



Universidad de Valladolid

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

&

TERAPIAS AVANZADAS

Canales TRPC3 como reguladores de la respuesta inflamatoria, explorando el mecanismo de regulación negativa de TRPC3 por PKCs

Gonzalo San José Rodríguez

Tutores:

Javier Casas Requena

María Ángeles Balboa García



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Inmunidad innata y mecanismos de activación inflamatoria	2
Señalización intracelular dependiente del Ca^{2+}	2
Familia TRPC: estructura, activación y función	2
El canal TRPC3 en la respuesta inflamatoria	3
Regulación negativa de TRPC3 por PKC	4
Hipótesis y objetivos.....	6
Materiales y métodos.....	7
Análisis RNAseq	7
Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	7
Generación de vectores de expresión para TRPC3 y mutantes	8
Transfección y silenciamiento génico	8
Medida de biosensores basados en FRET	9
Fotoblanqueo del aceptor para FRET.....	9
Fagocitosis sincronizada y análisis de inmunocitoquímica	9
Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	10
PCR cuantitativa (qPCR).....	10
Ensayo ELISA para prostaglandina E2.....	10
Extracción de proteínas e inmunodetección por Western blot	10
Electroforesis en gel de agarosa	11
Análisis estadístico.....	11
Resultados.....	12
Suprimir el canal TRPC3 altera el perfil transcriptómico inflamatorio.....	12
La delección de TRPC3 disminuye la respuesta inflamatoria en macrófagos humanos	13
La mutación en Ser712 impide la regulación de TRPC3 incrementando la inflamación.....	15
Varias isoformas de PKC cambian su localización subcelular tras la estimulación con LPS	17
TRPC3 participa en la fagocitosis.....	21
Discusión	22
Conclusiones	24
Bibliografía.....	25

Resumen

El canal iónico TRPC3 ha emergido como un actor clave en la respuesta inflamatoria mediada por señales lipídicas en macrófagos. Este trabajo de fin de máster se centra en estudiar su papel funcional en células THP-1 humanas y en desentrañar los mecanismos de regulación negativa mediados por la fosforilación postraducciona. En particular, se ha investigado la implicación de la quinasa PKC ϵ en la fosforilación inhibitoria del residuo Ser712 de TRPC3, con el objetivo de comprender cómo se modula su actividad durante la activación inflamatoria inducida por LPS.

Para ello, se han empleado modelos celulares con TRPC3 funcional (wt) y *Knock-out* (KO), mutantes específicos del canal, así como herramientas de interferencia génica y ensayos de interacción molecular como transferencia de energía por resonancia de Förster FRET y microscopía confocal. Los resultados muestran que la eliminación de TRPC3 reduce la expresión de genes inflamatorios y la producción de PGE₂, indicando que el canal es necesario para una respuesta inflamatoria completa. La mutación S712A genera una activación exacerbada del canal, lo que confirma el papel regulador de Ser712. Además, se evidencia que PKC ϵ interactúa funcionalmente con TRPC3, modulando negativamente su actividad.

Este trabajo contribuye a entender el papel de los canales iónicos en inmunidad innata y propone el eje DAG–TRPC3–PKC ϵ como una vía reguladora con relevancia fisiopatológica y potencial valor terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas.

Palabras clave: TRPC3, PKC, DAG, inflamación, macrófagos.

Abstract

The ion channel TRPC3 has emerged as a key player in the inflammatory response mediated by lipid signaling in macrophages. This master's thesis focuses on studying its functional role in human THP-1 cells and unraveling the mechanisms of negative regulation mediated by post-translational phosphorylation. In particular, the involvement of protein kinase PKC ϵ in the inhibitory phosphorylation of the Ser712 residue of TRPC3 has been investigated, with the aim of understanding how its activity is modulated during lipopolysaccharide induced inflammatory activation.

To this end, cell models with functional (wt) and gene knockout TRPC3, specific channel mutants, as well as gene interference tools and molecular interaction assays such as Förster resonance energy transfer (FRET) and confocal microscopy have been used. The results show that the deletion of TRPC3 reduces the expression of inflammatory genes and the production of PGE₂, indicating that the channel is necessary for a full inflammatory response. The S712A mutation leads to exacerbated channel activation, confirming the regulatory role of this residue. Moreover, PKC ϵ is shown to functionally interact with TRPC3, negatively modulating its activity.

This work contributes to a better understanding of the role of ion channels in innate immunity and proposes the DAG–TRPC3–PKC ϵ axis as a regulatory pathway with pathophysiological relevance and potential therapeutic value in chronic inflammatory diseases.

Keywords: TRPC3, PKC, DAG, inflammation, macrophages.

Introducción

Inmunidad innata y mecanismos de activación inflamatoria

La inmunidad innata representa el principal mecanismo de defensa frente a agentes infecciosos o lesiones tisulares, la principal diferencia que la distingue de la inmunidad adaptativa, es su acción rápida e inespecífica, basada en el reconocimiento de patrones moleculares altamente conservados en los patógenos (PAMPs) o en señales de daño endógeno (DAMPs) ^{1,2,25}. Los principales actores de esta respuesta son los macrófagos, monocitos, neutrófilos, células dendríticas y células NK, estos tipos celulares cuentan con sistemas de reconocimiento de patrones (PRRs) tanto en la superficie como intracelulares, destacando los tipo Toll (TLRs), los tipo NOD (NLRs) y los tipo RIG-I (RLRs) ^{1,21}.

El receptor de reconocimiento de patrones más ampliamente estudiado es el TLR4, activado por el lipopolisacárido (LPS), siendo una endotoxina que podemos encontrar en la membrana externa de las bacterias gram negativas ³, capaz de inducir una fuerte respuesta inflamatoria ^{2,3}. Esta respuesta se manifiesta mediante la activación de rutas de señalización intracelular, que convergen en la vía NF- κ B, desencadenando la expresión de genes proinflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-1 β y COX-2 ^{2,22}. También destaca el papel de segundos mensajeros de naturaleza lipídica como el diacilglicerol (DAG), modulador de procesos tales como la entrada de calcio (Ca^{2+}) a la célula, la reorganización del citoesqueleto y la activación de quinasas ^{4,5}.

Señalización intracelular dependiente del Ca^{2+}

La señalización intracelular regida por Ca^{2+} representa un eje fundamental en la activación, modulación y ejecución de la respuesta inflamatoria, debido a su acción como segundo mensajero, actuando a su vez en procesos como, la activación de linfocitos y la producción de citocinas inflamatorias ^{5,23}. Este papel como segundo mensajero se sostiene sobre las fluctuaciones que sufre la concentración del ion, de forma transitoria, sostenida o localizada, pudiendo desencadenar respuestas específicas en función del contexto ^{5,6}.

Cuando se analiza la concentración de Ca^{2+} en los eventos inflamatorios, se observa un incremento en los niveles intracelulares, debido a la liberación desde los reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico, o a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de canales de membrana ^{6,24}. La entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular está condicionada por estímulos externos como la activación de receptores de tipo Toll ²⁵, receptores acoplados a proteínas G o a receptores de citocinas, dando como resultado de su activación la producción de segundos mensajeros como el DAG ^{6,7,8}.

Por tanto, la relación funcional entre la entrada de Ca^{2+} a la célula y la presencia del DAG es clave para la señal inflamatoria, donde la acción del DAG desencadena la apertura de algunos canales de la familia de receptores de potencial transitorio (TRP), especialmente a la subclase TRPC ^{8,9,26}. La activación de estos canales permite una entrada sostenida de Ca^{2+} al espacio intracelular, condicionando el perfil inflamatorio de la célula y siendo por ello un punto clave en la respuesta inmune ^{8,9,26}.

Familia TRPC: estructura, activación y función

La familia de los canales iónicos transitorios de receptores de potencial canónico o TRPC están ampliamente distribuidos por multitud de tejidos y tipos celulares, desde

neuronas o miocitos hasta células endoteliales o del sistema inmune ²⁷, regulando la homeostasis de Ca^{2+} y están caracterizados por su activación en respuesta a estímulos fisicoquímicos de diversa naturaleza, encontrándose por tanto altamente regulados a nivel transcripcional y postraducciona ^{8,9,10}.

En mamíferos, esta familia cuenta con siete miembros, que se dividen a su vez en cuatro subgrupos (TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 y TRPC4/5), compartiendo una arquitectura común, donde sus subunidades se ensamblan típicamente en tetrámeros con simetría cuádruple, que pueden estar constituidos por homotetrámeros o, en algunos casos como en el subgrupo TRPC3/6/7, por heterotetrámeros funcionales, particularmente entre TRPC3 y TRPC6 ^{10,11,51}. Si analizamos su estructura empleando criomicroscopía electrónica, podemos caracterizar eficazmente su conformación, cada subunidad posee un dominio transmembrana, con seis hélices alfa y un poro central muy conservado, y un dominio citoplasmático que incluye las regiones amino y carboxilo terminales, con repeticiones de anquirina, hélices y dominios superenrollados que estabilizan el canal ^{10,11,27}.

A nivel funcional, los canales TRPC son catiónicos no selectivos, permitiendo el paso de iones Ca^{2+} y sodio (Na^+) desde el medio extracelular hacia el citosol ^{29,30}. Su activación puede depender de la depleción de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, como ocurre en el caso de TRPC1, o estar mediada por lípidos como el DAG, como sucede con TRPC3, TRPC6 y TRPC7 ^{9,10,11}.

Los dos mecanismos principales propuestos para la activación de los canales TRPC son la activación mediada por receptores, (ROC), y la dependiente de la depleción de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares (SOC) ^{10,11}. Pertenecientes al primer grupo, podemos encontrar TRPC1, TRPC2 y TRPC4, mientras que los TRPC3, TRPC6 y TRPC7 se activan por la acción del diacilglicerol, acoplada a la función de otros canales como el TRPC1 o TRPC4 ^{8,11}.

Estos canales, pueden verse activados también por estímulos mecánicos, por ejemplo, en el caso del TRPC1 en *Xenopus* tanto en sus ovocitos como en conos de crecimiento neurales, TRPC6 y TRPC3 muestran a su vez sensibilidad ante el estrés mecánico en podocitos y neuronas sensoriales ¹¹.

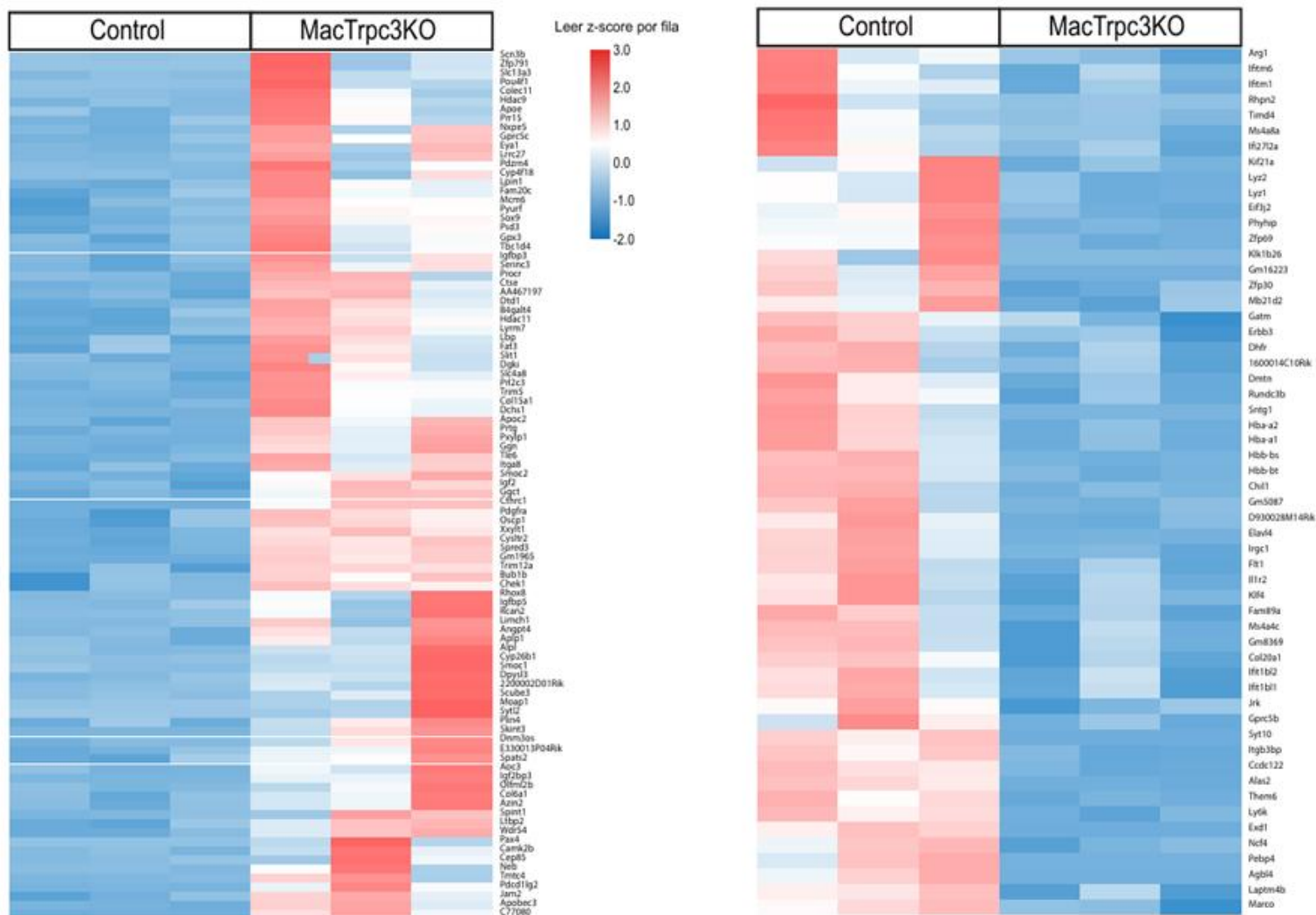
El canal TRPC3 en la respuesta inflamatoria

El canal TRPC3 destaca por su activación directa mediada por el DAG, un segundo mensajero de naturaleza lipídica que puede ser generado por la enzima fosfolipasa C (PLC) a través de la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), o a través de la conversión directa por desfosforilación del ácido fosfatídico por parte de una familia de enzimas conocidas como Lipinas tras la estimulación de receptores de membrana como el TLR4 ^{8,12}.

Recientes hallazgos de relevancia en el campo exponen que la activación de TRPC3 puede darse no solo a través de DAG exógeno (como su análogo OAG), sino también gracias a la acción de DAG endógeno, producido por la Lipina-1 ^{13,31}. Estudios realizados en macrófagos humanos, THP-1, demuestran que la activación del canal TRPC3 por DAG generado por Lipina-1 es crítica tanto para el inicio como para la progresión de la respuesta inflamatoria tras la exposición a LPS, provocando un aumento sostenido de Ca^{2+} intracelular, que desemboca en la expresión de genes proinflamatorios como TNF- α , IL-6, IL-1 β y COX-2 ^{12,28}.

La entrada de Ca^{2+} a través del canal también es capaz de inducir estrés del retículo endoplásmico, orgánulo clave en la homeostasis celular, activando la respuesta UPR, que conlleva un aumento en la secreción de citocinas inflamatorias que pueden

Modelos *knock-out* de TRPC3 en macrófagos M1 procedentes de ratón, muestran una expresión transcriptómica altamente alterada, afectando a más de 150 genes (figura 1), algunos de ellos implicados en migración celular, señalización lipídica, sistema inmune, metabolismo mitocondrial y la ya mencionada respuesta UPR^{15,30}. Cabe recalcar que estos macrófagos presentaron un aumento en la migración dirigida hacia CCL2, citocina quimioatrayente para los macrófagos, lo que sugiere que la no presencia del canal afecta también al correcto funcionamiento celular^{15,16,32}.



Regulación negativa de TRPC3 por PKC

Página | 4

mecanismos de regulación negativa postraduccion del canal, especialmente la fosforilación inhibidora provocada por las protein quinasas C (PKCs), punto central para este trabajo ^{8,17}.

Las PKCs son una familia de serin/treonin quinasas ampliamente conservadas, capaces de mediar respuestas celulares rápidas ante señales tanto lipídicas como proteicas ^{18,33}. Dentro de esta familia podemos distinguir tres grupos (figura 2) ¹⁸.

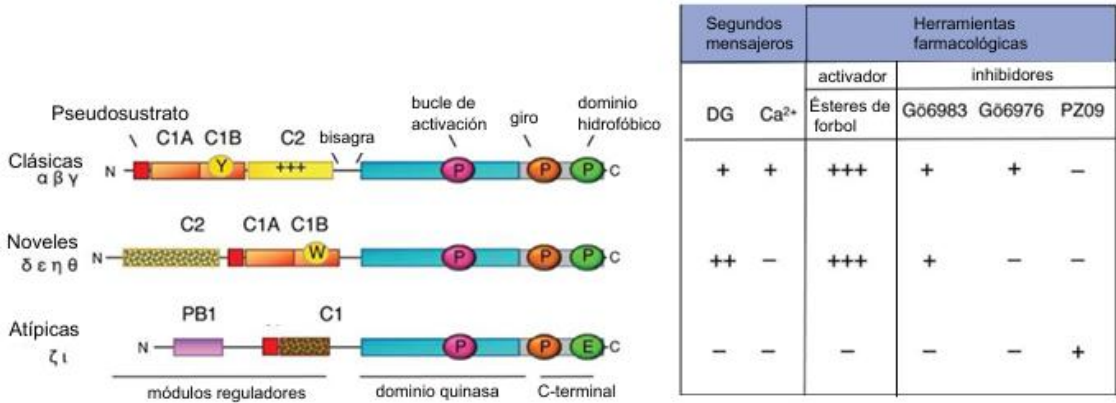


Figura 2. Representación esquemática de la clasificación de las PKC. Todas las isoformas comparten un dominio quinasa en el extremo C-terminal, mientras que difieren en el dominio N-terminal o región reguladora. Se indican los segundos mensajeros y fármacos que regulan su actividad. Adaptado de Newton, A. C. Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, and Macromolecular Interactions. Chem. Rev. **101**, 2353–2364 (2001).

- PKCs clásicas (cPKC), donde se incluyen PKCα, PKCβI/βII y PKCγ. Su activación requiere Ca²⁺, DAG y fosfatidilserina ^{18,34}.
- PKCs noveles (nPKC), como PKCδ, PKCε, PKCη y PKCθ, sensibles a DAG ^{18,34}.
- PKCs atípicas (aPKC): PKCζ y PKCι/λ. No responden ni al Ca²⁺ ni a DAG, sino que se activan a través de interacciones con proteínas como CDC42, PAR6 o p62 ^{18,34}.

La activación de las PKC clásicas y noveles, pasa por la unión de DAG a sus dominios C1 ^{18,19}. Este fenómeno provoca un cambio conformacional que libera su pseudosustrato autoinhibitorio, adquiriendo una conformación funcional, capaz de fosforilar sustratos específicos ^{18,19}.

Una vez descrita la relevancia de TRPC3, debemos comprender los mecanismos de regulación de este canal, donde se destaca el papel de la fosforilación del residuo Ser712 por las PKC, que se ha descrito que reduce significativamente la actividad del canal, limitando la entrada sostenida de Ca²⁺ al citosol ^{8,17}.

El mecanismo descrito consta de una retroalimentación negativa donde la acumulación de DAG activa a las PKCs ¹⁷. en modelos donde se expresa una mutación en la que no se fosforila el residuo Ser712 (TRPC3-S712A) se produce un aumento en la actividad basal del canal, manteniendo la entrada de Ca²⁺ ¹⁷.

Aunque encontramos diversas isoformas de PKC que podrían estar implicadas en esta regulación negativa por fosforilación. Este trabajo se propone estudiar la implicación de las distintas isoformas de PKC en la regulación del canal a través de aproximaciones experimentales, explorando un posible mecanismo molecular de interés patológico y una posible vía terapéutica para controlar la inflamación mediada por canales iónicos ³⁶.

Hipótesis y objetivos

El canal TRPC3 se postula como un elemento central en la respuesta inflamatoria producida por macrófagos, actuando como un efector del DAG producido por la Lipina-1, controlando la homeostasis de Ca^{2+} intracelular ^{8,37}. El canal se asocia con la expresión de factores de transcripción relevantes como NF- κ B y con la sobreexpresión de mediadores proinflamatorios, como TNF- α , IL-6, IL-1 β o COX-2 ⁸.

Este trabajo se propone explorar el mecanismo por el cual la fosforilación dependiente de PKCs regula negativamente la actividad de TRPC3, bajo la hipótesis de que es aún desconocida la o las isoformas de PKC responsables de este proceso y que su acción modula la respuesta inflamatoria en macrófagos humanos. ^{8,39}

Los objetivos específicos del trabajo son:

- i. Estudiar el papel funcional del canal TRPC3 en la respuesta inflamatoria mediada por señales lipídicas en macrófagos humanos.
- ii. Analizar la implicación de mecanismos de regulación negativa postraducciona l en la modulación de la actividad de TRPC3 durante la activación inflamatoria.
- iii. Evaluar el posible papel de isoformas específicas de la familia PKC, en la regulación de TRPC3 y su impacto sobre la señalización intracelular dependiente de Ca^{2+} .
- iv. Caracterizar las consecuencias funcionales de la pérdida o desregulación de TRPC3 sobre la expresión de mediadores inflamatorios y la homeostasis celular en modelos de macrófagos.

Materiales y métodos

Análisis RNAseq

Para el análisis de los datos de RNA-seq GSE87478, las secuencias se alinearon con el genoma de referencia del ratón (GRCm39, genes y transcritos de Ensemble) utilizando el software Dr.Tom (<https://www.bgi.com/us/dr-tom/>). La expresión génica diferencial se llevó a cabo con la normalización DESeq2 para facilitar la comparación de transcritos entre muestras, considerando un cambio en la expresión (fold change) >2.0 y aplicando la corrección de pruebas múltiples de Benjamini-Hochberg con una tasa de descubrimiento falso del 5% (valor p ajustado <0.05). Las anotaciones génicas fueron proporcionadas por la base de datos NCBI Entrez Gene. El análisis de enriquecimiento de genes sobre- o subrepresentados se realizó mediante análisis de Ontología Génica (GO). Se llevó a cabo un análisis adicional de rutas biológicas y redes moleculares con la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG).

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se emplearon líneas celulares humanas y murinas relevantes para el estudio de respuestas inmunes e inflamatorias.

La línea monocítica humana THP-1 WT (tipo salvaje, sin edición génica) fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC). Estas células, derivadas de una leucemia monocítica aguda, crecen en suspensión, aunque son fácilmente diferenciables a macrófagos adherentes mediante diversos estímulos químicos, y tienen un origen hematopoyético, lo que las convierte en un modelo ampliamente aceptado para el estudio de la activación inflamatoria ⁴⁰.

La línea THP-1 KO para TRPC3 (TRPC3-KO) fue generada mediante edición génica con tecnología CRISPR/Cas9, utilizando una mezcla de guías específicas sintetizadas (Synthego Express) dirigidas al gen humano TRPC3 (ID: 7223). La eficacia de la edición fue evaluada mediante ensayo de endonucleasa T7 y confirmada por secuenciación Sanger seguida de análisis ICE (Inference of CRISPR Edits). Tras clonación por dilución límite, se validó la pérdida de expresión proteica de TRPC3 por Western blot utilizando anticuerpos específicos ⁴⁴.

Para el mantenimiento, ambas líneas THP-1 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific), complementado con: 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente), 2 mM de L-glutamina, 1 % de piruvato de sodio (NaPyr, 100 mM), 1 % de aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco) y 50 µM de β-mercaptoetanol (β-ME) (Sigma-Aldrich). Las células fueron mantenidas en un incubador humidificado a 37 °C con 5 % de CO₂.

Para la diferenciación a macrófagos, se utilizó PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) a una concentración final de 25 ng/ml durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el estímulo y las células permanecieron en reposo durante 48 horas adicionales para permitir su recuperación y reducir la activación basal inespecífica ⁴¹.

También se emplearon células HEK293-TLR4 (Invivogen, #293-htrlr4md2cd14), derivadas de células embrionarias de riñón humano y modificadas genéticamente para expresar TLR4/MD2/CD14 humanos. Esta línea adherente se cultivó en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de glutamina, 1 % de piruvato de sodio, 1 % de NEAA, además de los antibióticos selectivos blasticidina (5 µg/ml) e higromicina B (25 µg/ml) para mantener la expresión

estable de los receptores. Las células se subcultivaron dos veces por semana mediante incubación con EDTA 1 mM en PBS.

Finalmente, se utilizaron macrófagos murinos peritoneales derivados de las cepas BALB/cJ (WT) y BALB/cByJ-Lpin1^{fl/d}, estabulados en el animalario de la Universidad de Valladolid. Estas variantes presentan un fondo genético común, pero difieren en la expresión de Lipina-1, cuya pérdida funcional en la cepa *fl/d* altera la señalización mediada por DAG y la respuesta inflamatoria ⁴³.

Generación de vectores de expresión para TRPC3 y mutantes

Para el estudio funcional de TRPC3, se utilizaron plásmidos de expresión lentiviral basados en el vector pCDH-CMV-MCS-EF1α-copGFP. Los constructos codificaban TRPC3 humano fusionado a eYFP (pCDH-CMV-eYFP-TRPC3), facilitando estudios de localización subcelular e interacción proteica por microscopía de fluorescencia y FRET. El promotor CMV permitió una expresión robusta y ubicua en células humanas.

Las variantes utilizadas fueron:

- WT: canal TRPC3 funcional completo.
- S712A: mutante no fosforilable en la serina 712, punto clave en la regulación por PKCs. Esta mutación fue introducida mediante mutagénesis dirigida con el kit Quick-Change XL (Stratagene) y confirmada por secuenciación.

Adicionalmente, se utilizaron constructos para expresar el fragmento amino-terminal de TRPC3 (residuos 1-321), así como sensores FRET como el camaleón de Ca²⁺ vY4er dirigido al retículo endoplasmático, y constructos de PKCs-mCherry, generosamente donados por colaboradores nacionales e internacionales.

Todos los insertos provenientes de TRPC3 fueron amplificados mediante PCR con adición de sitios de restricción 5'Xba-I y 3'Sal-I, sustituyendo el gen copGFP del vector original. La calidad y orientación de los insertos fue validada mediante secuenciación.

Transfección y silenciamiento génico

La introducción de plásmidos y siRNA en células THP-1 y HEK293-TLR4 se realizó por métodos distintos según el tipo celular.

En células THP-1 diferenciadas, se utilizó el reactivo INTERFERin (Sartorius) siguiendo las indicaciones del fabricante, brevemente se mezclaron 50 nM siRNA con 15 µl de reactivo para formar los complejos que se añadieron a las células THP-1 sin diferenciar, 24 h después se diferenciaron con 25 ng/ml de PMA durante 24h y se dejaron descansar sin PMA otras 24 h. El experimento se realizó a las 72 h.

En células HEK293-TLR4, la transfección se llevó a cabo utilizando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) para plásmidos. Las proporciones de ADN:Lipofectamina fueron de 1:2, y las células fueron incubadas entre 24 y 48 horas antes de los análisis funcionales.

Medida de biosensores basados en FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) en microscopio de fluorescencia invertido

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio tratados con poli-L-lisina, y mantenidas en medio HBSS suplementado con 10 mM HEPES (pH 7,4), 1,3 mM CaCl₂, 1,3 mM MgCl₂. La estimulación se realizó con LPS (1 µg/ml) en el caso de células HEK-TLR4 o 200 ng/ml en el caso de macrófagos, tras un periodo basal de 2 min. Las adquisiciones se realizaron a 37 °C con un sistema Leica Dmi8 y objetivo de inmersión en aceite 63x/1.3 NA.

Se utilizaron filtros específicos para CFP (exc: 430/24 nm; em: 470/24 nm), YFP (exc: 500/20 nm; em: 535/30 nm), y FRET (exc: CFP, em: YFP). La adquisición multicanal fue casi simultánea (20 ms de diferencia entre canales).

La eficiencia de FRET se analizó como cociente ratiométrico FRET/CFP (vYC4er), procesando las imágenes con ImageJ y plugins personalizados para corrección de fondo y movimiento.

Fotoblanqueo del aceptor para FRET

La interacción entre TRPC3 y PKCε fue evaluada mediante ensayos de FRET en células fijadas. Se utilizaron células HEK-293-TLR4 transfectadas con TRPC3-eYFP (donador) y PKCε-mCherry (aceptor).

Para confirmar las interacciones, se realizaron ensayos de fotoblanqueo del aceptor en un sistema confocal Leica TCS SP5X. Se utilizó excitación a 580 nm para fotoblanquear mCherry (~80 % de reducción), registrando el aumento subsecuente de fluorescencia de eYFP.

Las intensidades pre y post-blanqueo se analizaron con el complemento AccPbFRET de ImageJ, calculando la eficiencia de FRET con la fórmula:

$$E = (D_{\text{post}} - D_{\text{pre}}) / D_{\text{post}}$$

Los controles incluyeron células que expresaban únicamente eYFP y mCherry por separado o como proteína de fusión, además de regiones no blanqueadas para control interno.

Fagocitosis sincronizada y análisis de inmunocitoquímica

La fagocitosis se evaluó utilizando zymosan (0,5 mg/ml), manteniendo las células en hielo durante 15 minutos para permitir la unión superficial. Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 1 o 5 minutos para inducción de entrada sincronizada. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Para inmunotinción intracelular de TRPC3 y PKCε endógenos, se permeabilizó con Triton X-100 al 0,1 % durante 20 minutos, bloqueando con suero de cabra al 5 %. La incubación con anticuerpos primarios (TRPC3, Alomone Labs y PKCε, Cell Signaling) se realizó durante la noche, seguida de incubación de una hora con fragmentos Fab-Alexa (Molecular Probes). Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 (Invitrogen).

Las imágenes se adquirieron en un confocal Leica TCS SP5X, y fueron procesadas por deconvolución iterativa 3D en ImageJ.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total se extrajo de células THP-1 diferenciadas con PrimeZOL™ (Canvax Biotech), siguiendo el protocolo clásico basado en fenol/guanidina. La calidad del ARN fue asegurada mediante extracción con cloroformo e isopropanol, seguido de lavados con etanol al 75 %.

La síntesis de ADNc se realizó con el kit Verso™ (Thermo Fisher), utilizando 1 µg de ARN, cebadores oligo(dT), dNTPs, transcriptasa reversa y tampón con MgCl₂. Las condiciones fueron: 42 °C durante 60 minutos e inactivación enzimática a 92 °C durante 2 minutos.

PCR cuantitativa (qPCR)

Se empleó el sistema PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) en un equipo ABI7500, en un volumen total de 10 µL por reacción. Cada mezcla contenía 20 ng de ADNc y 0,5 µL de cebadores específicos (10 µM). El gen de referencia fue ACTB (β-actina).

El programa fue: 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 12 s, 60 °C por 16 s y 72 °C por 28 s. Se aplicó el método $\Delta\Delta C_t$ para el análisis relativo de expresión de los genes *TNFA*, *IL6* y *PTGS2* utilizando el gen *ACT1NB* como referencia.

Ensayo ELISA para prostaglandina E2

La prostaglandina E₂ (PGE₂) es un mediador lipídico derivado del ácido araquidónico mediante la acción secuencial de las enzimas ciclooxigenasa (COX) y prostaglandina E sintasa (PGES)⁴⁵. Su producción se incrementa de forma aguda en respuesta a estímulos proinflamatorios, como el lipopolisacárido (LPS)^{45,46}. Por ello, la cuantificación de PGE₂ en sobrenadantes de cultivo celular representa una herramienta vital para evaluar el grado de activación inflamatoria.

La cuantificación de PGE₂ se realizó mediante un ensayo ELISA competitivo utilizando el kit *Prostaglandin E₂ Express ELISA* (Cayman Chemical, ref. 500141). Este ensayo se basa en la competición entre la PGE₂ presente en la muestra y una PGE₂ conjugada a acetilcolinesterasa por una cantidad limitada de un anticuerpo monoclonal anti-PGE₂. A menor concentración de PGE₂ en la muestra, mayor será la señal obtenida, ya que se unirá un mayor número de moléculas de PGE₂ con acetilcolinesterasa.

Las muestras fueron procesadas conforme a las recomendaciones del fabricante.

Extracción de proteínas e inmunodetección por Western blot

Para analizar la expresión proteica mediante Western blot, se procedió a la lisis celular con un tampón no desnaturante, formulado para preservar la integridad de las proteínas y minimizar la actividad enzimática. La composición final incluyó: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM Na₄P₂O₇, 50 mM β-glicerofosfato, 10 mM NaF, 270 mM sacarosa, 0,1% β-mercaptoetanol, 1 mM ortovanadato sódico (Na₃VO₄), 1 mM PMSF y un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma). Este tampón se preparó en frío y los inhibidores fueron añadidos justo antes de la lisis.

Las células cultivadas en placas de seis pocillos fueron lavadas con PBS frío, recolectadas por raspado y lisadas con 50 µl de tampón por pocillo, según densidad celular. La incubación se realizó en hielo durante 30 minutos, seguida de centrifugación a 300 ×g durante 15 minutos a 4 °C para separar el sobrenadante proteico.

La cantidad de proteína total se cuantificó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bio-Rad), utilizando una curva estándar con albúmina sérica bovina (0–20 µg/µl). La absorbancia se midió a 595 nm y las concentraciones se interpolaron mediante ajuste lineal.

Las muestras fueron mezcladas con tampón Laemmli 4X para quedar a 1X, seguido de incubación a 95 °C durante 5 minutos para lograr la desnaturalización completa.

La separación proteica se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE al 10%, y la posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa se realizó por electrotransferencia húmeda con tampón TGM (Tris, glicina y metanol) a 300 mA durante 90 minutos a 4 °C.

El bloqueo se efectuó con gelatina de pescado al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios específicos:

- Anti-TRPC3 (conejo).
- Anti-β-actina (ratón), como control de carga.

Para la detección, se usaron anticuerpos secundarios fluorescentes:

- Anti-conejo IRDye 800CW (Li-Cor, 1:5000).
- Anti-ratón IRDye 680RD (Li-Cor, 1:5000).

Las señales fueron detectadas y cuantificadas mediante el sistema infrarrojo LI-COR Odyssey Fc, que permite análisis simultáneo en canales de 700 y 800 nm, garantizando alta sensibilidad y amplio rango dinámico.

Electroforesis en gel de agarosa

Esta técnica se emplea para la separación de ácidos nucleicos basada en el peso molecular, basada en la migración diferencial de fragmentos de ácidos nucleicos a través de una matriz porosa de agarosa al someterse a un campo eléctrico. A menor tamaño del fragmento, más rápida será su migración hacia el polo positivo.

La composición de los geles es de: agarosa al 1,5% (p/v), fundida en 40 ml de buffer TAE 1X (Tris-acetato-EDTA). La mezcla incluyó 0,6 g de agarosa y se complementó con 4 µl de GelRed a 10.000X, un agente intercalante fluorescente que permite la visualización directa del ADN bajo luz UV, evitando la necesidad de tinción posterior.

El TAE 1x es también empleado como buffer de migración durante el proceso, además, se cargan marcadores de peso molecular para facilitar el análisis de los resultados. La electroforesis se ejecuta a 70 voltios inicialmente y se sube hasta los 100 V para dejarlo correr por una hora aproximadamente.

La visualización de los resultados se llevó a cabo mediante luz ultravioleta (UV) utilizando un transiluminador, observándose bandas fluorescentes correspondientes a los fragmentos de interés.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como medias ± error estándar de la media (SEM), indicando réplicas biológicas individuales. No se utilizó ningún análisis estadístico previo para determinar el tamaño de muestra. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba t de Student no pareada y bilateral; en los casos en que las varianzas fueron significativamente diferentes, se aplicó la corrección de Welch. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con valores de $p \leq 0,05$. Para el procesamiento de imágenes y cuantificaciones se empleó ImageJ.

Resultados

Suprimir el canal TRPC3 altera el perfil transcriptómico inflamatorio

Para comenzar, se estudió el impacto del TRPC3 en la fisiología de los macrófagos mediante un re-análisis transcriptómico de los datos de RNA-seq en células THP-1 WT y TRPC3-KO obtenidos en el repositorio Gene Expression Omnibus (GEO); GSE accesion number GSE87478.

El análisis de los datos transcriptómicos reveló más de 150 (95 al alza, 56 a la baja) genes diferencialmente expresados (DEGs) en las células TRPC3-KO en comparación con las WT. Los cambios afectaron rutas relacionadas con la migración celular, la señalización por Ca^{2+} el sistema inmune, el metabolismo mitocondrial, la respuesta UPR y el metabolismo lipídico donde se identificaron alteraciones significativas en genes involucrados en quimiotaxis, adhesión, remodelado del citoesqueleto y señalización^{14,30}.

Estos resultados están representados gráficamente en las figuras 1 y 3, que muestran un diagrama tipo *volcano plot* con la distribución de genes activados y reprimidos en función de su significancia estadística y magnitud de cambio, y en la figura 4, se llevó a cabo un análisis de vías KEGG que permitió identificar procesos celulares afectados por la eliminación de TRPC3, destacando vías implicadas en el metabolismo lipídico, la transducción de señales y la respuesta del sistema inmune.

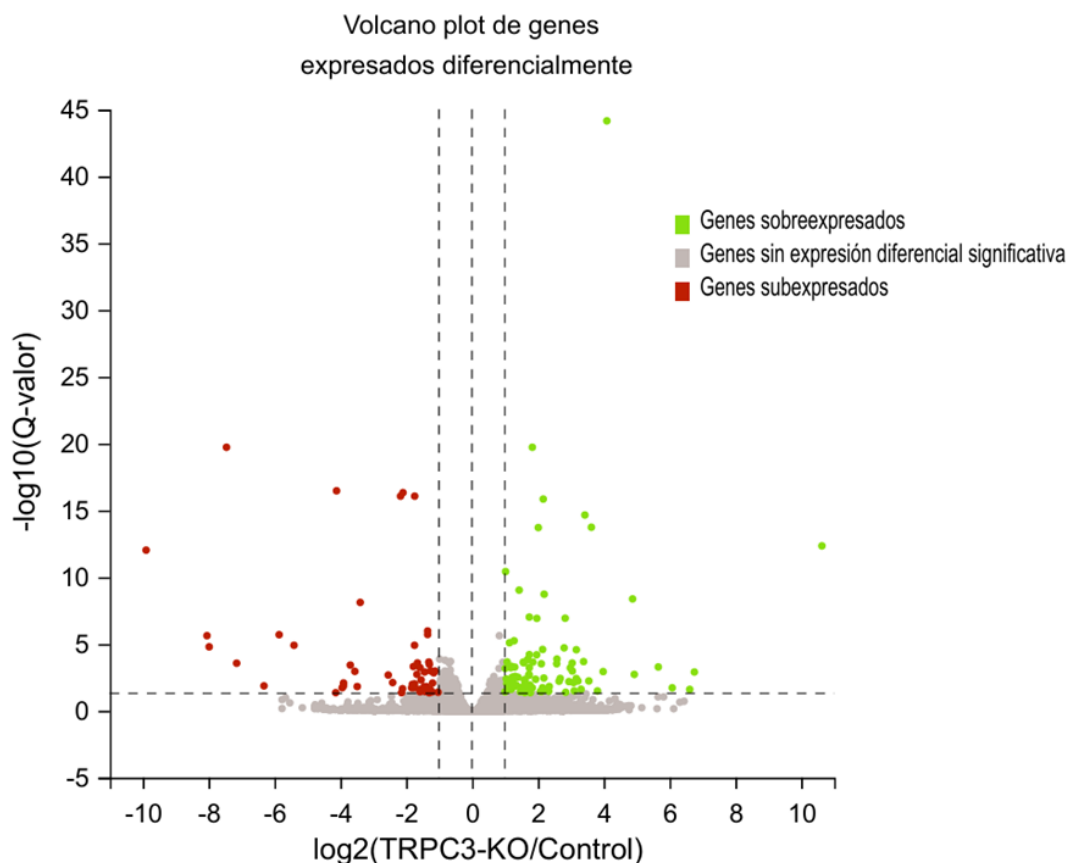


Figura 3. Representación de la regulación génica en THP-1 TRPC3-KO. Se muestra un volcano plot representando los genes diferencialmente expresados tras la eliminación de TRPC3. En el gráfico se visualiza la distribución de genes regulados positiva y negativamente en función de su significancia estadística ($-\log_{10}$ q-valor) y magnitud de cambio ($\log_2$ TRPC3-KO/Control).

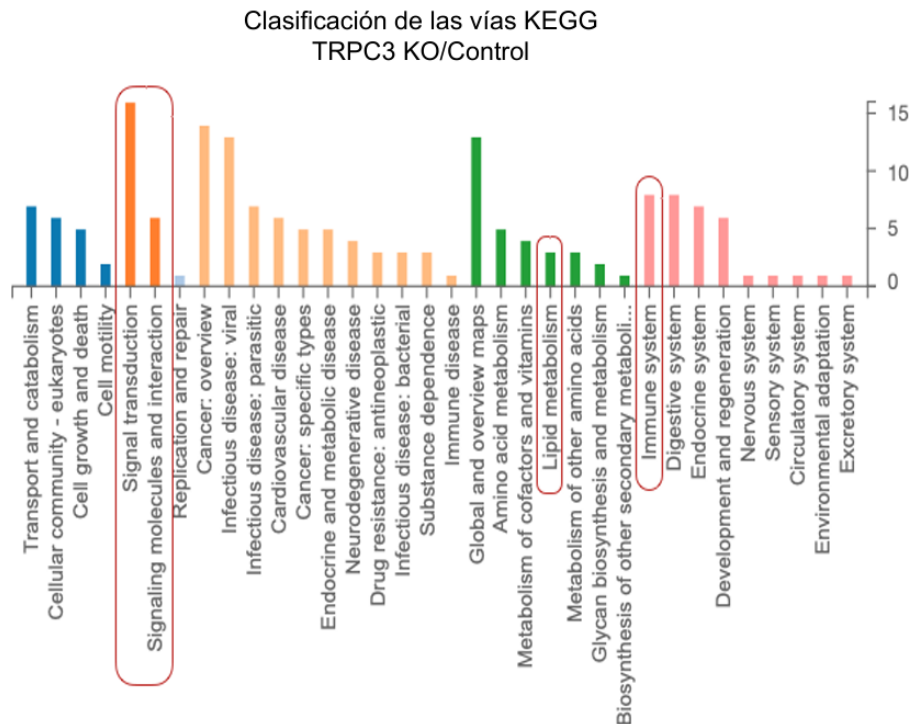


Figura 4. Representación vías KEGG. Diagrama de barras en el que se reflejan las diferentes rutas estudiadas en el eje X mientras el eje Y indica el número de genes diferencialmente expresados asociados a cada una de ellas, al comparar macrófagos TRPC3-KO con su control.

La delección de TRPC3 disminuye la respuesta inflamatoria en macrófagos humanos

Estudios previos utilizando inhibidores químicos y RNA de interferencia han demostrado *in vitro* que TRPC3 participa en la señalización proinflamatoria promovida por la estimulación de los macrófagos con LPS ^{8,12,28}. Esta participación depende de la activación del canal por DAG endógeno favoreciendo la entrada sostenida de Ca^{2+} , y con ello, la activación de vías de señalización como NF- κ B, promoviendo la sobreexpresión de genes proinflamatorios como TNF- α , IL-6 y COX-2 ^{8,12,28}.

Con el fin de comprobar la hipótesis de partida, se emplearon células monocíticas humanas THP-1, carentes de TRPC3 tras su modificación genética mediante tecnología CRISPR/Cas9. La delección de este gen fue comprobada a través de inmunodetección proteica en la que, efectivamente, en algunos clones se aprecia la no expresión de la proteína TRPC3 mediante la ausencia de la banda correspondiente a su peso molecular, como podemos ver en la figura 5:

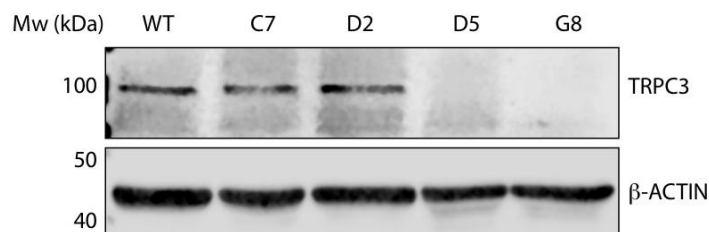


Figura 5. Western blot de TRPC3 en THP-1 control y en distintos clones *Trpc3* KO, empleando β -actina como control de carga.

Una vez confirmado el *knock-out*, tanto las células WT como las KO (D5) fueron tratadas con LPS, para analizar la expresión de genes proinflamatorios mediante qPCR, así como la producción de mediadores lipídicos en sus sobrenadantes.

Los resultados de esta estimulación mostraron cómo, en las células WT que sí expresan el canal, el tratamiento con LPS produjo un aumento significativo en los niveles de expresión de *PTGS2*, *TNFA* e *IL6* mientras que la respuesta en las células KO estaba severamente reducida, como se observa en la figura 6.

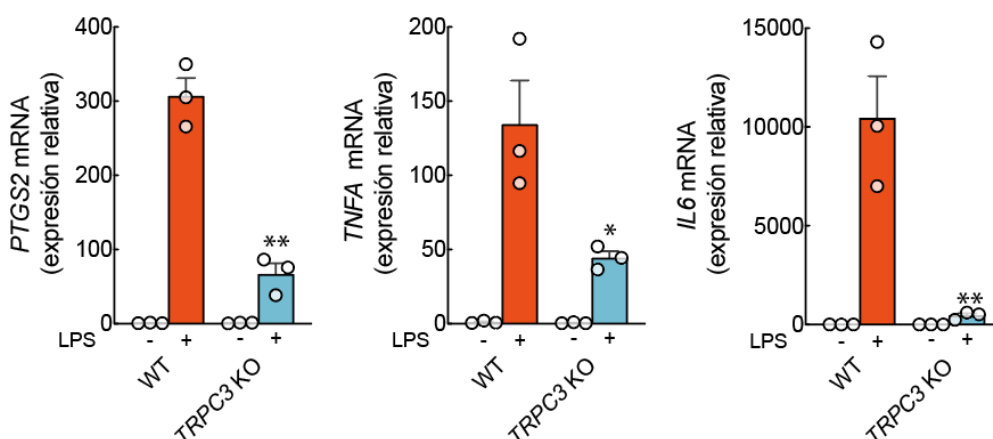


Figura 6. Expresión de genes proinflamatorios. Representación gráfica de la expresión relativa, en células THP-1, de diferentes genes proinflamatorios (*PTGS2*, *TNF- α* , *IL-6*) en THP-1-TRPC3-KO (azul) y wt (rojo), con y sin tratamiento con LPS durante 4 h. Los datos se presentan como medias $\pm$ error estándar de muestras independientes ($n=3$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (mediante el test estadístico *t* de Student).

Aunque indicativo, los cambios en los niveles de RNA mensajero no aseguran que se produzcan los mismos cambios a nivel proteico. Por eso se constató una amplia reducción en los niveles de prostaglandina E_2 , derivado de la acción de la ciclooxigenasa y PGE sintasa, a través de la cuantificación por ELISA ^{12,45}. Estos hallazgos quedan reflejados en la figura 7, donde vemos una caída abrupta en la secreción de PGE_2 tras la eliminación del canal.

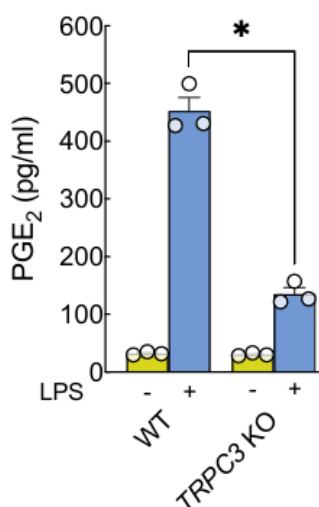


Figura 7. Resultados ELISA competitiva PGE_2 . Diagrama de barras donde se refleja la diferencia en la secreción de PGE_2 , entre THP-1-TRPC3-KO y wt, con (azul) y sin tratamiento (amarillo) con LPS durante 4 h. Los datos se presentan como medias $\pm$ error estándar de muestras independientes ($n=3$). * $p < 0,05$ (mediante el test estadístico *t* de Student).

Estos cambios significativos en la señal proinflamatoria refuerzan la hipótesis de que el canal TRPC3 está implicado en dicha vía, regulando su funcionamiento fisiológico en respuesta a LPS ^{8,12}.

La mutación en Ser712 impide la regulación de TRPC3 incrementando la inflamación

Investigaciones anteriores han sugerido que la fosforilación del residuo Ser712 de TRPC3 podría estar implicada en la regulación negativa de la actividad del canal, representando un mecanismo de regulación postraduccional del mismo. Este residuo resulta ser una diana específica para las PKCs y su fosforilación se asocia con un cierre funcional del canal ^{17,38}. Dentro de este contexto, se planteó la hipótesis de que la sustitución de esta serina por una alanina no fosforilable, generaría un mutante (S712A) que, al no poder fosforilarse, hiperactivaría el canal provocando una fuerte señal proinflamatoria.

A través de la microscopía de fluorescencia confocal, se pudo evaluar la localización subcelular antes y después de la estimulación con LPS. El canal WT se distribuyó por la membrana plasmática y endomembranas como ya ha sido reportado, mientras que el mutante S712A sufre una acumulación en la membrana plasmática, indicando un papel en la localización subcelular del canal, quedando representado en la figura 8:

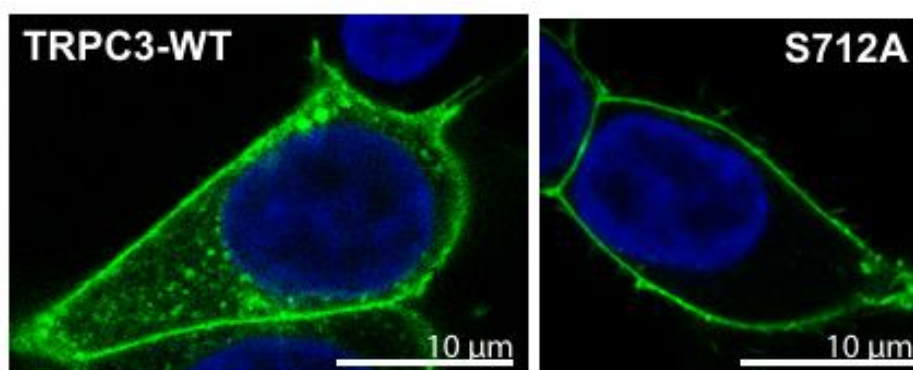


Figura 8. Análisis de localización subcelular en microscopía de fluorescencia confocal. Las imágenes muestran la localización subcelular de TRPC3 en células HEK293-TLR4 expresando TRPC3-WT-eYFP o TRPC3-S712A-eYFP tras estimulación con LPS. El núcleo está teñido en azul (Hoechst 33342).

Funcionalmente, se cuantificaron los niveles de expresión de *TNFA* y *PTGS2* tras estimulación con LPS en células HEK-TLR4 que sobreexpresaban TRPC3-WT o el mutante S712A. Los resultados mostraron que las células que expresaban TRPC3-S712A incrementaban la expresión de los genes *TNFA* y *PTGS2* en mayor medida que las células que expresaban TRPC3-WT indicando un aumento de la respuesta inflamatoria. Estos datos se presentan en la figura 9 a, además, el análisis de las fluctuaciones de Ca^{2+} en el RE mostró una entrada constitutiva de Ca^{2+} en células con sobreexpresión del mutante TRPC3-S712A previo a la estimulación con LPS, fenómeno que no se observaba en células wt o en células que expresaban el fragmento N-ter de TRPC3 que actúa como dominante negativo (figura 9 b).

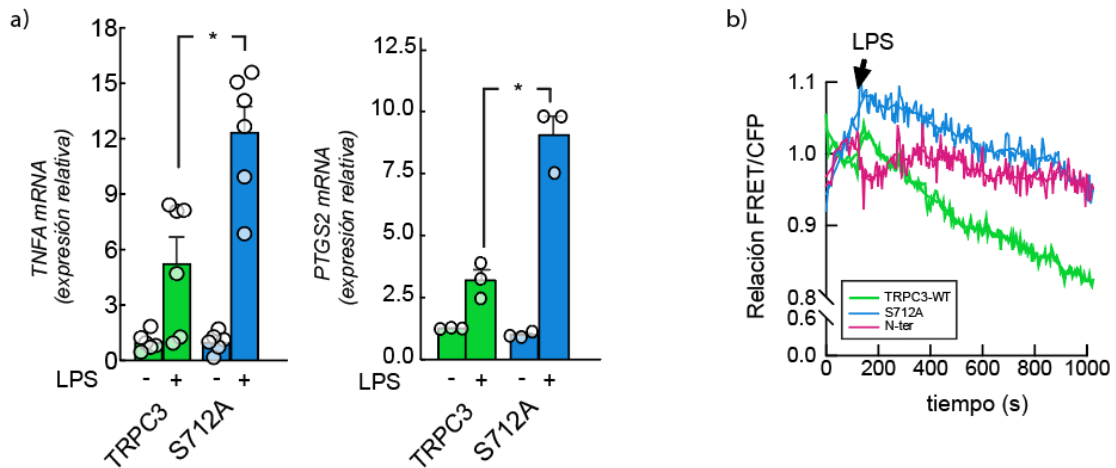


Figura 9. Incremento de la respuesta inflamatoria y señal de Ca²⁺ en células HEK293-TLR4 que expresan TRPC3-S712A tras estimulación con LPS. a) Representación gráfica en un diagrama de barras donde aparece la expresión relativa de TNF-α y PTGS2 en el fenotipo wt (verde) y S712A (azul), con y sin tratamiento con LPS. Los datos se presentan como medias ± error estándar de muestras independientes. *p < 0,05 (mediante el test estadístico t de Student). b) Cuantificación de los niveles de Ca²⁺ en el RE en función del tiempo, tras la estimulación con LPS, comparando los grupos wt (verde), S712A (azul) y N-ter (morado).

A la luz de estos datos, podemos afirmar que la fosforilación del residuo Ser712 es relevante en la regulación negativa del TRPC3, ya que la mutación TRPC3-S712A impide la inactivación fisiológica del canal, desregulando la homeostasis de Ca²⁺, e incrementando la respuesta inflamatoria^{8,17,38}.

Varias isoformas de PKC cambian su localización subcelular tras la estimulación con LPS

La hipótesis que se plantea en este trabajo es identificar, si la hubiera, la PKC más relevante en el proceso proinflamatorio mediado por el TRPC3. A continuación, se realizó un análisis de localización subcelular de diferentes isoformas de la PKC, tras tratamiento con LPS, y se observó cómo la PKC α se transloca a la membrana plasmática, mientras que la PKC ϵ se dirige preferentemente a regiones perinucleares y al retículo endoplásmico, compartimento donde también se localiza funcionalmente TRPC3^{8,12}. El resto de isoformas de PKC analizadas en estas condiciones no parecen variar su localización. Estos datos se representan figura 10.

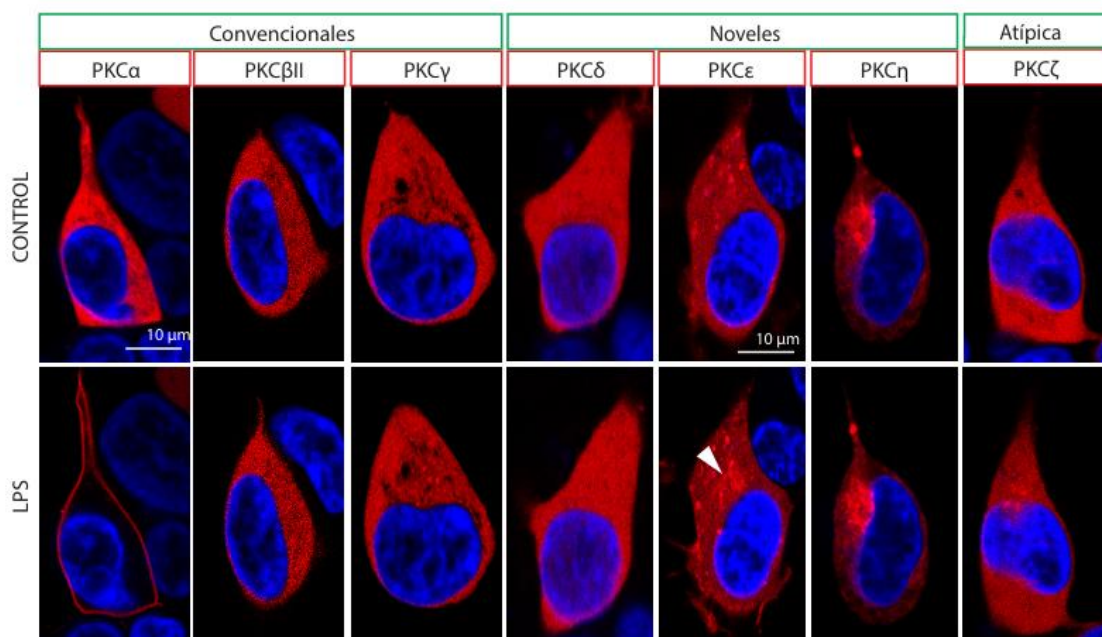


Figura 10. Localización subcelular de las isoformas de PKC en respuesta a LPS. Análisis de localización de las diferentes isoformas de la PKC tras la exposición a LPS, en células HEK293-TLR4 que expresaban las distintas isoformas de PKC fusionadas a mCherry (rojo) donde el núcleo aparece en azul (Hoechst 33342).

Por ello, nos centramos en el estudio de la PKC α y PKC ϵ ya que las otras no experimentan cambios tras la estimulación.

Para intentar distinguir el papel de PKC α y PKC ϵ se estudió la dinámica de Ca²⁺ del RE, en células tratadas con inhibidores con diferente especificidad para estas subclases: Gö6976 que inhibe cPKCs, y Gö6983 que inhibe cPKCs y nPKCs.

Los resultados mostrados en la figura 11 indican que tan solo el inhibidor Gö6983 recapitulaba el comportamiento del mutante TRPC3-S712A (figura 9b). Estos resultados indican que debe haber una PKC novel implicada en la regulación negativa del canal TRPC3.

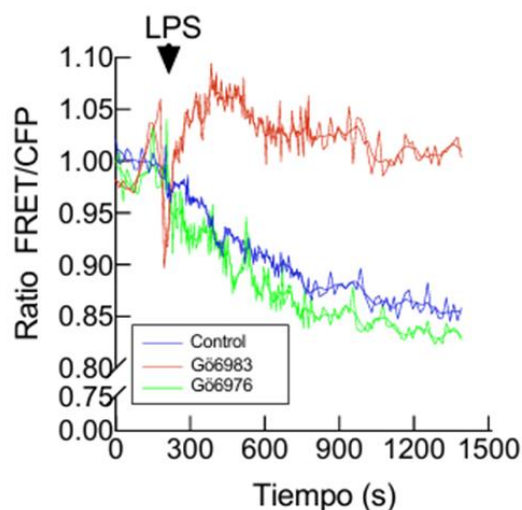


Figura 11. Efecto de los inhibidores específicos de PKC. Se señalan los cambios de la relación FRET/CFP a lo largo del tiempo, tras la estimulación con LPS, de los grupos control, Gö6983 (PKC noveles) y Gö6976 (PKC clásicas), en células HEK293-TLR4.

La activación de PKC está estrictamente regulada y suele ser de corta duración, lo que conduce a una fosforilación rápida pero transitoria de sus sustratos ^{17,34}. Esta fosforilación a menudo es revertida rápidamente por fosfatasas celulares, lo que dificulta capturar dichas interacciones mediante ensayos tradicionales de inmunoprecipitación. En el caso de TRPC3 y PKC, esta naturaleza transitoria sugiere que la inmunoprecipitación puede no ser el método más adecuado para estudiar su interacción.

Como se muestra en la figura 12, la redistribución subcelular de las isoformas de PKC parece ser un mecanismo regulador clave durante la estimulación con LPS. Por ello, se decidió emplear ensayos FRET para monitorizar la interacción entre TRPC3 e isoformas específicas de PKC en ensayos por microscopía confocal en células fijadas. Con este fin, coexpresamos TRPC3-eYFP junto con PKC α -mCherry o PKC ϵ -mCherry, tratamos las células con PMA durante 10 minutos para inducir la máxima translocación de PKC a la membrana, ya que este es un potente análogo del DAG y luego analizamos la eficiencia FRET mediante fotoblanqueo del aceptor (mCherry) para evaluar la proximidad y la posible interacción. Los resultados mostraron que PKC α interactúa con TRPC3 en la membrana plasmática, mientras que PKC ϵ interactúa con TRPC3 en endomembranas. El control positivo de FRET consistió en una proteína de fusión eYFP-mCherry y un control negativo de eYFP y mCherry coexpresados por separado.

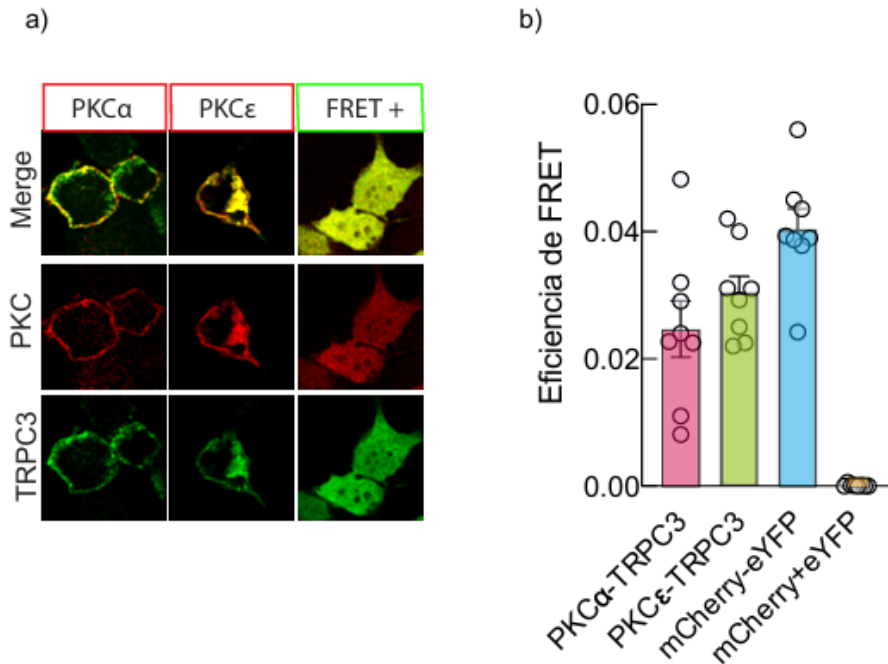


Figura 12. Colocalización y análisis de FRET entre PKCs y TRPC3. a) Análisis de colocalización de TRPC3 (verde) y las isoformas PKCα y PKCε, (rojo) mediante microscopía confocal y ensayo FRET, en HEK-TR4 estimulados con PMA. b) Gráfica de barras donde se representa la eficiencia de FRET. Los datos se presentan como medias ± error estándar de muestras independientes (n=8).

Ya que solamente PKCε parece cambiar su localización en respuesta a LPS e interacciona de manera directa con TRPC3 y para profundizar en el mecanismo de esta regulación negativa, se silenció PKCε mediante siRNA. La ausencia de PKCε provocó, de nuevo, un aumento claro en la entrada de Ca^{2+} a través de TRPC3 tras la estimulación con LPS. Es decir, al eliminar la acción de esta quinasa, se observa un aumento en la actividad del canal, posiblemente debida a una mayor localización en la membrana plasmática. El silenciamiento fue validado por Western blot (figura 13 a), y el incremento en la actividad del canal fue confirmado mediante la medición de la señal FRET del sensor camaleón de Ca^{2+} del RE (figura 13 b) ^{17,20}.

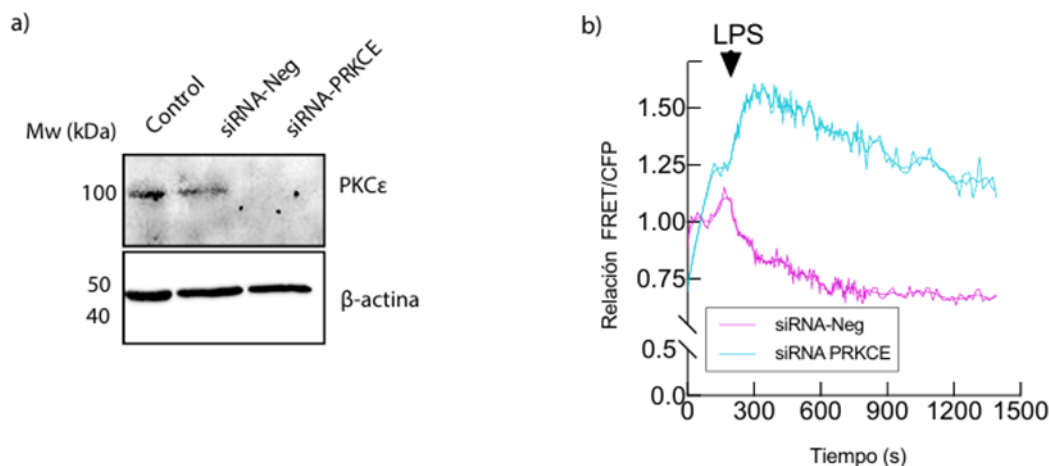


Figura 13. Efecto del silenciamiento de PKCε. a) Western blot para analizar la expresión de PKCε durante el silenciamiento génico de PRKCE en macrófagos THP-1, utilizando β-actina como control de carga y un control negativo para el silenciamiento (siRNA-Neg). b) Gráfico que representa la relación FRET/CFP en el transcurso temporal indicado, tras el tratamiento con LPS, comparando el siRNA-PRKCE con un control negativo.

Estos datos refuerzan la idea de que PKC ϵ funciona como un inhibidor de TRPC3, modulando su actividad mediante fosforilación del residuo Ser712. Gracias a este control, la célula evita una activación excesiva del canal y una respuesta inflamatoria desproporcionada, lo que demuestra la importancia de esta vía como mecanismo de contención dentro del sistema inmunológico innato ^{8,17,20}.

TRPC3 participa en la fagocitosis

Explorado el papel del canal TRPC3 en la regulación de la inflamación, se investigó otro proceso fisiológico de eliminación de patógenos como era su posible papel en la fagocitosis⁵⁰. Estudios recientes, sugieren que existe movilización del canal TRPC3 a los fagosomas durante la captación de partículas, regulada por señales dependientes de DAG generado por la Lipina-1^{8,12,31}.

Para ello se realizó un ensayo de fagocitosis sincronizada de partículas de zymosan, comparando la respuesta de macrófagos peritoneales provenientes de ratones wt o *fld*, empleando anticuerpos fluorescentes para su visualización mediante microscopía confocal.

Tal y como se aprecia en la figura 14, tras la estimulación con zymosan, las células WT presentaron una fuerte colocalización entre TRPC3 y PKC ϵ en la vesícula fagocítica, efecto que fue mucho menor en el caso de las *fld*.

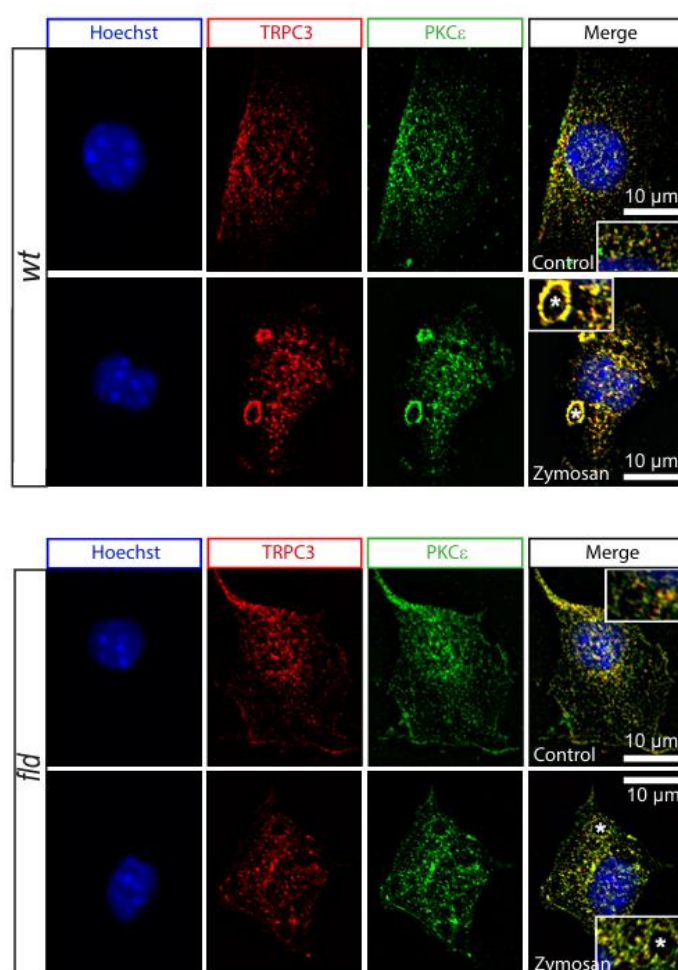


Figura 14. Ensayo de fagocitosis. Análisis de colocalización de TRPC3 y PKC ϵ en macrófagos, durante la fagocitosis de partículas de zymosan, comparando células wt (arriba) con células provenientes de animales *fld* (abajo). Las tinciones fluorescentes provienen de marcajes con anticuerpos anti-PKC ϵ (verde) y anti-TRPC3 (rojo). Los núcleos se marcaron con Hoechst 333342 (azul).

La colocalización estudiada en este ensayo demuestra que TRPC3 y PKC ϵ se localizan en la misma región durante las fases iniciales de la fagocitosis (formación de copa fagocítica). Esto sugiere que probablemente exista una relación funcional entre ambos, al no verse una relación tan estrecha cuando se analiza esta colocalización en macrófagos *fld*. Por ello, es posible que la generación de DAG por la Lipina-1 sea relevante a la hora de dirigir este proceso⁸.

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman el papel proinflamatorio del canal TRPC3 en macrófagos humanos diferenciados a partir de la línea THP-1, en consonancia con estudios previos que ya lo describían como un efector de la vía de señalización DAG-Lipina-1^{1,8}. En nuestro modelo, la eliminación de TRPC3 mediante edición génica en las THP-1, dió lugar a una marcada disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias tras la exposición a LPS, lo que coincide con la propuesta de que TRPC3 es necesario para activar el factor de transcripción NF- κ B y sostener la transcripción de genes proinflamatorios^{12,28}. Además, esta disminución se tradujo funcionalmente en una reducción significativa en la producción de prostaglandina E₂, mediador lipídico clave en la inflamación aguda, cuantificada mediante ELISA competitivo^{45,46}. La respuesta alterada de las células TRPC3-KO indica que la entrada de Ca²⁺ mediada por TRPC3 es un paso crítico para la activación del proceso inflamatorio, en línea con lo descrito en trabajos previos y respaldado por nuestros datos propios de expresión de PTGS2 y secreción de PGE₂¹⁴.

Además de su papel como canal de entrada de Ca²⁺, TRPC3 regula procesos más amplios relacionados con la fisiología del macrófago. Estudios transcriptómicos previos han demostrado que su ausencia altera la expresión de más de 150 genes asociados a la respuesta inmune, migración, metabolismo mitocondrial y estrés del retículo endoplásmico^{15,30}.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue validar la fosforilación en Ser712 como un mecanismo postraducciona negativo sobre TRPC3. La sobreexpresión del mutante S712A, que no puede ser fosforilado en dicha posición, resultó en un aumento significativo de la señal de Ca²⁺ basal del RE, incluso en ausencia de estímulo^{17,38}. Esto concuerda con estudios anteriores que indican que la fosforilación de Ser712 limita la apertura sostenida del canal y evita la entrada excesiva de Ca²⁺ al citosol. Por tanto, los datos obtenidos refuerzan la hipótesis de que la fosforilación de este residuo constituye un mecanismo fisiológico clave para evitar una inflamación patológica prolongada^{8,19}.

En estas condiciones, se ha descrito anteriormente la entrada constitutiva de Ca²⁺ al citosol y posteriormente al propio RE, estableciéndose un mecanismo compensatorio para proteger la homeostasis celular^{53,54}. La exposición a LPS de células que expresan TRPC3-S712A, provoca un aumento significativo de la producción de mediadores proinflamatorios como TNF α , hecho constatado a través de sus niveles de ARNm, reforzando la hipótesis de que la fosforilación en el residuo Ser712 no solo regula la actividad del canal, sino que controla su distribución subcelular, representando un mecanismo clave en la regulación de las vías proinflamatorias.

Otro hallazgo relevante es la identificación de PKC ϵ como la quinasa responsable de la fosforilación negativa de TRPC3. Diversas observaciones respaldan esta conclusión: en primer lugar, ensayos FRET realizados en células HEK-TLR4 mostraron una interacción directa entre TRPC3-eYFP y PKC ϵ -mCherry, lo que evidencia una proximidad funcional entre ambas proteínas. En segundo lugar, la inhibición de PKCs noveles mediante Gö6983 provocó la misma dinámica de Ca²⁺ de RE que el mutante S712A, mientras que el inhibidor Gö6976, más selectivo para PKCs clásicas, no tuvo efecto, lo que apunta a una regulación específica por parte de isoformas noveles como PKC ϵ ^{18,34}. Estos resultados son consistentes con el hecho de que PKC ϵ , altamente sensible al DAG, colocaliza con TRPC3 en el retículo endoplásmico, compartiendo compartimentos subcelulares estratégicos para la regulación de Ca²⁺^{20,35}.

El silenciamiento génico de PKC ϵ mediante siRNA específico también corroboró su implicación directa. A concentraciones de 50 nM, se observó una reducción prácticamente total de la expresión de PKC ϵ que, de nuevo, recapituló el papel del

mutante S712A en la fosforilación del canal, demostrando que es PKC ϵ quien actúa funcionalmente como modulador negativo de la actividad del canal ^{20,39}. Estos datos fueron reforzados por microscopía confocal, donde se observó la interacción de PKC ϵ con TRPC3, y la colocalización en fagosomas en etapas iniciales de fagocitosis de zymosan ^{14,20}.

El análisis conjunto de estas observaciones permite proponer un modelo de retroalimentación negativa en el que el DAG generado por Lipina-1 en compartimentos intracelulares activa tanto a TRPC3 como a PKC ϵ en macrófagos humanos estimulados con LPS, especialmente en regiones como el RE (figura 15). La actividad de PKC ϵ , a su vez, conduce a la fosforilación de Ser712 en TRPC3, cerrando el canal y controlando así la duración y magnitud de la señal de Ca²⁺ ^{8,17}. Este circuito de retroalimentación es esencial para mantener la homeostasis celular y evitar respuestas inflamatorias exageradas, como se ha demostrado en modelos de inflamación crónica y estrés celular ^{13,31}.

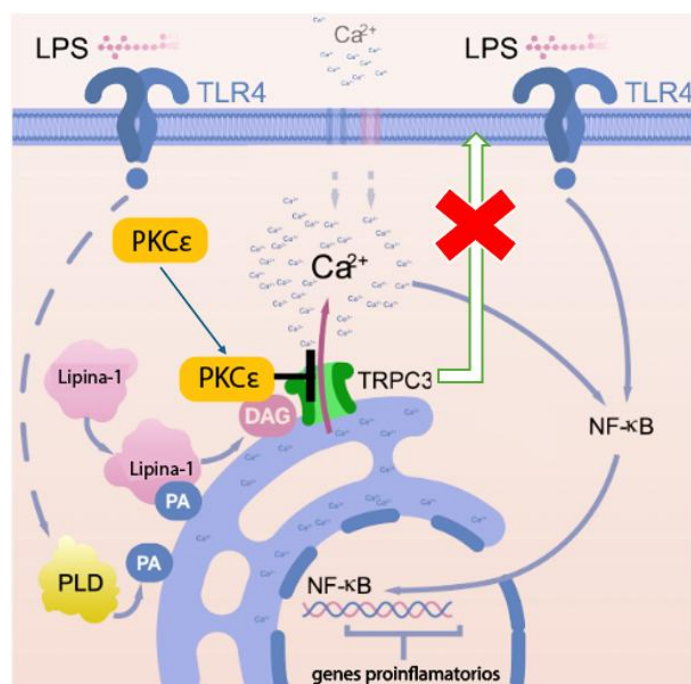


Figura 15. Mecanismo de retroalimentación negativa DAG–TRPC3–PKC ϵ . Esquema que representa un mecanismo de retroalimentación negativa en macrófagos, donde el DAG activa simultáneamente al canal TRPC3 y a la quinasas PKC ϵ . Esta, a su vez, fosforila e inhibe a TRPC3, modulando su actividad durante la respuesta inflamatoria.

Desde una perspectiva traslacional, la identificación de este eje DAG–TRPC3–PKC ϵ abre nuevas posibilidades terapéuticas. En enfermedades inflamatorias crónicas, la disfunción de la vía Lipina–TRPC3 puede conllevar una activación descontrolada de la respuesta inmune innata. El uso de inhibidores selectivos de TRPC3 o moduladores específicos de PKC ϵ podría permitir el diseño de terapias dirigidas que limiten la inflamación sin comprometer completamente la señalización del Ca²⁺ ^{36,39}. Del mismo modo, la caracterización de mutaciones en residuos reguladores como Ser712 podría tener valor diagnóstico en contextos de inflamación crónica.

Con todos los datos expuestos, los resultados de este trabajo amplían el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan la inflamación en macrófagos humanos, confirmando el papel dual de TRPC3 como efector y regulador, y posicionando a PKC ϵ como una pieza clave en su control postraduccional.

Conclusiones

- i. El canal TRPC3 actúa como un efector clave en la respuesta inflamatoria de macrófagos humanos, contribuyendo a la expresión de genes proinflamatorios y a la producción de mediadores como PGE_2 .
- ii. La fosforilación del residuo Ser712 representa un mecanismo postraduccional relevante para el control de la actividad del canal TRPC3. Los datos experimentales muestran que la mutación S712A, que impide dicha fosforilación, potencia la actividad basal del canal, confirmando su papel regulador.
- iii. La quinasa $\text{PKC}\epsilon$ participa activamente en la regulación negativa de TRPC3. Mediante ensayos de inmunofluorescencia y silenciamiento génico, se demuestra que esta isoforma novel de PKC interacciona funcionalmente con TRPC3 y modula su actividad.
- iv. Desde un punto de vista traslacional, este eje representa una diana potencial para la modulación farmacológica de la inflamación. La inhibición selectiva de TRPC3 o la manipulación de su regulación por $\text{PKC}\epsilon$ podrían ofrecer nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades inflamatorias crónicas.

Bibliografía

1. Wicherska-Pawłowska K, Wróbel T, Rybka J. Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 13;22(24):13397
2. Masyutina AM, Maximchik PV, Chkadua GZ, Pashenkov MV. Inhibition of specific signaling pathways rather than epigenetic silencing of effector genes is the leading mechanism of innate tolerance. *Front Immunol*. 2023 Jan 26;14:1006002.
3. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Feb;78(4):1233-1261.
4. Tanaka T, Tsuchiya R, Hozumi Y, Nakano T, Okada M, Goto K. Reciprocal regulation of p53 and NF- κ B by diacylglycerol kinase ζ . *Adv Biol Regul*. 2016 Jan;60:15-21.
5. Dalal PJ, Muller WA, Sullivan DP. Endothelial Cell Calcium Signaling during Barrier Function and Inflammation. *Am J Pathol*. 2020 Mar;190(3):535-542.
6. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* [Internet]. 2007 Dec 1;131(6):1047–58.
7. Mishra V, Adlakha N. Spatio temporal interdependent calcium and buffer dynamics regulating DAG in a hepatocyte cell due to obesity. *J Bioenerg Biomembr*. 2023 Aug;55(4):249-266.
8. Casas J, Meana C, López-López JR, Balsinde J, Balboa MA. Lipin-1-derived diacylglycerol activates intracellular TRPC3 which is critical for inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Dec;78(24):8243-8260.
9. Wang H, Cheng X, Tian J, Xiao Y, Tian T, Xu F, Hong X, Zhu MX. TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacol Ther*. 2020 May;209:107497.
10. Li J, Zhang X, Song X, Liu R, Zhang J, Li Z. The structure of TRPC ion channels. *Cell Calcium*. 2019 Jun;80:25-28.
11. Feng S. TRPC Channel Structure and Properties. *Adv Exp Med Biol*. 2017;976:9-23.
12. Wu J, Li Z, Deng Y, Lu X, Luo C, Mu X, et al. Function of TRP channels in monocytes/macrophages. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2023 Jun 19;14.
13. Andrikopoulos P, Eccles SA, Yaqoob MM. Coupling between the TRPC3 ion channel and the NCX1 transporter contributed to VEGF-induced ERK1/2 activation and angiogenesis in human primary endothelial cells. *Cell Signal*. 2017 Sep;37:12-30.
14. Ampem PT, Smedlund K, Vazquez G. Pharmacological evidence for a role of the transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) channel in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2016 Jan;76:42-52.
15. Kumarasamy S, Solanki S, Atolagbe OT, Joe B, Birnbaumer L, Vazquez G. Deep transcriptomic profiling of M1 macrophages lacking TRPC3. *Scientific Reports* [Internet]. 2017 Jan 4;7(1).
16. Dong Y, Dong Y, Zhu C, Yang L, Wang H, Li J, Zheng Z, Zhao H, Xie W, Chen M, Jie Z, Li J, Zang Y, Shi J. Targeting CCL2-CCR2 signaling pathway alleviates macrophage dysfunction in COPD via PI3K-AKT axis. *Cell Commun Signal*. 2024 Jul 17;22(1):364.
17. Trebak M, Hempel N, Wedel BJ, Smyth JT, St J Bird G, Putney JW. Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-Mediated phosphorylation of serine 712. *Molecular Pharmacology* [Internet]. 2004 Nov 8;67(2):558–63.

18. Parker PJ, Brown SJ, Calleja V, Chakravarty P, Cobbaut M, Linch M, Marshall JJT, Martini S, McDonald NQ, Soliman T, Watson L. Equivocal, explicit and emergent actions of PKC isoforms in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2021 Jan;21(1):51-63.
19. Khan S. Wogonin and Alleviation of Hyperglycemia via Inhibition of DAG Mediated PKC Expression. A Brief Insight. *Protein Pept Lett*. 2021;28(12):1365-1371.
20. Lin R, Bao X, Wang H, Zhu S, Liu Z, Chen Q, Ai K, Shi B. TRPM2 promotes pancreatic cancer by PKC/MAPK pathway. *Cell Death Dis*. 2021 Jun 7;12(6):585.
21. Zheng T, Song Z, Tao Y, Qiang J, Ma J, Lu S, Xu P. Transport stress induces innate immunity responses through TLR and NLR signaling pathways and increases mucus cell number in gills of hybrid yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco* ♀ × *Pseudobagrus vachellii* ♂). *Fish Shellfish Immunol*. 2022 Aug;127:166-175.
22. Khatua S, Simal-Gandara J, Acharya K. Understanding immune-modulatory efficacy in vitro. *Chem Biol Interact*. 2022 Jan 25;352:109776.
23. Rimessi A, Pozzato C, Carparelli L, Rossi A, Ranucci S, De Fino I, Cigana C, Talarico A, Wieckowski MR, Ribeiro CMP, Trapella C, Rossi G, Cabrini G, Bragonzi A, Pinton P. Pharmacological modulation of mitochondrial calcium uniporter controls lung inflammation in cystic fibrosis. *Sci Adv*. 2020 May 6;6(19):eaax9093.
24. Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Rimessi A, Wieckowski MR, Giorgi C, Pinton P. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*. 2018 Jan;69:62-72.
25. Jaén RI, Val-Blasco A, Prieto P, Gil-Fernández M, Smani T, López-Sendón JL, Delgado C, Boscá L, Fernández-Velasco M. Innate Immune Receptors, Key Actors in Cardiovascular Diseases. *JACC Basic Transl Sci*. 2020 Jul 27;5(7):735-749.
26. Muzorewa TT, Buerk DG, Jaron D, Barbee KA. TRPC channel-derived calcium fluxes differentially regulate ATP and flow-induced activation of eNOS. *Nitric Oxide*. 2021 Jun 1;111-112:1-13.
27. Zhang M, Ma Y, Ye X, Zhang N, Pan L, Wang B. TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Jul 5;8(1):261.
28. Boda VK, Yasmen N, Jiang J, Li W. Pathophysiological significance and modulation of the transient receptor potential canonical 3 ion channel. *Med Res Rev*. 2024 Nov;44(6):2510-2544.
29. Harper AG, Sage SO. TRP-Na(+)/Ca(2+) Exchanger Coupling. *Adv Exp Med Biol*. 2016;898:67-85.
30. Lin Y, Cui X, Cao Q, Bi R, Liu Y, Jing D, Yue C, Zhao Q, Wang Y, Liu S, Su Y, Formoso K, Susperreguy S, Birnbaumer L, Freichel M, Yang Y, You L, Gao X. TRPC absence induces pro-inflammatory macrophages and gut microbe disorder, sensitizing mice to colitis. *Int Immunopharmacol*. 2023 Feb;115:109655.
31. Song T, Hao Q, Zheng YM, Liu QH, Wang YX. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates TRPC3 channels to cause extracellular Ca²⁺ influx in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Dec 15;309(12):L1455-66.
32. Pozzi S, Satchi-Fainaro R. The role of CCL2/CCR2 axis in cancer and inflammation: The next frontier in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2024 Jun;209:115318.
33. Leitges M. Investigations of mouse models during tumorigenesis revealed essential but distinct in vivo functions among the PKC family. *Adv Biol Regul*. 2020 Dec;78:100756.

34. Su Q, Zhang J, Lin W, Zhang JF, Newton AC, Mehta S, Yang J, Zhang J. Sensitive Fluorescent Biosensor Reveals Differential Subcellular Regulation of PKC. *bioRxiv* [Preprint]. 2024 Mar 30;2024.03.29.587373.
35. Zheng ZG, Xu YY, Liu WP, Zhang Y, Zhang C, Liu HL, Zhang XY, Liu RZ, Zhang YP, Shi MY, Yang H, Li P. Discovery of a potent allosteric activator of DGKQ that ameliorates obesity-induced insulin resistance via the sn-1,2-DAG-PKC ϵ signaling axis. *Cell Metab*. 2025 May 6;37(5):1235-1236.
36. Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab*. 2018 Jan 9;27(1):22-41.
37. Dey P, Han GS, Carman GM. A review of phosphatidate phosphatase assays. *J Lipid Res*. 2020 Dec;61(12):1556-1564.
38. Santoni G, Morelli MB, Amantini C, Santoni M, Nabissi M, Marinelli O, Santoni A. "Immuno-Transient Receptor Potential Ion Channels": The Role in Monocyte- and Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Front Immunol*. 2018 Jun 6;9:1273.
39. Zuniga MC, Raghuraman G, Hitchner E, Weyand C, Robinson W, Zhou W. PKC-epsilon and TLR4 synergistically regulate resistin-mediated inflammation in human macrophages. *Atherosclerosis*. 2017 Apr;259:51-59.
40. Mohd Yasin ZN, Mohd Idrus FN, Hoe CH, Yvonne-Tee GB. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: A systematic review. *Differentiation*. 2022 Nov-Dec;128:67-82.
41. Liu T, Huang T, Li J, Li A, Li C, Huang X, Li D, Wang S, Liang M. Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLoS One*. 2023 Jul 17;18(7):e0286056.
42. Ryu JK, Kim SJ, Rah SH, Kang JI, Jung HE, Lee D, Lee HK, Lee JO, Park BS, Yoon TY, Kim HM. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity*. 2017 Jan 17;46(1):38-50.
43. Fujiwara A, Ozawa M, Sumida K, Hirawa N, Yatsu K, Ichihara N, Haze T, Komiya S, Ohki Y, Kobayashi Y, Wakui H, Tamura K. LPIN1 is a new target gene for essential hypertension. *J Hypertens*. 2022 Mar 1;40(3):536-543.
44. da Conceição Braga L, Gonçalves BÔP, Coelho PL, da Silva Filho AL, Silva LM. Identification of best housekeeping genes for the normalization of RT-qPCR in human cell lines. *Acta Histochem*. 2022 Jan;124(1):151821.
45. Yu T, Lao X, Zheng H. Influencing COX-2 Activity by COX Related Pathways in Inflammation and Cancer. *Mini Rev Med Chem*. 2016;16(15):1230-1243.
46. Samuchiwal SK, Balestrieri B, Raff H, Boyce JA. Endogenous prostaglandin E₂ amplifies IL-33 production by macrophages through an E prostanoid (EP)₂/EP₄-cAMP-EPAC-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2017 May 19;292(20):8195-8206.
47. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc*. 2020 Apr 1;2020(4):102269.
48. Meftahi GH, Bahari Z, Zarei Mahmoudabadi A, Iman M, Jangravi Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021 Jul;49(4):509-517.
49. King J. Using T4 genetics and Laemmli's development of high-resolution SDS gel electrophoresis to reveal structural protein interactions controlling protein folding and phage self-assembly. *J Biol Chem*. 2022 Oct;298(10):102463.
50. Zhang Y, Wu LL, Wan X, Wang HH, Li XH, Pan ZN, Sun SC. Loss of PKC mu function induces cytoskeletal defects in mouse oocyte meiosis. *J Cell Physiol*. 2019 Aug;234(10):18513-18523. doi: 10.1002/jcp.28487. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30912144.
51. Álvarez-Miguel I, Ciudad P, Pérez-García MT, López-López JR. Differences in TRPC3 and TRPC6 channels assembly in mesenteric vascular smooth muscle cells in essential hypertension. *J Physiol*. 2017 Mar 1;595(5):1497-1513.

52. Löf C, Blom T, Törnquist K. Overexpression of TRPC3 reduces the content of intracellular calcium stores in HEK-293 cells. *Journal of Cellular Physiology* [Internet]. 2008 Jan 29;216(1):245–52.
53. Watanabe N, Suzuki J, Kobayashi Y. Role of calcium in tumor necrosis factor-production by activated macrophages. *The Journal of Biochemistry* [Internet]. 1996 Dec 1;120(6):1190–5.
54. Qi HY, Shelhamer JH. Toll-like receptor 4 signaling regulates cytosolic phospholipase A2 activation and lipid generation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2005 Sep 22;280(47):38969–75.