo, A., Yuldasheva, N., Majeed, Y., Beri, D., Jiang, S., Seymour, V. A. L., McKeown, L., Kumar, B., Harteneck, C., O'Regan, D., Wheatcroft, S. B., Kearney, M. T., Jones, C., Porter, K. E. y Beech, D. J. (2010). "Pregnenolone Sulphate-and Cholesterol-Regulated TRPM3 Channels Coupled to Vascular Smooth Muscle Secretion and Contraction." *Circulation Research*, 106 (9): 1507–15.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, Y. y Peters, J. A. (2007). "Transient Receptor Potential Cation Channels in Disease." *Physiological Reviews*, 87 (1): 165–217.
- O'Connell, T. D., Jensen, B. C., Baker, A. J. y Simpson, P. C. (2014). "Cardiac Alpha 1 - Adrenergic Receptors: Novel Aspects of Expression, Signaling Mechanisms, Physiologic Function, and Clinical Importance." *Pharmacological Reviews*, 66 (1): 308–33.
- Ordás, P., Hernández-Ortego, P., Vara, H., Fernández-Peña, C., Reimúndez, A., Morenilla-Palao, C., Guadaño-Ferraz, A., Gomis, A., Hoon, M., Viana, F. y Señaris, R. (2019). "Expression of the Cold Thermoreceptor TRPM8 in Rodent Brain Thermoregulatory Circuits." *The Journal of Comparative Neurology*, 1–23.

- Organización Mundial de la Salud. (2010). "Global Status Report on Noncommunicable Diseases." *OMS*.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). "Información General Sobre La Hipertension En El Mundo. Una Enfermedad Que Mata En Silencio, Una Crisis de Salud Pública Mundial." *OMS*.
- Patel, S., Rauf, K., Khan, H. y Abu-Izneid, T. (2017). "Renin-Angiotensin-Aldosterone (RAAS): The Ubiquitous System for Homeostasis and Pathologies." *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 94: 317–25.
- Poulter, N. R., Prabhakaran, D. y Caulfield, M. (2015). "Hypertension." *The Lancet*, 386 (9995): 801–12.
- Schlager, G. 1974. "Selection for Blood Pressure Levels in Mice." *Genetics*, 76 (3): 537–49.
- Sensirion AG Switzerland. (2019). CMOSens® in Liquid Flow Measurement. Sensirion: <https://www.sensirion.com/en/about-us/company/technology/cmosens-technology-for-liquid-flow/>
- Te Riet, L., Van Esch, J., Roks, A., Van Den Meiracker, A. y Jan Danser, J. (2015). "Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations." *Circulation Research*, 116 (6): 960–75.
- Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. M., Anagnostopoulou, A., Arner, A. y Montezano, A. C. (2018). "Vascular Smooth Muscle Contraction in Hypertension." *Cardiovascular Research*, 114 (4): 529–39.
- Tykocki, N. R., Boerman, E. M. y Jackson, W. F. (2017). "Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles." *Comprehensive Physiology*, 7 (2): 485–581.