



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**“PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR
ENDOTELIAL SOBRE EL CANAL IÓNICO TRPV4”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

RAÚL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

**DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DRA. MARÍA DEL REFUGIO GARCÍA VILLEGAS
DEPTO. DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS, CINVESTAV-IPN**

**DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.**

CIUDAD DE MÉXICO. ABRIL, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Tamara Rosenbaum por la oportunidad de trabajar en el laboratorio que dirige en el Instituto de Fisiología Celular, por su confianza depositada en mí, el tiempo y los conocimientos compartidos, así como su paciencia.

A la Dra. Sara Luz Morales Lázaro, gracias por todo su apoyo, sus consejos y su ayuda para discutir los resultados y así poder mejorar los experimentos presentados en este trabajo.

A la Biól. Alejandra Llorente Gil, porque desde mis primeros días en el laboratorio me brindaste tu ayuda, gracias por compartir tu conocimiento y tu tiempo.

A Félix Sierra por su disposición, paciencia y consejos que me ayudaron a mejorar los experimentos de electrofisiología.

A mis compañeros del laboratorio BL-303. A los que estuvieron, en especial gracias a Damián, Ana, Ileana, Alan y Miguel; también a los que están, gracias a Rebeca y Miguel por compartir conmigo su tiempo y experiencias, por la confianza que tuvieron para hablar de sus problemas y ayudarme con los míos, gracias por tantas risas.

A los miembros de mi comité tutorial; Dra. María del Refugio García Villegas y Dr. Luis B. Tovar y Romo, por sus observaciones en los exámenes tutorales que ayudaron a mejorar este proyecto.

A los miembros del jurado de mi examen profesional: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dra. Magdalena Guerra Crespo, Dr. Arturo Hernández Cruz, Dr. Marcelino Arciniega Castro y Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, a todos ustedes gracias por su tiempo para leer esta tesis, sus comentarios y sugerencias que hicieron más completo este trabajo.

A mis padres, porque una vez más me han brindado todo su apoyo, impulsándome a seguir superándome y preparándome. Gracias por su paciencia tanto tiempo, sus consejos y su amor inagotable, gracias por creer en mí.

A mi hermana, por escucharme en los días malos y alegrarme, porque aún en la distancia sabía que podía contar contigo. ¡Skeleton Twins!

A mi familia, en especial gracias a mi tía Rosa y mi tío Luis, quienes me brindaron su apoyo y me abrieron las puertas de su hogar para permitirme cursar mis estudios de maestría, nunca podré pagar su amabilidad y cariño.

A mis amigos Andrés, Annel y Manuel, porque gracias a su apoyo pude seguir adelante, sé que siempre podré contar con ustedes, no importa que tan lejos o cerca estemos.

A Julio, porque gracias a tu compañía pude superar más de un obstáculo durante estos locos años de maestría; gracias por tu ayuda, tus consejos y tu tiempo.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de proyecto **A1-S-8760**; y por la Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación (SECTEI) con clave de proyecto **SECTEI/208/2019**, otorgados a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir.

Asimismo, agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida para “Maestría/Obtención de Grado” y de igual forma, al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, con clave de proyecto **IN200720**.

Agradezco al CONACyT por la beca **703291** otorgada para la realización de la maestría en el periodo del 29 de enero de 2018 hasta el 28 de febrero de 2020.

Índice

Abreviaciones

Resumen	1
1. Introducción	
1.1 Canales iónicos.....	2
1.2 Canales TRP	3
1.3 Canal TRPV4	6
1.4 Factor de crecimiento vascular endotelial	8
1.5 Receptores a VEGF	10
1.6 Señalización VEGF/VEGFR.....	11
2. Hipótesis	14
3. Objetivo general	14
4. Objetivos particulares	14
5. Metodología	
5.1 Modelos de estudio	15
5.2 Transfección transitoria de células HEK293.....	15
5.3 Tratamiento con VEGF-A.....	16
5.4 Tratamiento con inhibidores	16
5.5 Electrofisiología	16
5.6 Análisis estadístico.....	17
6. Resultados	
6.1 Efectos del VEGF-A sobre la expresión del TRPV4 en células HEK293	18
6.2 Papel de la sobreexpresión del VEGFR2 sobre la expresión del TRPV4 en células HEK293	23
6.3 El VEGF-A y la expresión del TRPV4 en células BMEC.....	26
7. Discusión	33
8. Conclusiones	39
9. Perspectivas	40
10. Bibliografía	41

Abreviaciones

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BMEC	Células de la microvasculatura endotelial cerebral por sus siglas en inglés para <i>Brain microvascular endothelial cells</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular por sus siglas en inglés para <i>Extracellular-signal-Eegulated Kinase</i>
FAK	Cinasa de adhesión focal por sus siglas en inglés para <i>Focal Adhesion Kinase</i>
GFP	Proteína verde fluorescente por sus siglas en inglés para <i>Green Fluorescent Protein</i>
HEK293	Línea celular de riñón de embrión humano por sus siglas en inglés para <i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico por sus siglas en inglés para <i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana por sus siglas en inglés para <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno por sus siglas en inglés para <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEK	Cinasa de MAPK/ERK (también conocida como MAP2K)
Nck	Proteína adaptadora
pA	Pico-Amper
pF	Pico-Faradio

PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa por sus siglas en inglés para <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PKC	Proteína Cinasa C, por sus siglas en inglés para <i>Protein Kinase C</i>
PLC-γ	Fosfolipasa C gamma por sus siglas en inglés para <i>Phospholipase C-γ</i>
PLGF	Factor de crecimiento placentario, por sus siglas en inglés para <i>Placental Growth Factor</i>
Ras GAP	Proteína activadora de GTPasa por sus siglas en inglés para <i>GTPase Activating Protein</i>
Src	Proteína tirosina cinasa
SU1498	Inhibidor selectivo para VEGFR-2
TRP	Receptor del potencial transitorio por sus siglas en inglés para <i>Transient Receptor Potential</i>
TRPV4	Receptor del potencial transitorio vaniloide 4
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial por sus siglas en inglés para <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	Receptor a factor de crecimiento vascular endotelial por sus siglas en inglés para <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
Wortmannina	Inhibidor específico para PI3K

Resumen

El cuarto miembro de la subfamilia vaniloide (TRPV4) es un canal cuya expresión se ha observado en múltiples sistemas en donde su actividad está asociada en un gran número de procesos fisiológicos. Un claro ejemplo del papel que desempeña el canal TRPV4 lo encontramos en la fisiología del endotelio vascular donde contribuye a la homeostasis del $[Ca^{2+}]_i$, a la regulación del volumen celular, así como a la permeabilidad de la membrana y a la producción de factores antitrombóticos.

Aunque se sabe que este canal participa en diversos procesos celulares y en la función de diferentes tejidos y órganos, es muy limitada la información que existe acerca de sus activadores endógenos, así como de moduladores de su expresión, especialmente en comparación con otros canales TRP. Debido a que tanto el canal TRPV4 como el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) participan de forma importante en procesos fisiopatológicos, donde los cambios en la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en las células de la vasculatura endotelial es primordial para regular la función y viabilidad de éstas, el presente proyecto plantea evaluar los efectos del VEGF-A sobre dicho canal.

En este trabajo se demuestra que en las células de la microvasculatura endotelial cerebral (BMEC), el VEGF-A promueve una disminución en la expresión del TRPV4 a nivel de la membrana plasmática. Asimismo, que la interacción entre TRPV4 y VEGF-A está mediada por la actividad del VEGFR2 en este modelo celular. Finalmente, se mostró que la inhibición de la vía de señalización que involucra la actividad de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) no modifica la actividad o expresión del TRPV4 en células BMEC.

Por otra parte, al utilizar el sistema de expresión heterólogo, las células HEK293, existieron distintos factores experimentales que resultaron en la poca reproducibilidad de los efectos del VEGF-A sobre el canal TRPV4.

1. Introducción

Las membranas celulares son estructuras poco permeables a iones y, debido a que las concentraciones iónicas extra e intracelulares son distintas entre ellas, dichas estructuras actúan como capacitores separando partículas cargadas. Así, las membranas celulares están eléctricamente polarizadas ya que existe un exceso de cargas positivas en el exterior y un exceso de cargas negativas en el interior; esta particularidad les confiere un potencial de reposo o de membrana (V_m) (Chaffey, 2003).

Para que los iones puedan atravesar estas estructuras hidrofóbicas es necesaria la presencia de ciertos tipos de proteínas especializadas como lo son los canales iónicos (Minke & Cook, 2002).

1.1 Canales iónicos

Los canales iónicos son complejos proteicos transmembranales que poseen poros hidrofílicos altamente selectivos al paso de determinados iones (principalmente Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+}), dando lugar a señales eléctricas y químicas importantes para la generación y regulación de procesos de señalización intracelular y de comunicación intercelular.

Los canales iónicos poseen regiones definidas que juegan papeles importantes en su función y que delimitan sus características biofísicas particulares (Chaffey, 2003). Cada canal posee una permeabilidad particular a diferentes iones, conductancia, mecanismos de apertura y cierre, agonistas y antagonistas típicos y dependencia del voltaje entre otras características regulatorias adicionales (Minke & Cook, 2002).

Una vez que un canal es activado, permite el movimiento de iones a través de la membrana, este flujo o corriente eléctrica obedece al gradiente electroquímico por lo que no requiere gasto de energía y ocurre rápidamente. El gradiente electroquímico involucra tanto al gradiente químico, que se refiere tanto a la concentración diferencial de iones que hay entre el interior y el exterior de la célula como al gradiente eléctrico, que se genera por la separación de cargas a ambos lados de la membrana plasmática por su propiedad de aislante eléctrico (Chaffey, 2003). Los estímulos a los que responden los canales iónicos incluyen estímulos eléctricos, químicos, mecánicos e incluso térmicos (Minke & Cook, 2002; Montell, 2005).

1.2 Canales TRP

La superfamilia de canales iónicos Receptores del Potencial Transitorio (TRP, por sus siglas en inglés) son un grupo de canales catiónicos no selectivos, principalmente permeables a Ca^{2+} y considerados polimodales ya que pueden responder a más de un estímulo. Los canales TRP realizan múltiples funciones tanto en células excitables como no excitables (Montell, 2005), participando de forma importante en la fisiología sensorial al estar involucrados en el tacto, audición, olfato, visión y sensación térmica (Venkatachalam & Montell, 2007).

Estos se describieron por primera vez en un modelo de *Drosophila melanogaster* (Cosens & Manning, 1969), donde los fotorreceptores con mutaciones en el gen *trp* mostraban una respuesta de voltaje transitoria en lugar de una respuesta sostenida ante un estímulo de luz prolongado y a las proteínas que producían dicha respuesta se les denominó “receptores del potencial transitorio” (Clapham, 2003; Pedersen, Owsianik, & Nilius, 2005).

Estructuralmente los canales TRP se relacionan con la superfamilia de canales dependientes de voltaje (aunque son débilmente dependientes de este estímulo). Se caracterizan por poseer seis segmentos de α -hélices transmembranales (S1-S6), una región del poro (entre S5 y S6) y los extremos amino y carboxilo terminales en el lado intracelular de la membrana plasmática; sin embargo, los canales TRP carecen de un sensor de voltaje típico (Minke & Cook, 2002; Montell, 2005; Rosasco & Gordon, 2017; Venkatachalam & Montell, 2007).

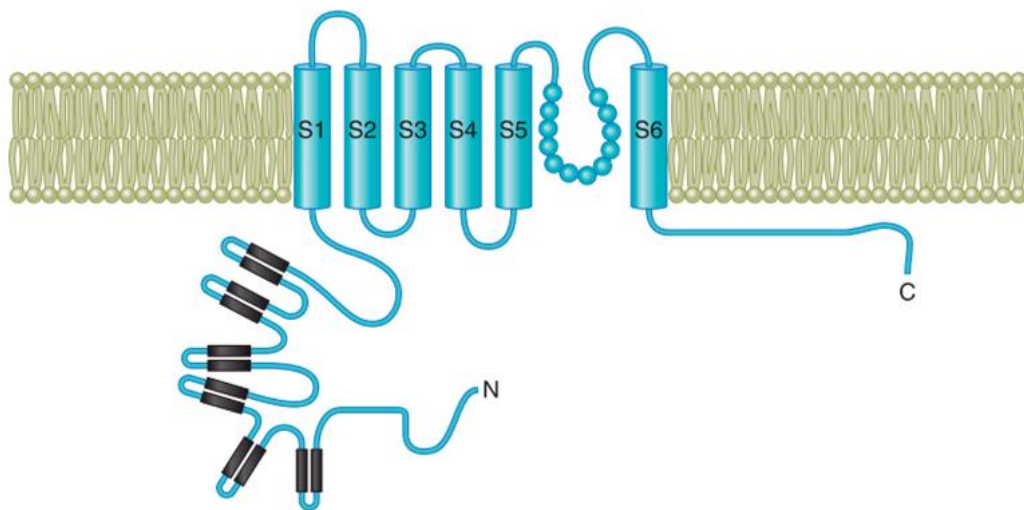


Figura 1. Esquema de la estructura general de una subunidad de un canal TRP. Los canales TRP son proteínas tetraméricas en las cuales cada subunidad consiste de 6 segmentos transmembranales que van de S1-S6, una región del poro que se forma entre los dominios S5-S6 y los extremos amino y carboxilo terminales localizados en el citoplasma. Modificado de White *et al.*, 2016.

Con base en su estructura primaria se han clasificado en 7 subfamilias: TRPC (“Canónicos”), TRPV (“Vaniloide”), TRPM (“Melastatina”), TRPA (“Anquirina”), TRPN (“NOMPC”, por sus siglas en inglés no mechanoreceptor potential C), TRPP (“Policistina”) y TRPML (“Mucolipina”) (Montell, 2005).

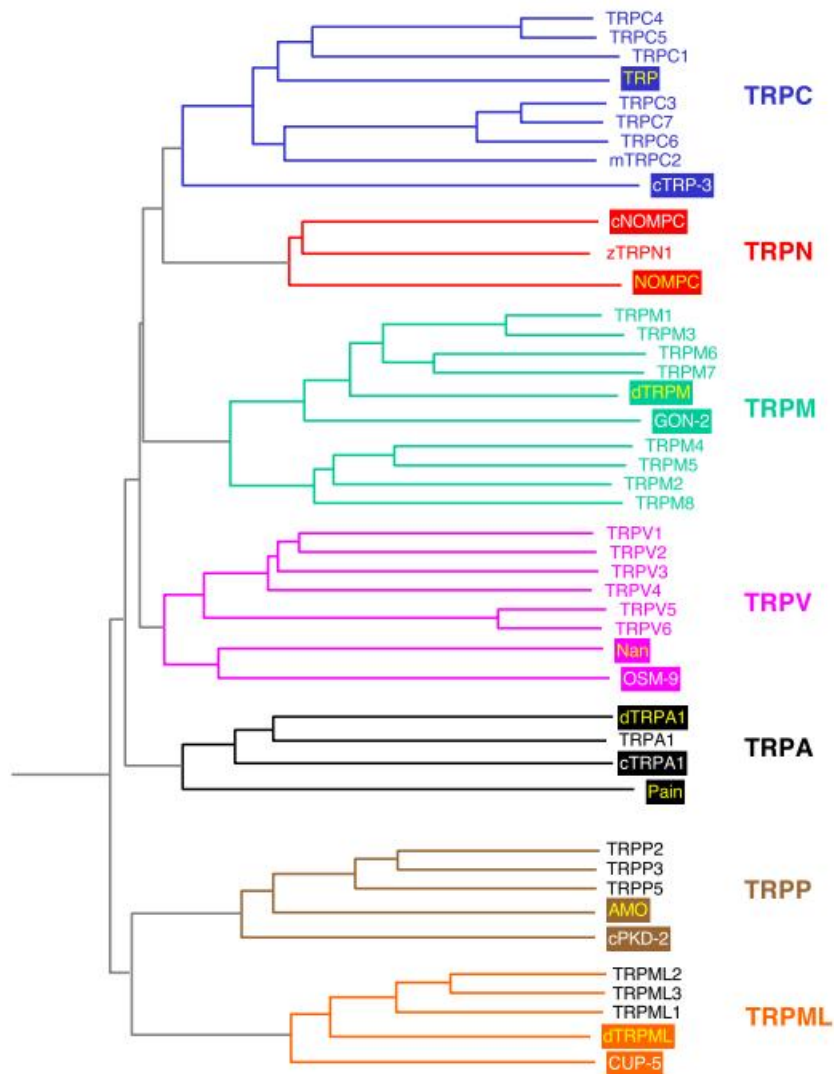


Figura 2. Superfamilia de canales TRP. Se muestran las 7 subfamilias de canales TRP (TRPC, TRPN, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP Y TRPML) con base en la homología en su secuencia de aminoácidos. Modificado de Montell, 2005.

Los canales TRP se distribuyen en distintos órganos, principalmente en cerebro, corazón, riñón, testículos, pulmones, hígado, bazo, ovarios, intestino, próstata, placenta, útero y tejidos vasculares. De igual forma se han localizado en muchos tipos celulares como neuronas sensoriales, aferentes primarias, células epiteliales, células de músculo liso y células de la vasculatura endotelial (Minke & Cook, 2002; Montell, 2005; Thakore & Earley, 2019).

Como se mencionó, los mecanismos de activación y regulación de los canales TRP son muy diversos y la actividad de dichos canales se ve afectada por varios parámetros físicoquímicos que incluyen la osmolaridad, el pH, la fuerza mecánica así como las interacciones bioquímicas con ligandos externos o proteínas celulares (Minke & Cook, 2002; Pedersen *et al.*, 2005).

1.3 Canal TRPV4

La subfamilia vaniloide de canales TRP comprende seis miembros: TRPV1-TRPV6 (Pedersen *et al.*, 2005; White *et al.*, 2016). El cuarto miembro de la subfamilia vaniloide (TRPV4) es un canal cuya expresión se ha observado en múltiples sistemas como el cardiaco, respiratorio, urinario, óseo, digestivo y nervioso central y periférico, en donde su actividad está implicada en un gran número de procesos fisiológicos (Darby, Grace, Baratchi, & McIntyre, 2016; Deng *et al.*, 2018; Grace, Bonvini, Belvisi, & McIntyre, 2017; Kumar, Lee, Kim, Zeng, & Han, 2018; Randhawa & Jaggi, 2015).

Descrito como TRPV4 en el año 2000 (Liedtke *et al.*, 2000), este canal iónico ha adquirido distintas nomenclaturas de acuerdo a las características funcionales que se observaron al estudiarlo: OSM-9 (Colbert, Smith, & Bargmann, 1997), TRP12 (Wissenbach, Bodding, Freichel, & Flockerzi, 2000); VRAC o VR-OAC (Nilius, Prenen, Wissenbach, Bodding, & Droogmans, 2001); VRL-2 (Delany *et al.*, 2001); finalmente se determinó que se trataba del mismo canal (White *et al.*, 2016).

El TRPV4 mantiene la estructura tetramérica observada en los canales TRP, comúnmente en una conformación de homotetrámero pero también se han reportado algunos heterotetrámeros con otros TRP's (White *et al.*, 2016), por ejemplo con TRPC1 (Ma, Cheng, *et al.*, 2011; Ma, Nilius, Wong, Huang, & Yao, 2011) e incluso por TRPV4-TRPC1-TRPP2 (Du *et al.*, 2014).

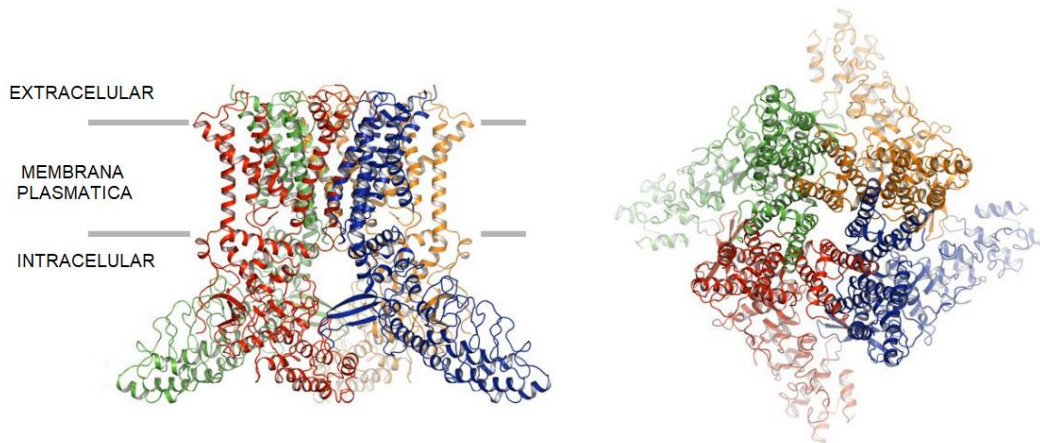


Figura 3. Estructura del canal TRPV4. Se muestra la estructura resuelta por criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) para el canal TRPV4 de *Xenopus tropicalis*. A la izquierda se observa el tetrámero con una orientación horizontal a la membrana plasmática, con cada subunidad representada con un color diferente. A la derecha se muestra el canal visto desde el lado extracelular de la membrana plasmática. Modificado de Deng *et al.*, 2018.

El TRPV4 desempeña un papel esencial en el correcto funcionamiento de las células donde se expresa debido a su capacidad para permitir el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y, de esta forma, regular la concentración intracelular de este ion ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Esto, a su vez, permite que se modifiquen distintos complejos proteicos intracelulares necesarios para realizar procesos fisiológicos y mantener la homeostasis de las células.

Un claro ejemplo de la importancia fisiológica de TRPV4 es su papel en la fisiología del endotelio vascular donde contribuye a la homeostasis del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a la regulación del volumen celular, así como a la permeabilidad de la membrana y a la producción de factores antitrombóticos (Darby *et al.*, 2016; Nilius & Droogmans, 2001; Randhawa & Jaggi, 2015; White *et al.*, 2016).

Sin embargo, pese a que se sabe que este canal participa en diversos procesos celulares y en la función de diferentes tejidos y órganos, la información que existe acerca de sus activadores y reguladores endógenos es muy limitada, especialmente en comparación a lo que se conoce sobre otros canales TRP (Vincent & Duncton, 2011).

Estudiar el efecto de un factor de crecimiento que regula la función del tejido vascular endotelial fue de particular interés para el trabajo que aquí se presenta y a continuación se describen las características del mismo.

1.4 Factor de crecimiento vascular endotelial

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es una proteína dimérica de aproximadamente 45 kDa, ampliamente expresada en el organismo con funciones cruciales en la formación y mantenimiento de la vasculatura al igual que en otros sistemas que incluyen al nervioso central, renal, respiratorio, entre otros, donde influye directamente en la función y desarrollo de los mismos (Simons, Gordon, & Claesson-Welsh, 2016).

Se ha descrito al VEGF como un potente mitógeno altamente específico para células endoteliales de la micro y macrovasculatura (Ferrara & Davis-Smyth, 1997; Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, & Poltorak, 1999).

Existen diferentes isoformas de VEGF en vertebrados (VEGF-A, -B, -C, -D y PLGF o factor de crecimiento placentario) necesarias para la formación de nuevos vasos sanguíneos, así como para el mantenimiento y la remodelación de los existentes durante el desarrollo y en tejidos adultos (Holmes, Roberts, Thomas, & Cross, 2007; Simons *et al.*, 2016).

La primera proteína VEGF descrita fue el VEGF-A, inicialmente considerándola un factor de permeabilidad vascular (VPF) y posteriormente se describió su actividad como mitógeno de células endoteliales. Actualmente el término “VEGF” se utiliza para referirse a la familia de glicoproteínas diméricas estructuralmente

relacionadas y que pertenecen a la superfamilia de factores de crecimiento PDGF (Holmes *et al.*, 2007; Matsumoto & Claesson-Welsh, 2001; H. Takahashi & Shibuya, 2005).

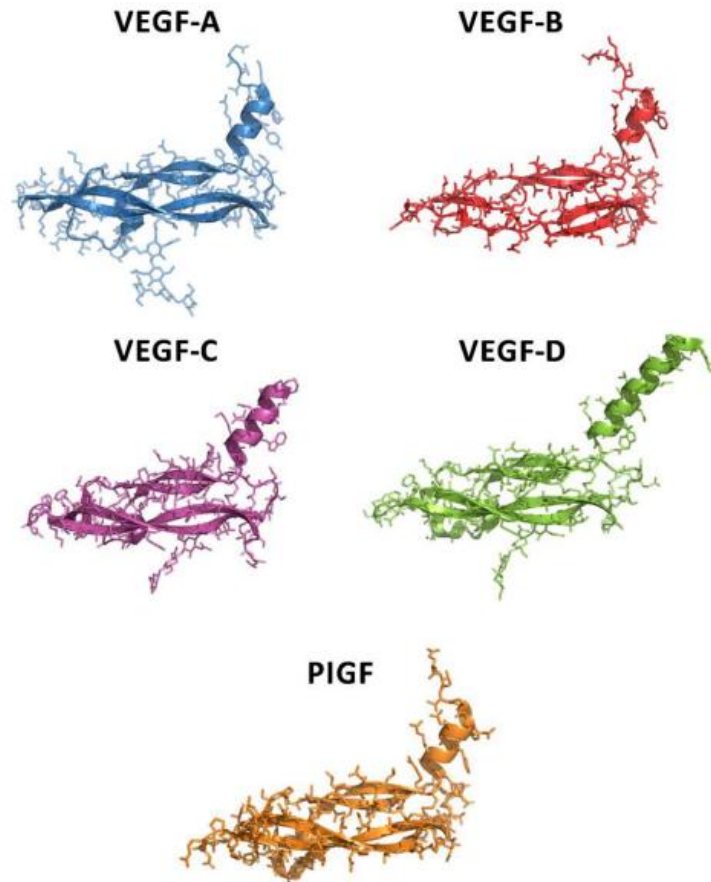


Figura 4. Familia de factores de crecimiento vasculares endoteliales. Se ilustran los 5 miembros de la familia VEGF de vertebrados. Modificado de Smith, Fearnley *et al.*, 2015.

Como resultado del procesamiento alternativo se han identificado variantes de VEGF-A en humano y, de acuerdo al número de residuos de aminoácidos, se encontraron las isoformas 121-, 145-, 165-, 189- y 206-, siendo las más frecuentes la 121 y la 165. Se ha descrito también que cada una de estas variantes puede interactuar con uno o varios receptores (Holmes *et al.*, 2007; Matsumoto & Claesson-Welsh, 2001).

1.5 Receptores a VEGF

El VEGF se une con gran afinidad a receptores con actividad de tirosina cinasa (RTKs) denominados VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3, los cuales a su vez estimulan la angiogénesis y linfangiogénesis (Karaman, Leppanen, & Alitalo, 2018). Inicialmente, los sitios de unión del VEGF se identificaron en la superficie celular de células vasculares endoteliales tanto *in vivo* como *in vitro* (Holmes *et al.*, 2007; Simons *et al.*, 2016).

Los receptores a VEGF muestran una estructura similar entre sí que consiste de siete dominios extracelulares homólogos a inmunoglobulinas donde se ubica el sitio de unión al ligando, un dominio transmembranal y un dominio intracelular dividido donde radica la actividad de tirosina cinasa, mismo que transduce la señal del factor de crecimiento (Karaman *et al.*, 2018; S. Takahashi, 2011). Sin embargo, cada receptor presenta diferencias en su mecanismo de activación, señalización y efectos biológicos (Alvarez-Aznar, Muhl, & Gaengel, 2017; Simons *et al.*, 2016).

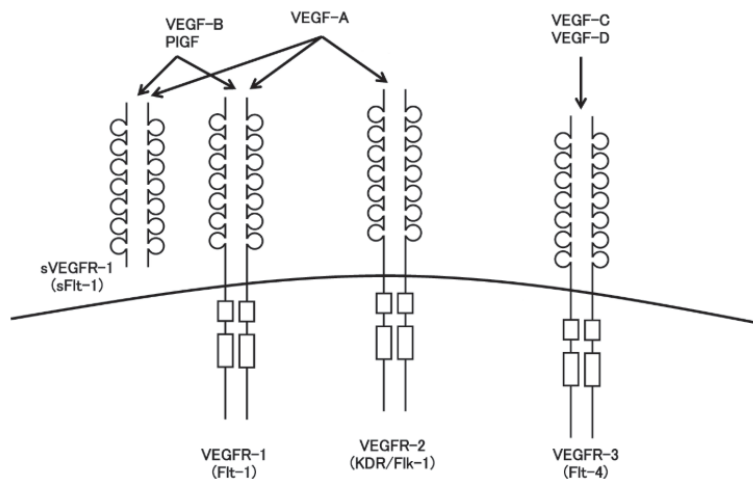


Figura 5. Receptores a VEGF. Representación esquemática de los distintos receptores a VEGF. A la izquierda se muestra el receptor 1 (también conocido como Flt-1) en sus formas completa y soluble, al centro el receptor 2 (también llamado KDR o Flk-1) y a la derecha el receptor 3 (también conocido como Flt-4). Se indican con flechas las interacciones entre proteínas VEGF y receptores. Modificado de Takahashi, 2011.

La unión del VEGF a su receptor promueve la homodimerización del mismo y su activación, vía interacciones simétricas homotípicas entre los dominios proximales homólogos a las inmunoglobulinas 4 y 7. Los receptores a VEGF también pueden formar dímeros en ausencia de ligando, pero la unión del ligando cambia la conformación del dominio transmembranal y, de este modo, se estimula la fosforilación del dominio cinasa.

Asimismo, los receptores a VEGF se pueden encontrar como heterodímeros, en los cuales la unión del ligando resulta en eventos de señalización ligeramente diferentes (Alvarez-Aznar *et al.*, 2017; Cai, Wang, Murdoch, Gu, & Ahmed, 2017; Cudmore *et al.*, 2012; Karaman *et al.*, 2018).

Una dimerización exitosa estimulada por ligando lleva a la autofosforilación de residuos de tirosina específicos localizados en el dominio intracelular yuxtamembranal, del dominio cinasa y del extremo C-terminal del VEGFR (Matsumoto & Claesson-Welsh, 2001). Los residuos de tirosina fosforilados funcionan como sitios de acoplamiento para moléculas de señalización descendentes que regulan las respuestas celulares como lo son la proliferación, la migración, la supervivencia y la permeabilidad celular (Karaman *et al.*, 2018).

1.6 Señalización VEGF/VEGFR

La señalización que desencadena el VEGF-A en células vasculares endoteliales está mediada predominantemente por la activación del VEGFR2 (Simons *et al.*, 2016). Por otra parte, VEGF-A, VEGF-B y PLGF son ligandos altamente afines a VEGFR1, pero debido a la actividad cinasa relativamente débil de VEGFR1, este receptor sirve como un regulador negativo de la señalización por VEGF-A limitando la cantidad de VEGF-A disponible para unirse a los homodímeros de VEGFR2. En contraste, VEGF-C y VEGF-D estimulan la activación de VEGFR3, el cual juega un papel indispensable en la linfangiogénesis (Alvarez-Aznar *et al.*, 2017; Karaman *et al.*, 2018; Shibuya, 2006).

Ejemplos de moléculas transductoras de señales que se ven activadas o modificadas en respuesta a la unión de VEGF-A en células endoteliales incluyen a PI3K, PLC- γ , la familia de tirosinas cinasas Src, Ras GAP, Nck, FAK, PKB, PKC, MEK, ERK, MAPK, entre otras (Matsumoto & Claesson-Welsh, 2001).

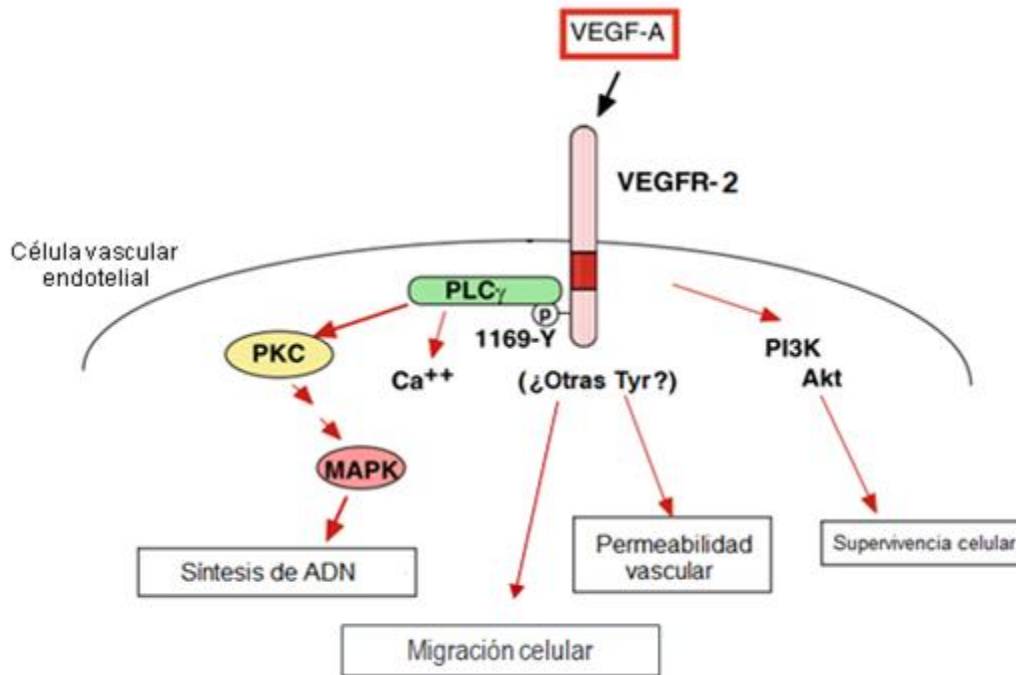


Figura 6. Señalización vía VEGFA-VEGFR2. La unión de VEGF-A al VEGFR2 inicia una cascada de señalización activada por procesos de fosforilación de residuos de tirosina (Y) tanto en el receptor como en otras proteínas cinasas que a su vez amplifican la señalización corriente abajo regulando procesos como la síntesis de ADN y migración celular, entre otros. Modificado de Shibuya, 2006.

Numerosos estudios denotan la participación tanto de las isoformas de VEGF como de sus distintos receptores en procesos vitales como la angiogénesis (Karaman *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha observado que este factor de crecimiento juega un rol importante en el desarrollo y la progresión de distintas enfermedades como lo son el crecimiento tumoral y la metástasis, la degeneración macular, la retinopatía diabética, la artritis reumatoide, la preclampsia y los procesos isquémicos (Melincovici *et al.*, 2018; Shibuya, 2006).

Por otra parte, existe evidencia que señala la presencia de los canales TRP en células endoteliales (Di & Malik, 2010; Negri, Faris, Berra-Romani, Guerra, & Moccia, 2019; Nilius & Droogmans, 2001). Se ha observado que estos canales participan en diferentes funciones vasculares en células endoteliales, incluyendo el control del tono vascular, la regulación de la permeabilidad vascular, sensación mecánica, angiogénesis, la proliferación celular, la apoptosis y muerte celular (Nilius & Droogmans, 2001; Yao & Garland, 2005).

De igual forma, se ha descrito que ciertos canales TRP expresados en la vasculatura endotelial pueden ser activados por diferentes estímulos (como agentes vasoactivos, estrés oxidativo, estímulos mecánicos y temperatura), para luego transformar dichos estímulos en cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, lo que desencadenaría varias respuestas vasculares (Di & Malik, 2010; Yao & Garland, 2005).

Se ha encontrado que los canales TRPC1, TRPC4, TRPC6 y TRPV1 participan en el control de la permeabilidad vascular; TRPC4, TRPV1 y TRPV4 en el control del tono vascular; TRPC4 en el remodelamiento vascular inducido por hipoxia y TRPC3, TRPC4 y TRPM2 en las respuestas inducidas por estrés oxidativo (Nilius & Droogmans, 2001; Yao & Garland, 2005).

Estudios previos han demostrado que el $[Ca^{2+}]_i$ regula la angiogénesis, incluyendo los procesos de proliferación celular, supervivencia y migración. La proliferación de las células endoteliales está importantemente regulada por factores como el VEGF que es requerido para el proceso de angiogénesis. Más aún, se ha probado que el VEGF estimula los flujos de Ca^{2+} en las células endoteliales a través de los canales TRP (Thoppil *et al.*, 2015).

En síntesis, dado que tanto el canal TRPV4 como el factor de crecimiento VEGF participan de forma importante en procesos fisiopatológicos donde los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en las células de la vasculatura endotelial son primordiales para regular la función y viabilidad de éstas, el presente proyecto plantea evaluar los efectos del VEGF sobre dicho canal.

2. Hipótesis

El factor de crecimiento vascular endotelial regula la función y/o la expresión del canal iónico TRPV4 presente en un sistema de expresión endógeno y en un sistema heterólogo.

3. Objetivo general

Determinar si existe un efecto mediado por VEGF-A sobre las corrientes iónicas del canal TRPV4 utilizando técnicas de electrofisiología.

4. Objetivos particulares

- 1) Evaluar cambios en la respuesta del canal TRPV4 en función del agonista GSK1016790A en células HEK293 tratadas con VEGF-A.
- 2) Comparar el efecto del VEGF-A sobre las corrientes iónicas de TRPV4 en células HEK293 que sobreexpresen al VEGFR2.
- 3) Evaluar el efecto del VEGF-A sobre las corrientes iónicas de TRPV4 en células de la microvasculatura endotelial cerebral (BMEC) en un modelo de rata.
- 4) Comparar el efecto del VEGF-A en células BMEC tratadas con el inhibidor SU1498.
- 5) Determinar el mecanismo de interacción entre TRPV4 y VEGF/VEGFR en células BMEC tratadas con el inhibidor para PI3K, wortmannina.

5. Metodología

5.1 Modelos de estudio

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron utilizando células de la línea HEK293 (Human Embryonic Kidney-293 cells) mantenidas en medio de cultivo DMEM con alta glucosa (Dulbecco's Modified Eagle, Gibco) suplementado con suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum, HyClone) al 10% y con solución de estreptomicina 10,000 µg/ml y penicilina 10,000 u/ml (Gibco).

También se utilizaron células de la microvasculatura endotelial cerebral de rata (BMEC), las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Luis B. Tovar y Romo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las células BMEC se mantuvieron en medio de cultivo MCDB 131 (Gibco) suplementado con MVGS (Microvascular Growth Supplement, Gibco) y penicilina-estreptomicina-anfotericina B (Sigma Aldrich).

Ambos tipos celulares fueron cultivados en monocapas en cajas de Petri de 100 mm (Corning) en incubadora con 95% O₂ y 5% de CO₂ a 37° C.

5.2 Transfección transitoria de células HEK293

Las células HEK293 fueron cotransfectadas de acuerdo al grupo experimental usando ADN que codificaba para las siguientes proteínas: canal TRPV4 de humano fusionado a proteína verde fluorescente (GFP), canal TRPV4 de humano sin fusión a GFP, GFP sola, proteína roja fluorescente (mCherry) y finalmente VEGFR2 en un vector con marcador cherry. Se utilizó el agente de transfección jetPEI® (Polyplus-transfection S.A, Illkirch, France) siguiendo las instrucciones de la compañía. Se emplearon diversas concentraciones de ADN (como se define para cada experimento en la sección de resultados) y la eficiencia de la transfección para los experimentos de electrofisiología fue determinada mediante fluorescencia en un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti-S) con lámpara de epifluorescencia (Nikon Intensilight C-HGFI).

5.3 Tratamiento con VEGF-A

Para los experimentos con las células HEK293 se realizó lo siguiente: 24 horas después de la transfección con el ADN para cada grupo, se reemplazó el medio de cultivo en el que se encontraban con medio de cultivo fresco con VEGF-A (VEGF₁₆₅ de rata, Sigma-Aldrich) a concentraciones de 1, 5 ó 10 ng/ml, de acuerdo al grupo correspondiente. En el caso de las BMEC, primero se colocaron en cajas Petri con vidrios de registro; una vez adheridas, se realizó el cambio del medio de cultivo como se describió para las HEK293. En ambos casos, los grupos controles tenían el volumen equivalente de vehículo de VEGF-A (PBS + BSA al 1%) agregado al medio de cultivo.

5.4 Tratamiento con inhibidores

Para determinar cuáles son las vías involucradas en los efectos del VEGF-A sobre la expresión del canal TRPV4, se utilizaron 2 reactivos: SU1498 (inhibidor potente y selectivo de VEGFR2 (IC₅₀ de 700 nM), Sigma Aldrich) y Wortmannina (inhibidor potente y específico para PI3K (IC₅₀ de 2-4 nM), Sigma Aldrich). Los inhibidores se colocaron en medio de cultivo fresco, se homogenizaron y, 30 minutos antes de iniciar el tratamiento con VEGF-A se cambió el medio a las células de acuerdo al grupo experimental.

5.5 Electrofisiología

Para el estudio de la actividad biofísica del canal TRPV4 se utilizó la técnica de fijación de voltaje de membrana o "patch-clamp" en la modalidad de célula completa (whole-cell). La técnica consiste en formar un sello de alta resistencia entre la membrana celular y la punta de una micropipeta de vidrio. Una vez formado el sello, la membrana celular se rompe por succión para que la solución de la pipeta entre en contacto con el interior de la célula.

Las soluciones de la pipeta y del medio externo tienen la osmolaridad, pH y concentraciones iónicas deseadas para el registro electrofisiológico.

Para los registros se utilizaron micropipetas de vidrio de borosilicato pulidas con una resistencia entre 1-3 M Ω . El protocolo de voltaje utilizado para registrar las corrientes de TRPV4 consistió en fijar un potencial de mantenimiento de 0 mV para después aplicar rampas de voltaje desde -120 hasta 120 mV con una duración de 480 ms.

Las soluciones que se emplearon para los registros fueron:

Pipeta (en mM): NaCl 130, HEPES 10 y EDTA 10

Baño (en mM): NaCl 130, HEPES 10 y CaCl₂ 5

La activación del canal se realizó en presencia del agonista sintético GSK1016790A (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 μ M, agregándolo a la solución del baño.

Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando el microscopio invertido, un amplificador EPC10 (HEKA Elektronik), un micromanipulador motorizado MP-225 (Sutter Instruments) y un sistema de recambio rápido de soluciones RSC-200 (BioLogic, Science Instruments). Los registros se realizaron con el programa Patchmaster (HEKA Instruments) y se analizaron con el programa IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) con programas generados por personal del laboratorio.

5.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron promediados y se muestran como el promedio \pm el error estándar de la media (s.e.m.). Asimismo, se utilizaron las prueba T-Student y ANOVA según se indica en cada figura; los datos con un valor $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente diferentes.

6. Resultados

6.1 Efectos del VEGF-A sobre la expresión del TRPV4 en células HEK293

En primer lugar se evaluaron los efectos del VEGF-A sobre la expresión del canal TRPV4 utilizando un sistema de expresión heterólogo, las células HEK293. Éstas fueron transfectadas transitoriamente con ADN que codifica para el TRPV4 de humano fusionado a GFP y fueron tratadas por 24 horas con VEGF-A a concentraciones de 5 y/o 10 ng, mientras que el grupo control estuvo expuesto solo al vehículo en el que se disolvió el VEGF-A (PBS + BSA al 1%) (Figura 7).

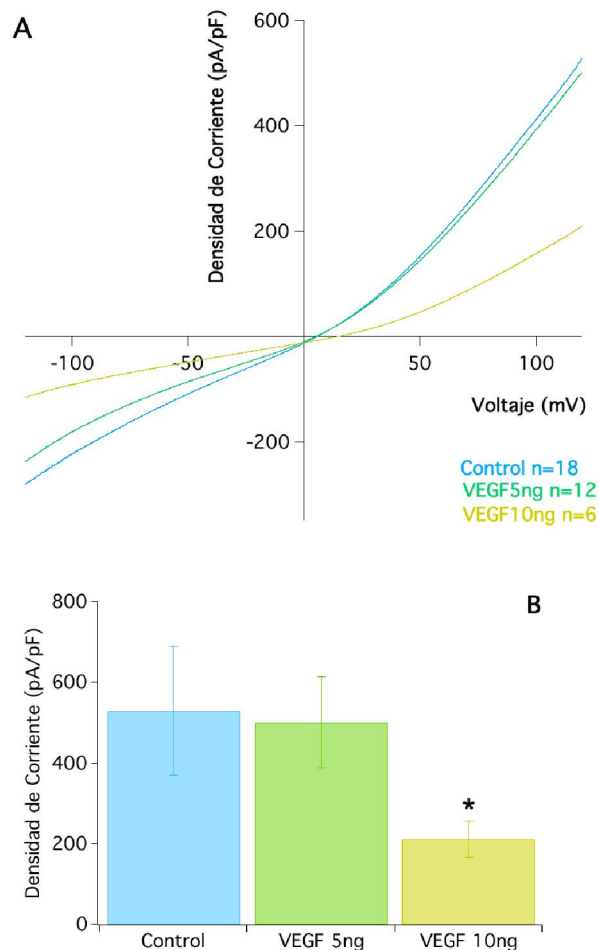


Figura 7. Cambios en la densidad de corriente del TRPV4 inducidos por VEGF. A) Se muestran los trazos de 3 grupos experimentales: Control (curva azul, n=18), VEGF-A [5 ng] (curva verde, n=12) y VEGF-A [10 ng] (curva amarilla, n=6). **B)** Análisis estadístico a 120 mV de los grupos mostrados en el panel A); * denota $p < 0.001$ por la prueba de ANOVA.

Los datos obtenidos muestran que el tratamiento de VEGF-A [10 ng] disminuyó la densidad de corriente de TRPV4 ($p < 0.001$), mientras que el tratamiento con 5 ng de VEGF-A no produjo diferencias significativas con respecto al grupo control.

Posteriormente, se realizaron registros del canal TRPV4 de humano ahora sin fusión a GFP debido a que dicha fusión se encuentra localizada en la región carboxilo terminal del canal, la cual es necesaria para procesos de maduración, plegamiento y tráfico del mismo (Ferrandiz-Huertas, Mathivanan, Wolf, Devesa, & Ferrer-Montiel, 2014; White *et al.*, 2016) y tiende a disminuir y a desestabilizar *per se* la expresión del canal.

Nuevamente se utilizaron células HEK293 ahora co-transfectadas con ADN de TRPV4 de humano sin fusión a GFP y con ADN para la GFP; el tratamiento con VEGF-A fue de [10 ng] ya que nuestros resultados previos indicaron que esta concentración producía cambios en la expresión del TRPV4 (Figura 8).

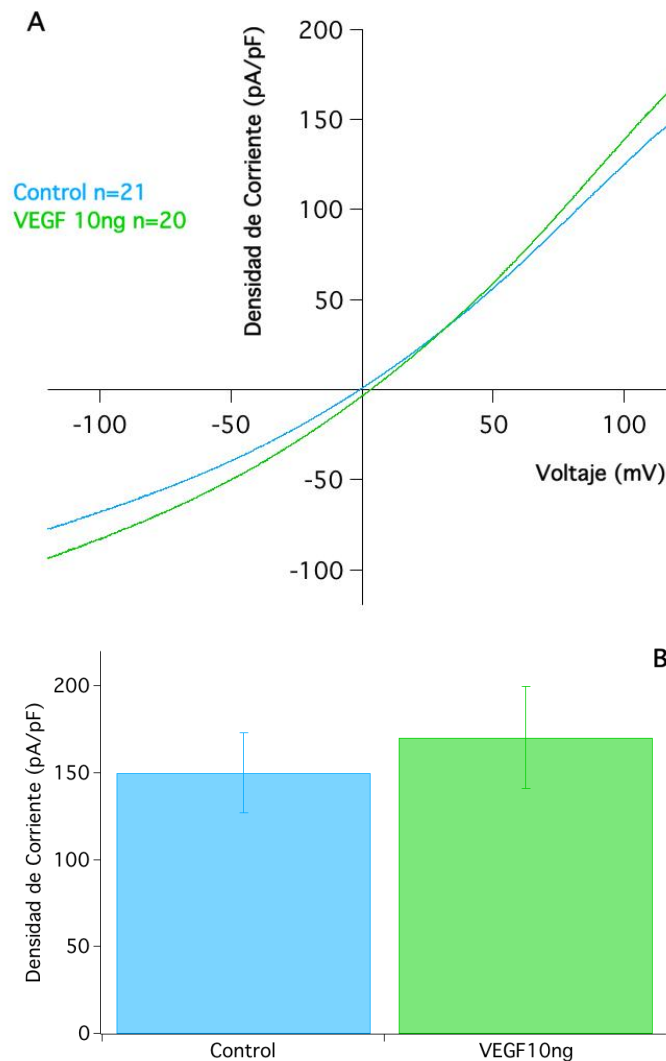


Figura 8. Efecto del tratamiento de VEGF-A [10 ng] sobre la actividad del TRPV4. A) Gráfico que muestra la densidad de corriente del grupo control (curva azul, n=21) y del grupo tratado con VEGF-A [10 ng] (curva verde, n=20). **B)** Gráfico de barras que representa el análisis estadístico por T-Student a 120 mV de ambos grupos, no se observan diferencias significativas.

Los primeros resultados obtenidos con la co-transfección no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el tratado con VEGF-A [10 ng] ($p > 0.05$). Dado que las células HEK293 constituyen un modelo de sobreexpresión de nuestra proteína de interés, pensamos que tal vez los efectos del VEGF-A se encontraban enmascarados (o sobrepasados) por nuestro protocolo experimental de transfección con una cantidad de ADN alta (2 μ g).

El siguiente lote de células registradas se transfectó con 1.5 μg de ADN codificante para el TRPV4 de humano sin fusión a GFP, y ADN para GFP; el tratamiento de VEGF-A aplicado al grupo experimental continuó siendo de [10 ng] (Figura 9).

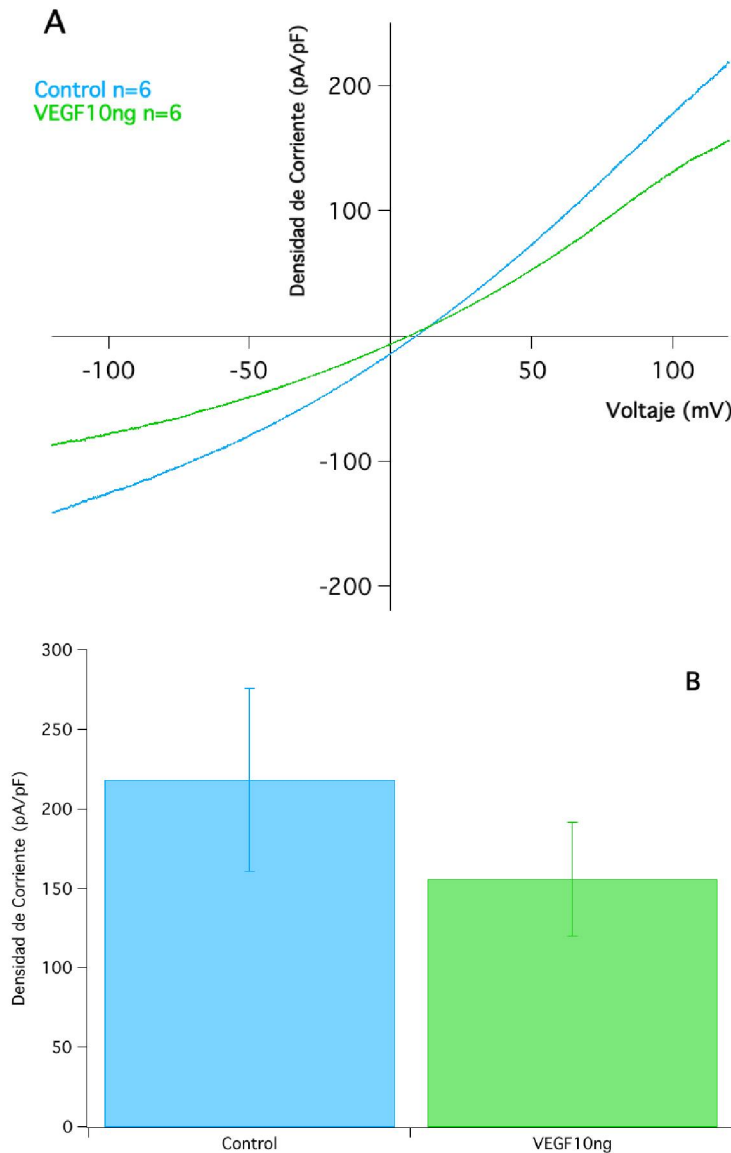


Figura 9. Efecto del tratamiento de VEGF-A [10 ng] sobre células HEK293 transfectadas con 1.5 μg de ADN. A) Gráfica que muestra la densidad de corriente de los grupos control (curva azul, n=6) y VEGF-A [10 ng] (curva verde, n=6) **B)** Análisis estadístico de ambos grupos mediante la prueba de T-Student, no se observan diferencias significativas.

Al disminuir la concentración de ADN de TRPV4 utilizado para la transfección de las HEK293 tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$), aunque existió una tendencia a la disminución en su expresión.

En un tercer lote de células, nuevamente se disminuyó la concentración de ADN de TRPV4, ahora a $0.75 \mu\text{g}$. Los resultados de las HEK293 co-transfectadas bajo estas condiciones se muestran en la Figura 10.

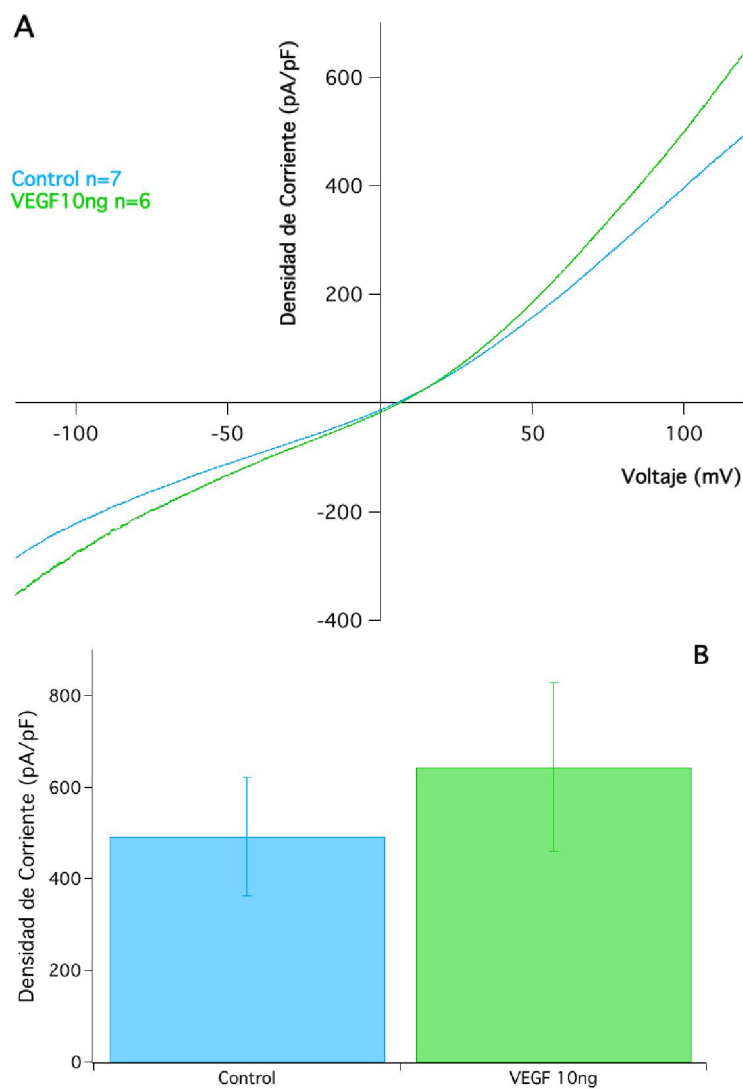


Figura 10. Células HEK293 transfectadas con $0.75 \mu\text{g}$ de ADN y tratadas con VEGF-A [10 ng]. **A)** Resultado obtenido con células HEK293 tratadas con vehículo (curva azul, $n=7$) y VEGF-A [10 ng] (curva verde, $n=6$) **B)** Gráfico de barras que representa el análisis estadístico por T-Student a 120 mV, no se observan diferencias significativas entre los grupos.

Los resultados en este experimento muestran una tendencia al aumento en la densidad de corriente en el grupo tratado con VEGF-A [10 ng] con respecto al grupo control, dicho resultado no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$).

6.2 Papel de la sobreexpresión del VEGFR2 sobre la expresión del TRPV4 en células HEK293

Todos estos resultados tan variables obtenidos a partir de experimentos que nos tomaron mucho tiempo para realizarlos, nos llevaron a concluir que difícilmente se podrían encontrar las condiciones adecuadas para estudiar los efectos del VEGF-A sobre la expresión del canal TRPV4 en el sistema de expresión heterólogo.

Por lo tanto, decidimos intentar sobre-expresar al receptor 2 de VEGF (VEGFR2) en las células HEK293, ya que concluimos que una de las razones para dicha variabilidad en nuestros experimentos previos podría ser que estas células no expresaran suficiente receptor.

Como se indicó en la metodología, se utilizó un plásmido con ADN codificante para VEGFR2 co-transfectado con TRPV4 de humano en células HEK293. Como un grupo control adicional se utilizó un vector que solo contenía ADN codificante para la proteína roja fluorescente (mCherry); las concentraciones de ADN de cada grupo experimental se detallan en la Tabla 1.

ADN/Grupo	Cherry	VEGFR2	VEGF [10 ng]
hTRPV4	[0.5 µg]	[0.5 µg]	[0.5 µg]
VEGFR2	-	[1 µg]	[1 µg]
GFP	[0.75 µg]	[0.75 µg]	[0.75 µg]
mCherry	[1 µg]	-	-
VEGF-A [10 ng]	-	-	X

Tabla 1. ADN utilizado para la co-transfección de células HEK293. Se muestran los 3 grupos experimentales utilizados (columnas) y la cantidad de ADN empleado en cada uno, al igual que el tratamiento con VEGF-A (filas).

Así fue que continuamos estudiando el efecto del VEGF-A sobre el canal TRPV4 en un sistema heterólogo que sobre-expresara el receptor 2 a VEGF (Figura 11).

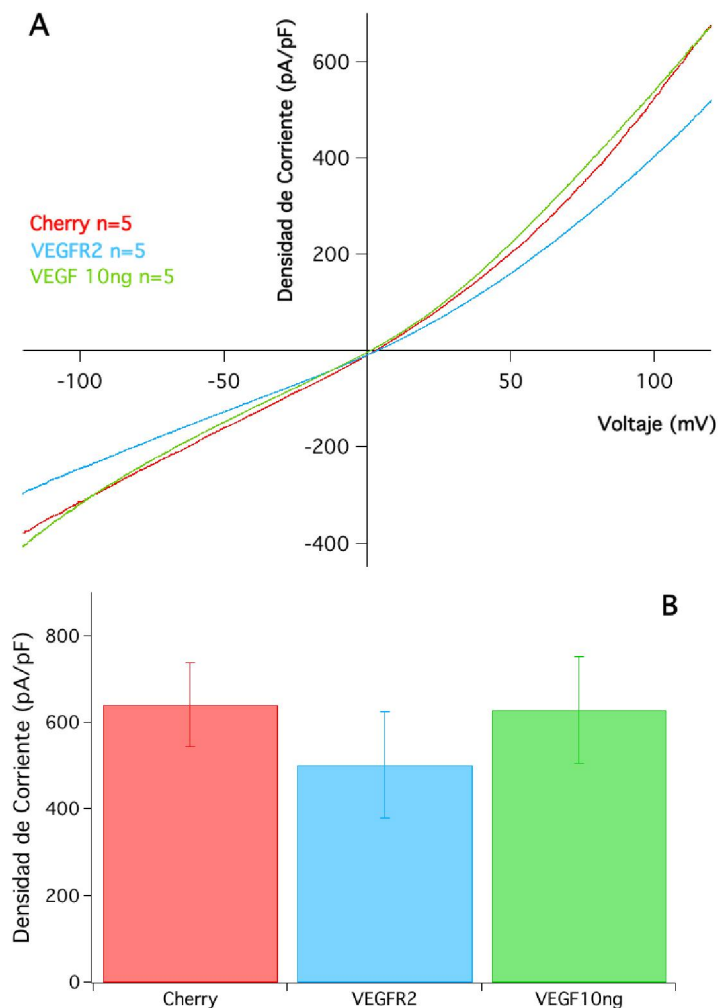


Figura 11. Efectos del tratamiento de VEGF-A [10 ng] sobre el TRPV4 en células HEK293 con sobre-expresión del VEGFR2. A) Se muestran los grupos experimentales co-transfectados como se describe en la Tabla 1: Cherry (curva roja, n=5); VEGFR2 (curva azul, n=5) y VEGF [10 ng] (curva verde, n=5). **B)** Gráfico de barras que representa el análisis estadístico a 120 mV por la prueba de ANOVA ($p > 0.05$).

Los resultados obtenidos en este experimento no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$); sin embargo al ser la primera vez que se co-transfectaban 3 ADN diferentes, pensamos que de forma similar a experimentos anteriores, la cantidad de ADN utilizado posiblemente no

permitiría observar un efecto más claro de la participación del VEGF-A y el VEGFR2 sobre la actividad de TRPV4.

Así, se realizaron nuevos experimentos (Figura 12) pero ahora usando una concentración igual para los distintos ADN (Tabla 2).

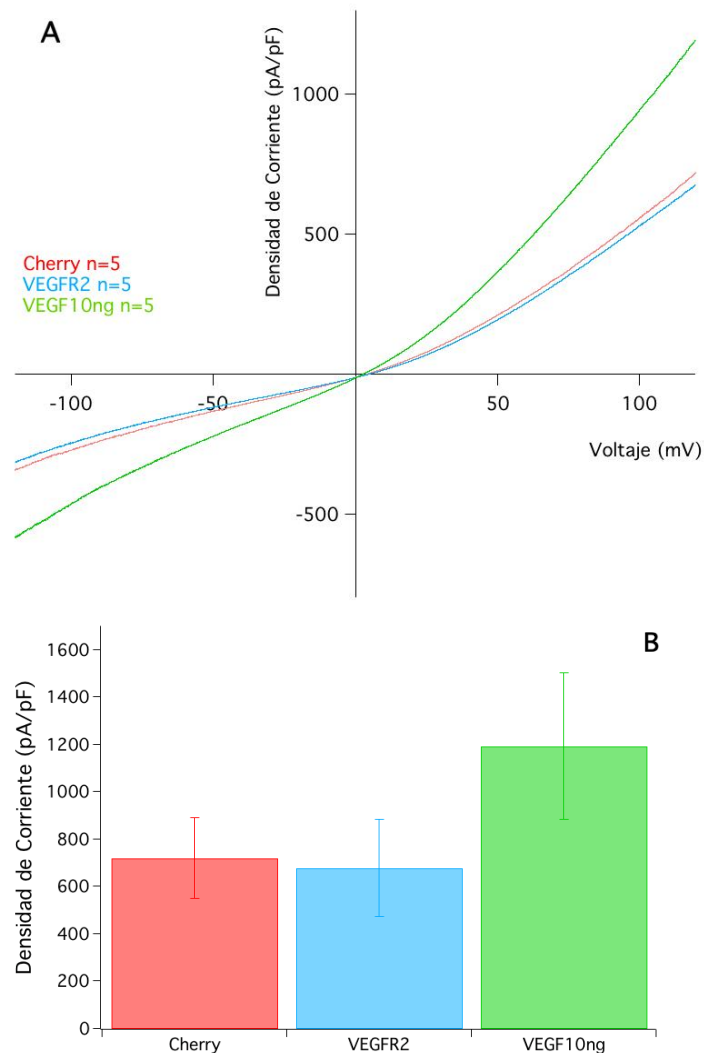


Figura 12. Células HEK293 co-transfectadas con cantidades iguales para los distintos ADN.

A) Se observan los trazos de 3 grupos: Cherry (curva roja, n=5); VEGFR2 (curva azul, n=5); VEGF-A [10 ng] (curva verde, n=5). **B)** El análisis de datos muestra una tendencia al aumento en la densidad de corriente del grupo tratado con VEGF-A [10 ng] (barra verde) con respecto a los otros grupos controles; la prueba de ANOVA no indicó diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

ADN/Grupo	Cherry	VEGFR2	VEGF [10 ng]
hTRPV4	[0.75 µg]	[0.75 µg]	[0.75 µg]
VEGFR2	-	[0.75 µg]	[0.75 µg]
GFP	[0.75 µg]	[0.75 µg]	[0.75 µg]
mCherry	[0.75 µg]	-	-
VEGF-A [10 ng]	-	-	X

Tabla 2. Co-transfección de células HEK293 con nuevas cantidades de ADN. Se muestran los 3 grupos experimentales (Cherry, VEGFR2 y VEGF-A [10 ng]); la cantidad de ADN utilizada para cada proteína fue la misma (0.75 µg) y el tratamiento con VEGF-A fue [10 ng].

Al disminuir la concentración de los diferentes ADN podemos observar un aumento en la densidad de corriente de TRPV4 en el grupo tratado con VEGF-A [10 ng]. Sin embargo, dicho aumento no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) y además es un efecto (o tendencia) contrario al que observamos en la Figura 7. La diferencia encontrada probablemente está relacionada con el hecho de que ambos experimentos tuvieron condiciones de transfección distintas.

6.3 El VEGF-A y la expresión del TRPV4 en células BMEC

Dado que ninguna de las estrategias experimentales que usamos para estudiar los efectos del VEGF-A sobre el canal TRPV4 expresado en células HEK293 funcionó de forma confiable, decidimos trabajar en el modelo BMEC, que es un sistema de expresión endógeno tanto para el TRPV4 como para el VEGFR2 (Adapala *et al.*, 2016; Kanugula *et al.*, 2019; Negri *et al.*, 2019; Thoppil *et al.*, 2015).

Así, empezamos a evaluar el efecto del VEGF-A [10 ng] sobre las corrientes iónicas de TRPV4 en células BMEC; los resultados de este primer experimento se muestran en la Figura 13.

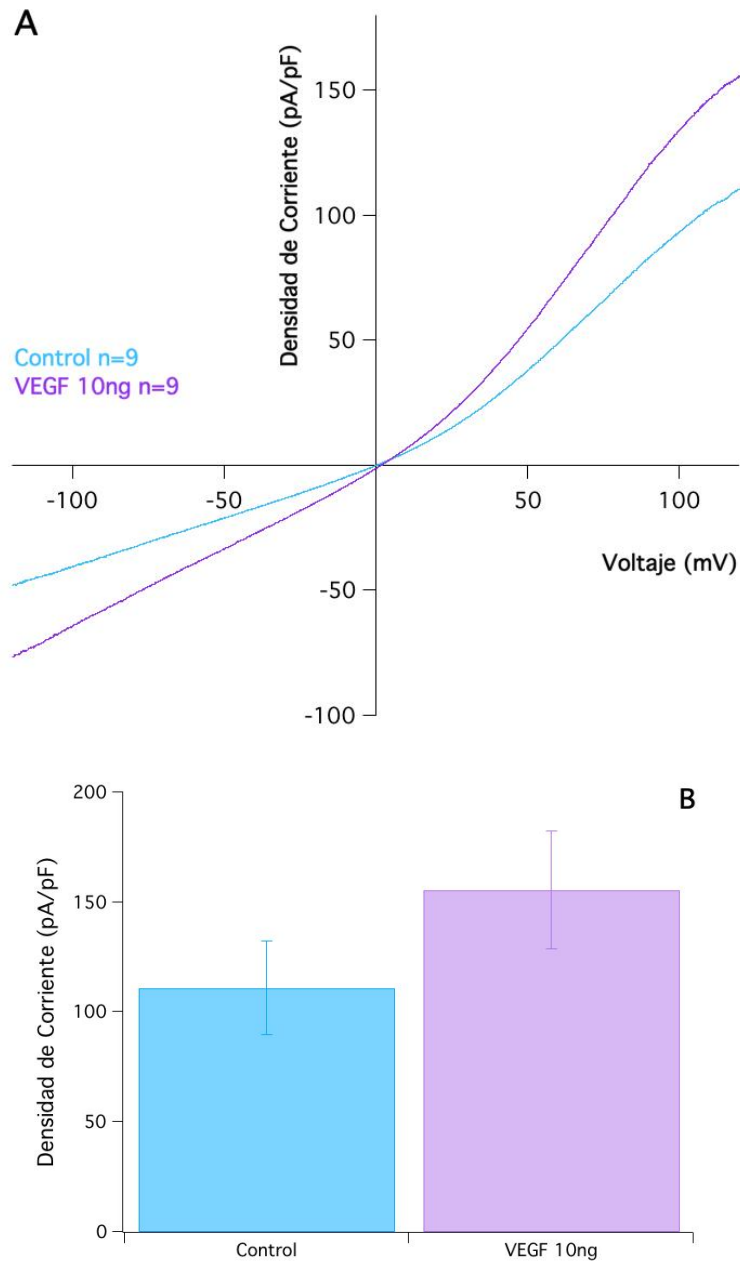


Figura 13. Efecto del tratamiento con VEGF-A [10 ng] en células BMEC. A) Gráfico que muestra los cambios en la densidad de corriente de TRPV4 de los grupos experimentales: Control (curva azul, n=9) y VEGF-A [10 ng] (curva morada, n=9). **B)** Gráfico de barras que representa el análisis a 120 mV de ambos grupos, la prueba T-Student no mostró diferencias estadísticas.

Al analizar los datos de este experimento se encontró nuevamente una tendencia al aumento (pero no estadísticamente significativa), en el grupo tratado con VEGF-A [10 ng] ($p > 0.05$). Con estos resultados obtenidos pensamos que una concentración alta de VEGF-A ([10 ng]) podría estar activando a dos receptores a

VEGF, al VEGFR1 y al VEGFR2, ya que este sistema expresa endógenamente a ambos (Shibuya, 2006). Por esta razón, decidimos disminuir la concentración del tratamiento con VEGF-A a [1 ng] (Figura 14).

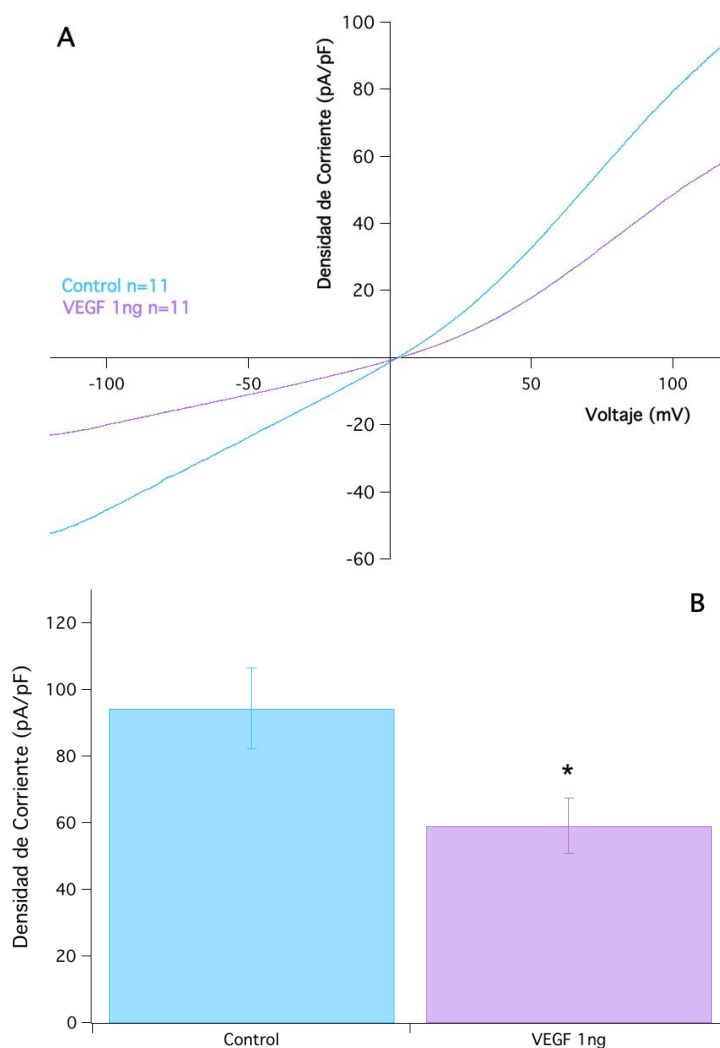


Figura 14. Células BMEC tratadas con VEGF-A [1 ng]. A) Los trazos que se muestran en la gráfica corresponden al grupo control (curva azul, n=9) y al grupo tratado con VEGF-A [1 ng] (curva morada, n=9). **B)** Análisis estadístico a 120 mV de los grupos mostrados en A), el tratamiento con VEGF-A [1 ng] disminuye la densidad de corriente; * denota $p < 0.05$ por la prueba de ANOVA.

El tratamiento de VEGF-A [1 ng] produjo un efecto de disminución en la densidad de corriente de TRPV4 en las BMEC, el cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control.

Con base en estos resultados, decidimos comenzar a investigar las vías de señalización que utiliza el VEGF-A para producir sus efectos en la expresión del canal TRPV4. Así, se utilizó el inhibidor SU1498, el cual es específico para el VEGFR2, con la finalidad de comprobar que dicho cambio en la densidad de corriente de TRPV4 se lleva a cabo a través de la interacción entre el VEGF-A con el VEGFR2 (Figura 15).

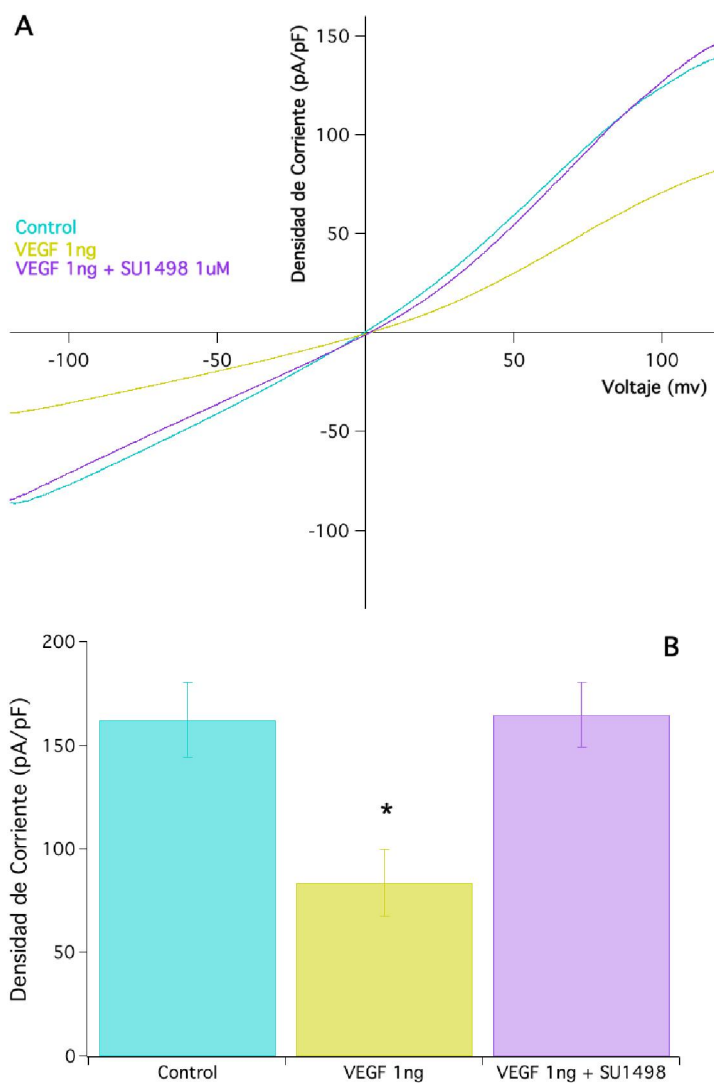


Figura 15. El inhibidor SU1498 bloquea el efecto del VEGF-A/VEGFR2 sobre el TRPV4. A) Gráfico que muestra la actividad del canal TRPV4 en los distintos grupos experimentales: Control (curva azul, n=10); VEGF-A [1 ng] (curva amarilla, n=21) y VEGF-A [1 ng] + SU1498 [1 μM] (curva morada, n=10). **B)** La prueba de ANOVA muestra diferencias significativas entre el grupo tratado con VEGF-A [1 ng] con respecto a los grupos control y tratado con el inhibidor SU1498 (p<0.01).

Observamos que, al igual que en la Figura 14, el tratamiento con VEGF-A [1 ng] disminuye la densidad de corriente de TRPV4 en las células BMEC ($p < 0.01$) y que cuando las células se incuban con el inhibidor SU1498 durante 30 minutos antes de agregar el VEGF-A, dicho efecto ya no se observa en la misma magnitud, teniendo como resultado que la densidad de corriente presente valores parecidos a los del grupo control.

Estos datos sugieren que el mecanismo por el cual el VEGF-A modifica la actividad del TRPV4 depende de la activación del VEGFR2 y de la consecuente señalización corriente abajo de este receptor.

Finalmente, para tratar de sustentar aún más estos últimos resultados, se utilizó el inhibidor Wortmannina (Figura 16) cuya molécula blanco es la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K), misma que es parte de la cascada de señalización que activa el VEGF-A al unirse al VEGFR2 (Shibuya & Claesson-Welsh, 2006).

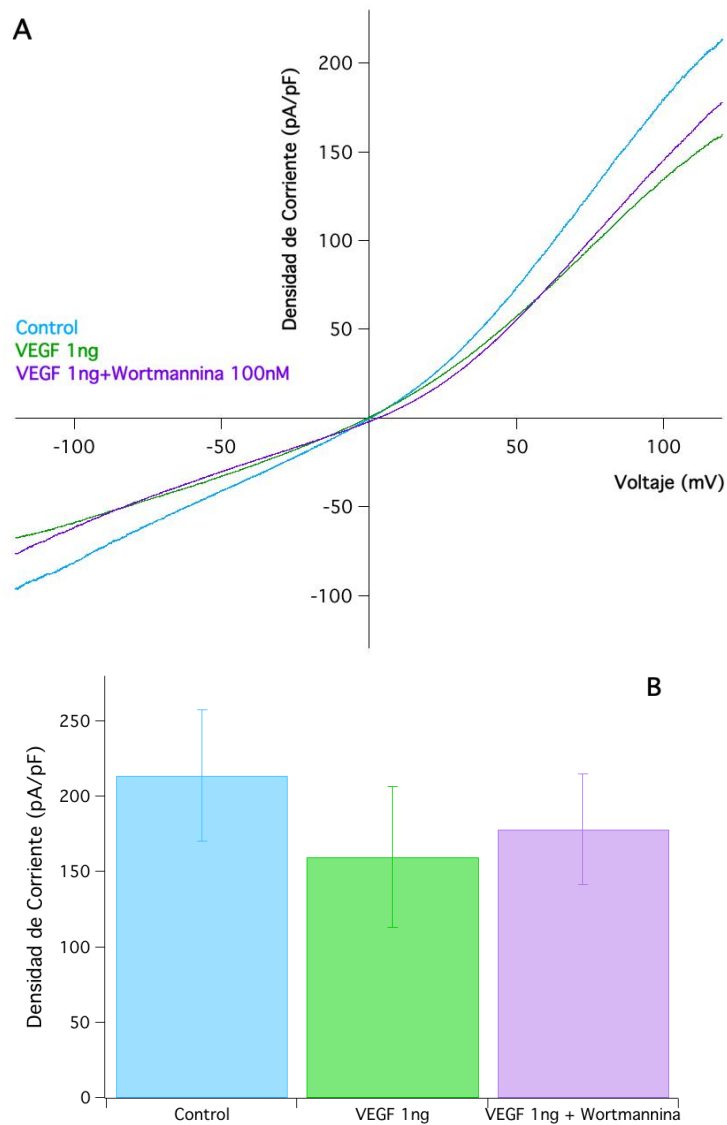


Figura 16. Cambios en la densidad de corriente de TRPV4 en células BMEC en presencia del inhibidor Wortmannina. A) Gráfico que muestra la actividad del TRPV4 en los distintos grupos experimentales: Control (curva azul, n=5); VEGF-A [1 ng] (curva verde, n=5) y VEGF-A [1 ng] + Wortmannina [100 nM] (curva morada, n=5). **B)** Análisis estadístico de los grupos mostrados en A), no se observan diferencias entre grupos por la prueba de ANOVA.

Al analizar los datos de este experimento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0.05$), lo que nos podría indicar que la vía de señalización que involucra a PI3K no forma parte del mecanismo que modifica la expresión del TRPV4. Sin embargo, al ser la primera vez que se utilizó el inhibidor Wortmannina, se podrían probar otras concentraciones para descartar dicha vía de señalización.

7. Discusión

Como se mencionó anteriormente, el canal TRPV4 es una proteína expresada en múltiples sistemas donde su actividad está implicada en el funcionamiento adecuado de las células, permitiendo el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y regulando la concentración intracelular de este ion ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) así como las vías de señalización descendentes que utilizan al Ca^{2+} como segundo mensajero (Thakore & Earley, 2019; White *et al.*, 2016).

En los últimos años, el canal TRPV4 ha recibido especial atención debido a su amplia expresión en el sistema cardiovascular, encontrándose presente en fibroblastos cardíacos, músculo liso vascular, nervios perivasculares y células endoteliales (Randhawa & Jaggi, 2015; Thakore & Earley, 2019). Por otra parte, diversos estudios relacionan la pérdida de la actividad del canal TRPV4 con distintas enfermedades como la disfunción endotelial, que a su vez, está asociada a una amplia gama de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, arterosclerosis, vasculopatías diabéticas, tumores vasculares, accidentes cerebrovasculares isquémicos, entre otras (Adapala *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018; White *et al.*, 2016).

Actualmente, la evidencia sugiere que el canal TRPV4 juega un papel importante en las células endoteliales, controlando los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la función vascular (Darby *et al.*, 2018; Heathcote *et al.*, 2019; Thakore & Earley, 2019). A su vez, el endotelio regula dinámicamente el tono vascular del músculo liso mediante las sustancias vasoactivas que secreta como hormonas, enzimas y factores de crecimiento, tal es el caso del VEGF y sus isoformas (Ferrara & Davis-Smyth, 1997; White *et al.*, 2016).

Recientemente, el grupo de Chen y colaboradores probaron que la activación de TRPV4 por el agonista específico 4 α -PDD (4 α -Phorbol 12,13-didecanoato) mejoraba la recuperación funcional de ratas sometidas a un accidente cerebrovascular transitorio al promover la angiogénesis y la neurogénesis. Realizaron inyecciones intravenosas en la cola de las ratas en distintos tiempos posteriores al

accidente cerebro-vascular, observando que el tratamiento con el agonista reducía el volumen del infarto en casi un 50%. Finalmente, estos autores evaluaron los posibles mecanismos de activación al medir los niveles de expresión y fosforilación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), del VEGF-A y VEGFR2, moléculas implicadas en los procesos de angiogénesis. Sus resultados mostraron un incremento en la expresión y fosforilación de la proteína eNOS, al igual que un aumento en los niveles de expresión del VEGF-A y VEGFR2 en los animales tratados (Chen *et al.*, 2018).

Sin embargo, pese a que se sabe que este canal participa en diversos procesos en las células endoteliales, existe muy poca información acerca de cómo se relaciona con otras proteínas expresadas en este tipo celular. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue el de tratar de encontrar evidencias sobre la regulación del canal TRPV4 por el VEGF-A dentro del sistema vascular endotelial.

Al utilizar el sistema de expresión heterólogo de células HEK293, los datos mostraron variabilidad ante los distintos tratamientos con VEGF-A empleados; sin embargo, dicha variabilidad probablemente se deba a que en este sistema con sobre-expresión de TRPV4 simplemente no pudimos establecer las condiciones adecuadas para observar un efecto claro del VEGF-A (Figuras 7-12).

Las células HEK293 tienen distintas características por las cuales se les considera un modelo celular ampliamente utilizado en el campo de la electrofisiología: algunas de ellas son su rápida y fácil reproducción y la existencia de distintos métodos para su transfección con una alta eficiencia, lo que conlleva a una adecuada producción de la proteína de interés (Thomas & Smart, 2005).

Sin embargo, es importante considerar que en las células HEK293 se puede presentar variabilidad en la eficiencia de traducción de la proteína de interés o en la exportación y ubicación en la región correcta (por ejemplo en la membrana plasmática), e incluso en el tipo de procesamiento post-traduccional necesario para la maduración de la proteína (procesos de glucosilación y plegamiento)

(Darby *et al.*, 2016; Ferrandiz-Huertas *et al.*, 2014; Thomas & Smart, 2005; White *et al.*, 2016).

En un primer experimento donde se transfectaron células HEK293 con ADN que codifica para el canal TRPV4 de humano fusionado a GFP se observó una disminución en la densidad de corriente en el grupo tratado con VEGF-A [10 ng] (Figura 7); sin embargo, al registrar al canal TRPV4 ahora sin fusión a GFP debido a que dicha fusión podría afectar la actividad del canal (por su ubicación en el extremo C-terminal), ya no se obtuvo el mismo resultado (Figura 8).

También es posible que los niveles de expresión de los receptores a VEGF en las células HEK293 no sean adecuados. En diferentes trabajos se discute la presencia de los receptores a VEGF (VEGFR1-3) en tipos celulares distintos a las células endoteliales, como en pericitos, megacariocitos, células madre hematopoyéticas, macrófagos, monocitos e incluso neuronas; sin embargo, no existen reportes que indiquen la presencia de los VEGFRs en las células HEK293 (Alvarez-Aznar *et al.*, 2017; Holmes *et al.*, 2007; Katoh, Tauchi, Kawaishi, Kimura, & Satow, 1995).

Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados mostrados en la Figura 12 donde se sobre-expresó el VEGFR2. En este experimento no se observaron cambios entre el grupo control (curva roja) y el grupo con el VEGFR2 sobre-expresado pero sin tratamiento de VEGF-A (curva azul), pero sí hubo una tendencia al aumento en la densidad de corriente del grupo que tiene sobre-expresado al VEGFR2 y además tiene el tratamiento de VEGF-A [10 ng] (curva verde) con respecto a los grupos controles.

Finalmente, debemos considerar que existen una gran cantidad de proteínas que, de forma constitutiva, se encuentran presentes en las células HEK293 y que existe la posibilidad de que algunas de esas proteínas endógenas lejos de brindar los substratos correctos para las cascadas de señalización, puedan interferir con la función de la proteína exógena (Thomas & Smart, 2005).

En resumen, todos los experimentos con las células HEK293 arrojaron información de naturaleza inconsistente, siendo que en ocasiones aumentaba la densidad de corriente y en otras la disminuía. Por esta razón, decidimos enfocarnos en el modelo de expresión endógeno, las células BMEC.

Las células BMEC han demostrado ser un buen modelo de estudio para comprender los mecanismos que regulan la función vascular endotelial de procesos como la angiogénesis, la vasculogénesis, la regulación de la barrera hematoencefálica, en accidentes cerebro-vasculares isquémicos, entre otras (Rosas-Hernandez, Cuevas, Lantz, Paule, & Ali, 2018; Ruck, Bittner, Epping, Herrmann, & Meuth, 2014).

Asimismo, se ha demostrado que este tipo celular expresa de manera endógena a distintos miembros de la superfamilia de canales TRP, sin embargo, solo 11 miembros han mostrado tener un papel funcional (TRPA1; TRPV1-4; TRPC1, 3, 4, 5 y 6; TRPM2 y TRPP1) (Cappelli *et al.*, 2019; Di & Malik, 2010; Kanugula *et al.*, 2019; Pu *et al.*, 2015).

La función de los canales TRP en el endotelio vascular ha sido discutida ampliamente y, en general, los mecanismos que regulan estos canales en el endotelio vascular son principalmente el control de los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ resultantes de la entrada directa de Ca^{2+} a través de los canales TRP o la regulación de los eventos de señalización subcelular de Ca^{2+} que involucran las reservas intracelulares de Ca^{2+} (Di & Malik, 2010; Thakore & Earley, 2019).

Los primeros experimentos en las BMEC utilizando los tratamientos con VEGF-A exhibieron efectos distintos, siendo que el tratamiento con [10 ng] modificó la densidad de corriente del TRPV4 con una tendencia al aumento (Figura 13), mientras que el tratamiento con [1 ng] disminuyó la densidad de corriente del canal ($p < 0.05$) (Figura 14). Estos resultados nos indican que la actividad del canal TRPV4 en las BMEC se ve modificada por la presencia del VEGF-A, y que es posible que el efecto que observamos (aumento o disminución de la densidad de corriente) esté mediada por la concentración del tratamiento de VEGF-A.

Esta hipótesis se ve apoyada por el trabajo de Zhao y colaboradores, donde reportan que el tratamiento con VEGF aplicado a células endoteliales de cerebro de ratón aumenta la expresión del receptor GLUT-1 y que dicho efecto depende de la concentración del VEGF utilizada (10, 50 o 100 ng/ml) (Zhao *et al.*, 2015).

Como se mencionó en la sección de resultados, pensamos que una concentración elevada de VEGF-A podría estar activando tanto al VEGFR1 como al VEGFR2, ya que se sabe que la afinidad por el VEGF-A es mayor en el receptor 1 que en el 2, sin embargo la actividad tirosina cinasa del VEGFR1 es menor en comparación al VEGFR2. Este sistema de regulación positiva y negativa es necesaria para la función correcta del sistema vascular (Eichmann & Simons, 2012; Failla, Carbo, & Morea, 2018).

De igual forma, otros estudios muestran la presencia de una variante soluble del VEGFR1 (sVEGFR1) en células endoteliales, la cual tiene la misma afinidad por el VEGF-A que tiene el receptor completo, pero carece de los dominios transmembranal e intracelular, por lo que estaría funcionando como un secuestrador del VEGF-A disponible, evitando así la activación de la cascada de señalización que regula el VEGFR2 (Alvarez-Aznar *et al.*, 2017; Karaman *et al.*, 2018).

Esta hipótesis podría estar detrás de los resultados obtenidos con las células BMEC. El VEGF-A a la concentración de 10 ng, que mostró una tendencia al aumento en la densidad de corriente del TRPV4 (Figura 13), podría estar interactuando con el VEGFR1, sVEGFR1 y VEGFR2; el VEGFR1 y su forma soluble estarían reduciendo el VEGF-A disponible para activar al VEGFR2, por lo que la activación del VEGFR2 se modificaría y también lo haría la actividad del canal TRPV4. Por otra parte, el tratamiento con VEGF-A [1 ng] mostró un efecto contrario, una disminución significativa ($p < 0.05$) de la densidad de corriente del TRPV4 (Figura 14).

Aunque ambos resultados parecen ser contradictorios, tienen algo en común: la participación del VEGFR2 y la participación de sus vías de señalización

descendientes que podrían estar modificando la actividad y/o expresión del canal TRPV4. Por tal motivo, decidimos investigar las vías de señalización que utiliza el VEGF-A a partir del VEGFR2.

Estudios previos han reportado que la señalización por VEGF vía VEGFR2 es el principal mecanismo regulador de distintas funciones en células endoteliales, por tal motivo, la señalización vía VEGF/VEGFR está controlada a varios niveles que incluyen la expresión del receptor, disponibilidad, reciclado, localización y fosforilación del mismo (Melincovici *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que el TRPV4 regula negativamente el proceso de angiogénesis en células endoteliales de la microvasculatura humana, controlando la localización y/o activación del VEGFR2 (desde la membrana plasmática hacia el aparato de Golgi), indicando que la angiogénesis es modulada por las vías de señalización que desencadenan estas dos proteínas (Kanugula *et al.*, 2019).

De igual forma, nuestros resultados muestran que la interacción entre TRPV4 y VEGF-A está mediada por la actividad del VEGFR2, ya que al utilizar el inhibidor SU1498 la señalización corriente abajo de dicho receptor se modifica, reflejándose en la pérdida del efecto de disminución de la densidad de corriente de TRPV4 (Figura 15).

Finalmente, aún queda por determinar cuál vía o vías de señalización participan en este proceso de regulación, ya que al utilizar el inhibidor a PI3K, Wortmannina, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 16).

8. Conclusiones

- Al utilizar el sistema de expresión heterólogo, las células HEK293, los datos mostraron variabilidad ante los distintos tratamientos de VEGF-A empleados. La sobreexpresión del canal podría ser uno de los factores que resultan en la poca reproducibilidad de los efectos. Otras razones para lo anterior podrían incluir la expresión diferencial de receptores a VEGF-A, así como vías de señalización disímiles de las que se activan en las células BMEC. Por lo tanto, decidimos que no es un buen modelo para estudiar los efectos del VEGF-A sobre la expresión del TRPV4.

- En las células BMEC, el VEGF-A promueve una disminución en la expresión del TRPV4 a nivel de la membrana plasmática.

- En las BMEC, la interacción entre TRPV4 y VEGF-A está mediada por la actividad del VEGFR2.

- La inhibición de la vía de señalización que involucra la actividad de PI3K no modifica la actividad o expresión del TRPV4 en células BMEC.

9. Perspectivas

- Evaluar el efecto del VEGF-A sobre las corrientes iónicas macroscópicas del canal TRPV4 en células de la microvasculatura endotelial cerebral de ratón (BMEC) utilizando técnicas de electrofisiología.
- Comparar el efecto del VEGF-A sobre los niveles de expresión del canal TRPV4 en células BMEC utilizando técnicas bioquímicas. Será importante corroborar con otras técnicas, además de las electrofisiológicas, si los tratamientos con VEGF-A aumentan o disminuyen los niveles de proteína total y de membrana del canal TRPV4.
- Disectar el mecanismo molecular (vías de señalización) por medio del cual el VEGF-A afecta la actividad del canal TRPV4 en células BMEC. Se plantea utilizar inhibidores de las vías de señalización descendentes a VEGFR2.

10. Bibliografia

1. Adapala, R. K., Thoppil, R. J., Ghosh, K., Cappelli, H. C., Dudley, A. C., Paruchuri, S., . . . Thodeti, C. K. (2016). Activation of mechanosensitive ion channel TRPV4 normalizes tumor vasculature and improves cancer therapy. *Oncogene*, *35*(3), 314-322. doi:10.1038/onc.2015.83
2. Alvarez-Aznar, A., Muhl, L., & Gaengel, K. (2017). VEGF Receptor Tyrosine Kinases: Key Regulators of Vascular Function. *Curr Top Dev Biol*, *123*, 433-482. doi:10.1016/bs.ctdb.2016.10.001
3. Cai, M., Wang, K., Murdoch, C. E., Gu, Y., & Ahmed, A. (2017). Heterodimerisation between VEGFR-1 and VEGFR-2 and not the homodimers of VEGFR-1 inhibit VEGFR-2 activity. *Vascul Pharmacol*, *88*, 11-20. doi:10.1016/j.vph.2016.11.007
4. Cappelli, H. C., Kanugula, A. K., Adapala, R. K., Amin, V., Sharma, P., Midha, P., . . . Thodeti, C. K. (2019). Mechanosensitive TRPV4 channels stabilize VE-cadherin junctions to regulate tumor vascular integrity and metastasis. *Cancer Lett*, *442*, 15-20. doi:10.1016/j.canlet.2018.07.042
5. Chaffey, N. (2003). Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn. *Annals of Botany*, *91*(3), 401-401. doi:10.1093/aob/mcg023
6. Chen, C. K., Hsu, P. Y., Wang, T. M., Miao, Z. F., Lin, R. T., & Juo, S. H. (2018). TRPV4 Activation Contributes Functional Recovery from Ischemic Stroke via Angiogenesis and Neurogenesis. *Mol Neurobiol*, *55*(5), 4127-4135. doi:10.1007/s12035-017-0625-0
7. Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, *426*(6966), 517-524. doi:10.1038/nature02196
8. Colbert, H. A., Smith, T. L., & Bargmann, C. I. (1997). OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, *17*(21), 8259-8269.
9. Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, *224*(5216), 285-287. doi:10.1038/224285a0

10. Cudmore, M. J., Hewett, P. W., Ahmad, S., Wang, K. Q., Cai, M., Al-Ani, B., . . . Ahmed, A. (2012). The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat Commun*, 3, 972. doi:10.1038/ncomms1977
11. Darby, W. G., Grace, M. S., Baratchi, S., & McIntyre, P. (2016). Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*, 78, 217-228. doi:10.1016/j.biocel.2016.07.012
12. Darby, W. G., Potocnik, S., Ramachandran, R., Hollenberg, M. D., Woodman, O. L., & McIntyre, P. (2018). Shear stress sensitizes TRPV4 in endothelium-dependent vasodilatation. *Pharmacol Res*, 133, 152-159. doi:10.1016/j.phrs.2018.05.009
13. Delany, N. S., Hurle, M., Facer, P., Alnadaf, T., Plumpton, C., Kinghorn, I., . . . Tate, S. N. (2001). Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics*, 4(3), 165-174. doi:10.1152/physiolgenomics.2001.4.3.165
14. Deng, Z., Paknejad, N., Makshev, G., Sala-Rabanal, M., Nichols, C. G., Hite, R. K., & Yuan, P. (2018). Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nat Struct Mol Biol*, 25(3), 252-260. doi:10.1038/s41594-018-0037-5
15. Di, A., & Malik, A. B. (2010). TRP channels and the control of vascular function. *Curr Opin Pharmacol*, 10(2), 127-132. doi:10.1016/j.coph.2009.11.010
16. Du, J., Ma, X., Shen, B., Huang, Y., Birnbaumer, L., & Yao, X. (2014). TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel. *FASEB J*, 28(11), 4677-4685. doi:10.1096/fj.14-251652
17. Eichmann, A., & Simons, M. (2012). VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol*, 24(2), 188-193. doi:10.1016/j.ceb.2012.02.002
18. Failla, C. M., Carbo, M., & Morea, V. (2018). Positive and Negative Regulation of Angiogenesis by Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. *Int J Mol Sci*, 19(5). doi:10.3390/ijms19051306

19. Ferrandiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C. J., Devesa, I., & Ferrer-Montiel, A. (2014). Trafficking of ThermoTRP Channels. *Membranes (Basel)*, 4(3), 525-564. doi:10.3390/membranes4030525
20. Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18(1), 4-25. doi:10.1210/edrv.18.1.0287
21. Grace, M. S., Bonvini, S. J., Belvisi, M. G., & McIntyre, P. (2017). Modulation of the TRPV4 ion channel as a therapeutic target for disease. *Pharmacol Ther*, 177, 9-22. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.019
22. Heathcote, H. R., Lee, M. D., Zhang, X., Saunter, C. D., Wilson, C., & McCarron, J. G. (2019). Endothelial TRPV4 channels modulate vascular tone by Ca(2+) -induced Ca(2+) release at IP3 receptors. *Br J Pharmacol*. doi:10.1111/bph.14762
23. Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., & Cross, M. J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 19(10), 2003-2012. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013
24. Kanugula, A. K., Adapala, R. K., Midha, P., Cappelli, H. C., Meszaros, J. G., Paruchuri, S., . . . Thodeti, C. K. (2019). Novel noncanonical regulation of soluble VEGF/VEGFR2 signaling by mechanosensitive ion channel TRPV4. *FASEB J*, 33(1), 195-203. doi:10.1096/fj.201800509R
25. Karaman, S., Leppanen, V. M., & Alitalo, K. (2018). Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development*, 145(14). doi:10.1242/dev.151019
26. Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A., & Satow, Y. (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*, 55(23), 5687-5692.
27. Kumar, H., Lee, S. H., Kim, K. T., Zeng, X., & Han, I. (2018). TRPV4: a Sensor for Homeostasis and Pathological Events in the CNS. *Mol Neurobiol*, 55(11), 8695-8708. doi:10.1007/s12035-018-0998-8

28. Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., . . . Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, *103*(3), 525-535. doi:10.1016/s0092-8674(00)00143-4
29. Ma, X., Cheng, K. T., Wong, C. O., O'Neil, R. G., Birnbaumer, L., Ambudkar, I. S., & Yao, X. (2011). Heteromeric TRPV4-C1 channels contribute to store-operated Ca(2+) entry in vascular endothelial cells. *Cell Calcium*, *50*(6), 502-509. doi:10.1016/j.ceca.2011.08.006
30. Ma, X., Nilius, B., Wong, J. W., Huang, Y., & Yao, X. (2011). Electrophysiological properties of heteromeric TRPV4-C1 channels. *Biochim Biophys Acta*, *1808*(12), 2789-2797. doi:10.1016/j.bbame.2011.07.049
31. Matsumoto, T., & Claesson-Welsh, L. (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, *2001*(112), re21. doi:10.1126/stke.2001.112.re21
32. Melincovici, C. S., Bosca, A. B., Susman, S., Marginean, M., Miha, C., Istrate, M., . . . Miha, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, *59*(2), 455-467.
33. Minke, B., & Cook, B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev*, *82*(2), 429-472. doi:10.1152/physrev.00001.2002
34. Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, *2005*(272), re3. doi:10.1126/stke.2722005re3
35. Negri, S., Faris, P., Berra-Romani, R., Guerra, G., & Moccia, F. (2019). Endothelial Transient Receptor Potential Channels and Vascular Remodeling: Extracellular Ca(2+) Entry for Angiogenesis, Arteriogenesis and Vasculogenesis. *Front Physiol*, *10*, 1618. doi:10.3389/fphys.2019.01618
36. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, *13*(1), 9-22.
37. Nilius, B., & Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev*, *81*(4), 1415-1459. doi:10.1152/physrev.2001.81.4.1415

38. Nilius, B., Prenen, J., Wissenbach, U., Boding, M., & Droogmans, G. (2001). Differential activation of the volume-sensitive cation channel TRP12 (OTRPC4) and volume-regulated anion currents in HEK-293 cells. *Pflugers Arch*, 443(2), 227-233. doi:10.1007/s004240100676
39. Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, 38(3-4), 233-252. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.028
40. Pu, J., Wang, Z., Zhou, H., Zhong, A., Ruan, L., Jin, K., & Yang, G. (2015). [Role of TRPV4 channels in regulation of eNOS expression in brain microvascular endothelial cells under the condition of mechanical stretch]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 40(9), 960-966. doi:10.11817/j.issn.1672-7347.2015.09.003
41. Randhawa, P. K., & Jaggi, A. S. (2015). TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system. *Basic Res Cardiol*, 110(6), 54. doi:10.1007/s00395-015-0512-7
42. Rosas-Hernandez, H., Cuevas, E., Lantz, S. M., Paule, M. G., & Ali, S. F. (2018). Isolation and Culture of Brain Microvascular Endothelial Cells for In Vitro Blood-Brain Barrier Studies. *Methods Mol Biol*, 1727, 315-331. doi:10.1007/978-1-4939-7571-6_23
43. Rosasco, M. G., & Gordon, S. E. (2017). Frontiers in Neuroscience. TRP Channels: What Do They Look Like? In nd & T. L. R. Emir (Eds.), *Neurobiology of TRP Channels* (pp. 1-9). Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis (c) 2018 by Taylor & Francis Group, LLC.
44. Ruck, T., Bittner, S., Epping, L., Herrmann, A. M., & Meuth, S. G. (2014). Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells. *J Vis Exp*(93), e52204. doi:10.3791/52204
45. Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*, 9(4), 225-230; discussion 231. doi:10.1007/s10456-006-9055-8
46. Shibuya, M., & Claesson-Welsh, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*, 312(5), 549-560. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.012

47. Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(10), 611-625. doi:10.1038/nrm.2016.87
48. Takahashi, H., & Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 109(3), 227-241. doi:10.1042/cs20040370
49. Takahashi, S. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull*, 34(12), 1785-1788.
50. Thakore, P., & Earley, S. (2019). Transient Receptor Potential Channels and Endothelial Cell Calcium Signaling. *Compr Physiol*, 9(3), 1249-1277. doi:10.1002/cphy.c180034
51. Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51(3), 187-200. doi:10.1016/j.vascn.2004.08.014
52. Thoppil, R. J., Adapala, R. K., Cappelli, H. C., Kondeti, V., Dudley, A. C., Gary Meszaros, J., . . . Thodeti, C. K. (2015). TRPV4 channel activation selectively inhibits tumor endothelial cell proliferation. *Sci Rep*, 5, 14257. doi:10.1038/srep14257
53. Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76, 387-417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
54. Vincent, F., & Duncton, M. A. (2011). TRPV4 agonists and antagonists. *Curr Top Med Chem*, 11(17), 2216-2226. doi:10.2174/156802611796904861
55. White, J. P., Cibelli, M., Urban, L., Nilius, B., McGeown, J. G., & Nagy, I. (2016). TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiol Rev*, 96(3), 911-973. doi:10.1152/physrev.00016.2015
56. Wissenbach, U., Bodding, M., Freichel, M., & Flockerzi, V. (2000). Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett*, 485(2-3), 127-134. doi:10.1016/s0014-5793(00)02212-2

57. Yao, X., & Garland, C. J. (2005). Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res*, 97(9), 853-863. doi:10.1161/01.RES.0000187473.85419.3e
58. Zhao, F., Deng, J., Yu, X., Li, D., Shi, H., & Zhao, Y. (2015). Protective effects of vascular endothelial growth factor in cultured brain endothelial cells against hypoglycemia. *Metab Brain Dis*, 30(4), 999-1007. doi:10.1007/s11011-015-9659-z