



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
UNIDAD DE POSGRADO**

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,  
Odontológicas y de la Salud**

**TÍTULO DEL TRABAJO:**

*Papel de la fosfatasa de tirosina PTP1B en la transición endotelio-mesénquima como mecanismo de disfunción endotelial inducido por inflamación.*

**MODALIDAD DE TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Doctor en Ciencias Médicas**

**PRESENTA:**

Jorge Rafael Romo Tena

**TUTORA:**

Dr. María de Jesús Ibarra Sánchez  
Unidad de Bioquímica,  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez, Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2023**



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.



---

ALUMNO

Jorge Rafael Romo Tena

Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición Salvador Zubirán



---

TUTORA

Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez

Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición Salvador Zubirán



---

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas

Dirección de Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición Salvador Zubirán

## **LUGAR DE REALIZACIÓN**

El trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, y en la Rama en Autoinmunidad Sistémica (del inglés, *Systemic Autoimmunity Branch*) del Instituto Nacional de Artritis y Enfermedades Musculoesqueléticas y de la Piel (NIAMS, del inglés *National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases*), dentro de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, del inglés *National Institutes of Health*), Bethesda, Maryland, EUA.

## **FINANCIAMIENTO**

El trabajo fue financiado por el Programa de Investigación Intramuros (del inglés *Intramural Research Program*) del NIAMS/NIH; ZIA AR041199. JRRT fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (CVU 507156); el Programa para Investigadores de la Beca Fulbright-García Robles, a cargo de la Comisión México-Estados Unidos para el Intercambio Educativo y Cultural (COMEXUS), y el Premio a la Investigación en Reumatología 2019, categoría Ciencia Básica – Junior, por parte de la Liga Panamericana de Asociaciones de Reumatología (PANLAR, del inglés *Pan-American League of Associations of Rheumatology*).

## **CODIRECCIÓN**

El trabajo fue codirigido por el Dr. José Esparza López, Investigador en Ciencias Médicas de la Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, y por la Dra. Mariana J. Kaplan, Investigadora Principal y Jefa de la Rama en Autoinmunidad Sistémica, y Directora Científica Adjunta, NIAMS/NIH.

*A la memoria de María Antonieta Tena Fernández.*

## **Agradecimientos**

*Mucho agradezco a la **Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez** por haber recorrido junto conmigo este largo camino, procurando siempre ponerme a prueba y sacar lo mejor de mí. De ella aprendí que el conocimiento y mis aptitudes serán siempre mis mejores aliados ante cualquier batalla, y el trabajo, mi mayor defensa.*

*Muchas gracias a la **Dra. Mariana J. Kaplan** por su visión y confianza en mí para dejarme formar parte de su gran equipo y emprender juntos nuevas misiones. Gracias por proveerme con todas las herramientas necesarias para completar mi doctorado y por su inagotable apoyo, especialmente en situaciones adversas. De ella aprendí que, para alcanzar cualquier objetivo, el esfuerzo, tenacidad y perseverancia se complementan con una buena comunicación y trabajo en equipo.*

*Muchas gracias al **Dr. José Esparza López**, quien fue parte fundamental en esta historia, y a los **Drs. Leticia Rocha Zavaleta, Alejandro Zentella Dehesa y Jorge Carlos Alcocer Varela**, quienes como integrantes de mi comité tutorial, me dieron su consejo y respaldo en todo momento durante mi doctorado.*

*Gracias al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por siempre mi ‘alma mater’, a quien tengo la misión y responsabilidad de poner en alto. Gracias especiales al **Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas**, por siempre contar con su gran apoyo, orientación y confianza, y al **Dr. Gerardo Gamba Ayala**, por su apoyo, interés y motivación. De igual manera, agradezco a la **Dra. Marina Rull Gabayet** y a la **Dra. Juanita Romero Díaz** del Departamento de Inmunología y Reumatología por creer en mí y brindarme su mano siempre; gracias a la **Dra. Janette Furuzawa Carballeda** por su amistad y cobijo cuando más fue necesario, y a los **Drs. Florencia Rosetti Sciutto y José Carlos Crispín Acuña** y a su increíble grupo de trabajo, por su gran soporte, enseñanzas, consejo, motivación e inspiración. La trayectoria y labor de estos grandes médicos especialistas e investigadores serán siempre mi inspiración, aliciente, referencia y ejemplo a donde quiera que vaya.*

*Gracias al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas de la Unidad de Posgrado de la UNAM. Especialmente agradezco a la **Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes** y a la **Lic. Aleithia Manzanares Villegas** por su inagotable apoyo, comprensión y orientación, así como por ser grandes responsables de la culminación de mi tesis y obtención de grado.*

*Muchas gracias a NIAMS-NIH, en especial al **Dr. John O’Shea**, así como a mis compañeros y colaboradores de la Rama en Autoinmunidad Sistémica, en especial a los **Drs. Carmelo Carmona Rivera y Luz P. Blanco**, por incontables enseñanzas y momentos compartidos. Gracias también al programa Graduate Partnerships Program de los NIH, del cual tuve el privilegio de formar parte y que me brindó en todo momento soporte, orientación, estímulos y enseñanzas. Especialmente, agradezco al **Dr. Phil Wang**, por su gran soporte, calidez y empatía durante momentos complicados e inciertos.*

*Muchas gracias a CONACYT, al Premio a la Investigación en Reumatología 2019 por PANLAR y a la Beca Fulbright-García Robles por brindarme los medios necesarios para culminar mi proyecto de tesis, así como por apoyar y fomentar la investigación científica básica y el intercambio educativo y cultural.*

*Gracias merecidas a mis sinodales, la **Dra. Florencia Rosetti Sciutto**, la **Dra. Norma Araceli Bobadilla Sandoval**, el **Dr. Jesús Antonio González Hermosillo** y el **Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez**, por ayudarme con su visión y conocimiento a redondear el esfuerzo de muchos años, así como por su aliento durante los últimos metros previos a cruzar la meta.*

*Reservo las últimas líneas para mis padres, Jorge Héctor y Ana Elisa, y mis hermanas, Ana Elisa, Natalia y Coqui. Gracias por tanto cariño e interés por mi trabajo y por acompañarme y ser mi soporte en cada tramo del camino, por más oscuro y sinuoso que pudiera llegar a ser, ya fuera de cerca o a la distancia. De ustedes he aprendido que el trabajo bien realizado y apasionado y la disciplina son la mejor definición de uno mismo y el mejor resguardo ante la adversidad; a lo largo de estos años he podido ser consciente de que toda experiencia, positiva o negativa, siempre sabrá mejor si es compartida. Mi mayor dicha en la vida es formar parte del mejor equipo con ustedes, al lado de mis queridos sobrinos, Santiago, Julieta, Manuel, Jorge y Leo, a quienes llevo conmigo siempre, y de Óscar, Sebastián y Ana. Muchas gracias a mi tía Ma. Elena y su hermosa familia por acompañarme cada día, así como a nuestra muy apreciada Elia.*

*Dedico esta tesis a la memoria de nuestra querida tía Toni.*

*Muchas gracias a mis queridos amigos, Daniel Sierra, Juan Rosas, Lucía Osorno, Maricarmen Zamora y Nando Trujillo, quienes sé que están presentes a pesar del tiempo y la distancia y a quienes no me canso de admirar por su tenacidad, profesionalismo y rectitud.*

*Gracias a la vida por permitirme vivir a plenitud esta etapa de mi vida al lado de las personas correctas y en el lugar indicado.*

# TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
1. Disfunción endotelial y aterosclerosis.....	19
2. Transición endotelio-mesénquima (EndMT).....	20
2.1 EndMT como mecanismo de disfunción endotelial asociado con inflamación.....	22
2.2 EndMT inducida por TGF $\beta$ como prototipo de EndMT.....	24
3. Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ).....	29
3.1 Antecedentes históricos y generalidades.....	29
3.2 Estructura y vías de señalización asociadas.....	30
3.2.1 Factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).....	30
3.2.1.1 Vía canónica de NF- $\kappa$ B.....	31
3.2.1.2 Vía no canónica de NF- $\kappa$ B.....	35
3.2.2 Vías atípicas de TNF $\alpha$ .....	37
3.3 TNF $\alpha$ como estímulo inflamatorio inductor de EndMT.....	37
4. Proteína fosfatasa de tirosina-1B (PTP1B).....	39
4.1 Antecedentes históricos y generalidades.....	39
4.2 Estructura, regulación y vías de señalización asociadas.....	40
4.3 Papel de PTP1B en la disfunción endotelial.....	44

<b>JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>47</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
1. TNF $\alpha$ promueve EndMT e incrementa la expresión de PTP1B en HAECs.....	60
2. Efecto de TNF $\alpha$ en la activación de NF- $\kappa$ B, Akt, MAPKs (Erk1/2 y p38) en HAECs.....	62
3. La inhibición de IKK $\beta$ interfiere con la activación NF- $\kappa$ B/Akt/Erk1/2 y la expresión de PTP1B inducidas por TNF $\alpha$ en HAECs.....	66
4. La inhibición de IKK $\beta$ reduce la EndMT inducida por TNF.....	69
5. El silenciamiento de PTP1B disminuye la EndMT inducida por TNF.....	72
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>77</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>99</b>
<b>I. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....</b>	<b>99</b>
<b>II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>103</b>

## RESUMEN

La transición endotelio-mesénquima (EndMT) es un proceso biológico en el que las células endoteliales (CEs) se transdiferencian a células mesenquimales y se asocia con diversas condiciones patológicas, como la aterosclerosis. La EndMT puede inducirse por diversas citocinas proinflamatorias, entre las que se incluye el factor de necrosis tumoral-alfa ( $\text{TNF}\alpha$ , del inglés *tumor necrosis factor-alpha*), a través de la vía del factor de transcripción nuclear- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ , del inglés *nuclear factor  $\kappa\text{B}$* ) y de otras vías atípicas de señalización, como Akt y MAPKs (Erk1/2 y p38). La proteína fosfatasa de tirosina-1B (PTP1B, del inglés *protein tyrosine phosphatase-1B*) regula diversas vías de señalización asociadas con inflamación y se ha asociado con disfunción endotelial. Sin embargo, la participación de PTP1B en la EndMT inducida por inflamación no se ha definido con precisión. En el presente trabajo, caracterizamos la participación de PTP1B en la EndMT inducida por inflamación. Para nuestros experimentos, empleamos una línea celular inmortalizada endotelial humana de aorta (HAECs, del inglés *human aortic endothelial cells*). Evaluamos los cambios en la expresión de marcadores de EndMT y de PTP1B, así como la activación de NF- $\kappa\text{B}$  y vías atípicas de señalización por Western blot e inmunofluorescencia. Caracterizamos la migración celular en ensayos de cierre de herida. Las HAECs se sometieron a EndMT después del estímulo inflamatorio con  $\text{TNF}\alpha$ , determinada por el cambio en la expresión de marcadores de EndMT, cambios morfológicos compatibles con el fenotipo mesenquimal y un incremento en la migración celular. De manera concomitante a la EndMT, PTP1B aumentó sus niveles de expresión.  $\text{TNF}\alpha$  indujo la activación de NF- $\kappa\text{B}$  y otras vías atípicas de manera temprana durante la EndMT. La EndMT y la expresión de PTP1B inducidas por  $\text{TNF}\alpha$  disminuyeron en

presencia de BMS-345541, un inhibidor de NF- $\kappa$ B. El silenciamiento de PTP1B redujo a su vez la EndMT inducida por TNF $\alpha$ , con escaso efecto sobre la activación de sus vías atípicas. En conclusión, PTP1B participa en la EndMT inducida por inflamación a través de la activación de NF- $\kappa$ B. Nuestros hallazgos contribuyen a la caracterización de PTP1B en la disfunción endotelial. La participación de PTP1B en la EndMT inducida por inflamación refuerza su planteamiento como un posible blanco terapéutico para la aterosclerosis y otras condiciones patológicas en donde está implicada la EndMT.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AEBSF	Clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)benzenosulfonilo (del inglés <i>4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride</i> )
ALK	Cinasa similar a receptores de activina (del inglés <i>activin receptor-like kinase</i> )
ARF6	GTPasa factor de ribosilación de ADP-6 (del inglés <i>ADP ribosylation factor-6</i> )
BAFF-R	Receptor del factor activador de células B (del inglés <i>B cell activating factor receptor</i> )
BCA	Ácido bicinconínico (del inglés <i>bicinchoninic acid</i> )
bHLH	Hélice-bucle-hélice básica (del inglés <i>basic helix-loop-helix</i> ),
BMP	Proteína morfogenética ósea (del inglés <i>bone morphogenetic protein</i> )
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>bovine serum albumin</i> )
c-IAP1/2	Inhibidores celulares de apoptosis-1 y 2 (del inglés <i>cellular inhibitors of apoptosis-1/2</i> )
CAV-1	Caveolina-1
CBA	Proteína de unión a CREB (del inglés <i>CREB-binding protein</i> )
CEs	Células endoteliales
CRD	Dominios homólogos ricos en cisteína (del inglés <i>homologous cysteine-rich domains</i> )

c-Src	Proto-oncogen proteína-tirosina cinasa (del inglés <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
DUSPs	Proteínas fosfatasas de especificidad dual (del inglés <i>dual-specificity phosphatases</i> )
DUB	Deubiquitinasa
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>epidermic growth factor</i> )
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EMT	Transición epitelio-mesénquima (del inglés <i>epithelial to mesenchymal transition</i> )
EndMT	Transición endotelio-mesénquima (del inglés <i>endothelial to mesenchymal transition</i> )
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (del inglés <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
ES	Esclerosis sistémica
ER	Retículo endoplásmico (del inglés <i>endoplasmic reticulum</i> )
Erk1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares-1 y 2 (del inglés <i>extracellular signal-regulated kinases-1/2</i> )
ET-1	Endotelina-1 (del inglés <i>endothelin-1</i> )
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos-2 (del inglés <i>fibroblasts growth factor-2</i> )
Fn14	Factor inducible por el FGF-14 (del inglés <i>FGF-inducible 14</i> )

GAPs	Proteínas activadoras de GTPasas (del inglés <i>GTPase-activating proteins</i> )
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (del inglés <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> )
GRB2	Proteína-2 unida al receptor del factor de crecimiento (del inglés <i>growth factor receptor-bound protein-2</i> )
GSK3 $\beta$	Glucógeno sintasa cinasa-3 beta (del inglés <i>glycogen synthase kinase-3 beta</i> )
HAECs	Células endoteliales aórticas humanas (del inglés <i>human aortic endothelial cells</i> )
HGMA2	Proteína-A2 del grupo de alta movilidad (del inglés <i>high mobility group protein-A2</i> )
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1 (del inglés <i>intercellular adhesion molecule-1</i> )
ID	Inhibidor de la unión al DNA (del inglés <i>inhibitor of DNA-binding</i> )
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (del inglés <i>insulin growth factor-1</i> )
IKK	Complejo de cinasas I $\kappa$ B (del inglés <i>I<math>\kappa</math>B kinase complex</i> )
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IR	Receptor de insulina (del inglés <i>insulin receptor</i> )

IRS-1	Sustrato del receptor de insulina-1 (del inglés <i>insulin receptor substrate-1</i> )
I $\kappa$ B	Inhibidor del factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (del inglés <i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B inhibitor</i> )
JAK2	Janus cinasa-2 (del inglés <i>Janus kinase-2</i> )
JNK	Cinasa N-terminal c-Jun (del inglés <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
MAP2Ks/MAPKKs	MAPK cinasas (del inglés <i>MAPK kinases</i> )
MAP3Ks/MAPKKKs	MAPKK cinasas (del inglés <i>MAPKK kinases</i> )
MAPKs	Cinasas activadas por mitógenos (del inglés <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
MSK1/2	Cinasas activadas por mitógenos y estrés-1 y 2 (del inglés <i>mitogen- and stress-activated protein kinase-1/2</i> )
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero (del inglés <i>mammalian target of rapamycin</i> )
NEMO	Modulador esencial de NF- $\kappa$ B (del inglés <i>NF-<math>\kappa</math>B essential modulator</i> ).
NF- $\kappa$ B	Factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (del inglés <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> )
NIK	Cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (del inglés <i>NF-<math>\kappa</math>B inducing kinase</i> )
NLRP12	Proteína-12 que contiene dominios NACHT, LRR y PYD (del inglés <i>NACHT, LRR and PYD domain-containing protein-12</i> )
NO	Óxido nítrico (del inglés <i>nitric oxide</i> )
LEG	Lupus eritematoso generalizado
LT $\beta$ R	Receptor de linfotóxina-beta (del inglés <i>lymphotoxin-beta receptor</i> )

LUBAC	Complejo de ensamblaje de cadenas lineales de ubiquitina (del inglés <i>linear ubiquitin chain assembly complex</i> )
OTULIN	Deubiquitinasa OTU con especificidad lineal (del inglés <i>OTU deubiquitinase with linear specificity</i> )
P62DOK/Dok1	Proteína de acoplamiento-1 (del inglés <i>docking protein-1, 62kDa</i> )
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos (del inglés <i>phosphate-buffered saline</i> )
PDK1	Proteína cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido (del inglés <i>3-phosphoinositide-dependent kinase-1</i> )
PECAM-1	Molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas-1 (del inglés <i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i> )
PERK	Cinasa del RE parecida a la proteína cinasa de RNA (del inglés <i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i> )
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa (del inglés <i>phosphoinositide 3-kinase</i> )
PKA	Proteína cinasa-A (del inglés <i>protein kinase-A</i> )
PKC	Proteína cinasa-C (del inglés <i>protein kinase-C</i> )
PTP1B	Proteína fosfatasa de tirosina-1B (del inglés <i>protein tyrosine phosphatase-1B</i> )
PTPs	Proteínas con actividad de fosfatasas de tirosina (del inglés <i>protein tyrosine phosphatases</i> )
PTPD1	Proteína fosfatasa de tirosina-D1 (del inglés <i>protein tyrosine phosphatase-D1</i> )

PTPL1	Proteína fosfatasa de tirosina-L1 (del inglés <i>protein tyrosine phosphatase-L1</i> )
RANK	Receptor activador de NF- $\kappa$ B (del inglés <i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B</i> )
RIP1	Proteína-1 que interactúa con el receptor (del inglés <i>receptor interacting protein-1</i> )
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación (del inglés <i>radioimmunoprecipitation assay</i> )
SIP1	Proteína que interactúa con Smad-1 (del inglés <i>Smad-interacting protein 1</i> )
siRNA	RNA pequeño de interferencia (del inglés <i>small interfering RNA</i> )
SOCS1	Supresor de señales de citocinas-1 (del inglés <i>suppressor of cytokine signaling-1</i> )
SOS	Hijo de Sevenless (del inglés <i>son of Sevenless</i> )
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción-3 (del inglés <i>signal transducer and activator of transcription-3</i> )
STAT6	Transductor de señal y activador de la transcripción-6 (del inglés <i>signal transducer and activator of transcription-6</i> )
TAK1	Cinasa-1 activada por TGF $\beta$ (del inglés <i>TGF<math>\beta</math> activated kinase-1</i> )
TACE	Enzima convertidora de TNF $\alpha$ (del inglés <i>TNF<math>\alpha</math> converting enzyme</i> )
TBK1	Cinasa-1 de unión a TANK relacionada con IKK (del inglés <i>TANK-binding kinase-1</i> )
TC-PTP	Proteína fosfatasa de tirosina de células T (del inglés <i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i> )

TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante-beta (del inglés <i>transforming growth factor-beta</i> )
TGF $\beta$ R	Receptor de TGF $\beta$ (del inglés <i>TGF<math>\beta</math> receptor</i> )
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral-alfa (del inglés <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
TNFR	Receptor de TNF $\alpha$ (del inglés <i>TNF<math>\alpha</math> receptor</i> )
TRADD	Dominio de muerte asociado con el receptor de TNF $\alpha$ (del inglés <i>TNF<math>\alpha</math> receptor associated death domain</i> )
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF $\alpha$ (del inglés <i>TNF<math>\alpha</math> receptor-associated factor</i> )
TWEAK-R	Receptor del inductor débil de apoptosis similar al TNF $\alpha$ (del inglés <i>TNF<math>\alpha</math>-related weak inducer of apoptosis receptor</i> )
TYK2	Tirosina cinasa-2 (del inglés <i>tyrosine kinase-2</i> )
VE-cadherina	Cadherina vascular endotelial (del inglés <i>vascular endothelial-cadherin</i> )
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial (del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VH1	H1 del virus vaccinia (del inglés <i>vaccinia virus H1</i> )
Wnt	Del inglés <i>Wingless</i>
ZEB	Homeobox de unión a la E-box con dedos de zinc (del inglés <i>zinc finger E-box binding homeobox</i> )

# MARCO TEÓRICO

## 1. Disfunción endotelial y aterosclerosis.

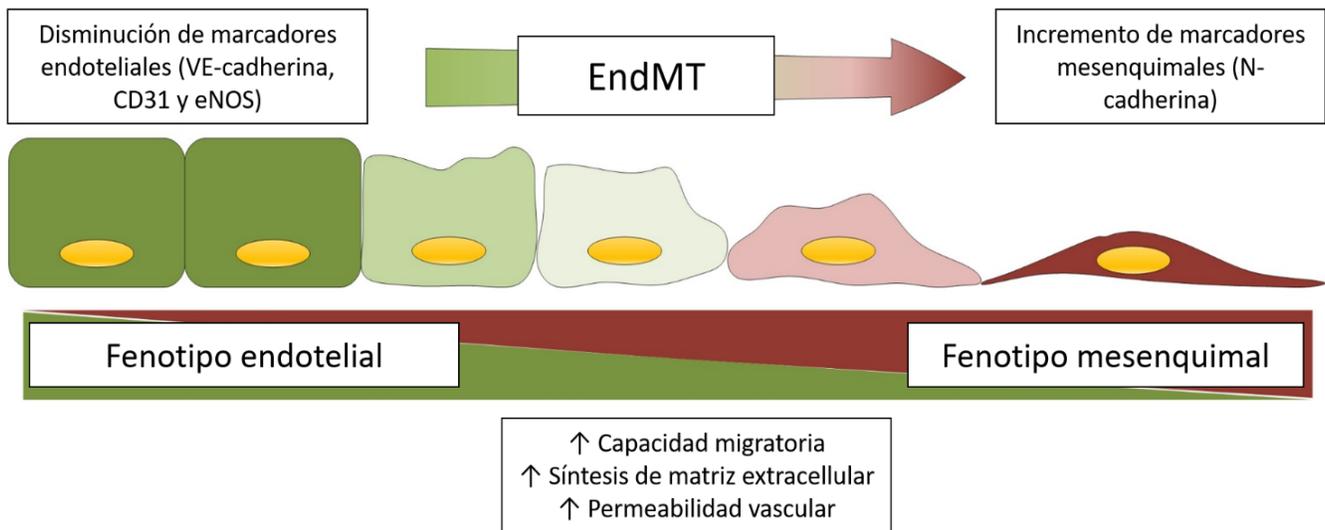
El endotelio vascular representa un recubrimiento celular continuo del sistema cardiovascular. Inicialmente, el endotelio vascular fue caracterizado como una interfaz selectiva y semipermeable que separa los compartimientos vascular e intersticial y regula el transporte de fluidos y macromoléculas. En las últimas décadas se le han atribuido diferentes funciones adicionales, las cuales incluyen funciones metabólicas, propiedades anticoagulantes y fibrinolíticas, así como acciones antiinflamatorias ante agentes nocivos. Al tomar en cuenta dichas funciones de manera global, entendemos a la disfunción endotelial como aquel estado caracterizado por alteraciones en las propiedades vasodilatadoras, antitrombóticas y antiinflamatorias del endotelio vascular. La disfunción endotelial representa el estadio más temprano en la historia natural de la aterosclerosis como resultado de la inflamación crónica y el estrés oxidativo (1).

La aterosclerosis es una enfermedad vascular crónica, que representa la causa subyacente de las enfermedades cardiovasculares y se caracteriza por la inflamación crónica de la pared del vaso sanguíneo, así como la formación de placa de ateroma (2-4). Se han identificado diversos factores que favorecen la disfunción endotelial, que incluyen hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, el desbalance de hormonas sexuales, el estrés oxidativo, citocinas proinflamatorias, agentes infecciosos, toxinas ambientales y fuerzas hemodinámicas (1). Estos factores resultan deletéreos para la síntesis de óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) y promueven la inflamación y la consecuente activación persistente del endotelio, la cual depende primordialmente del factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, del inglés *nuclear factor  $\kappa$ B*) (5). NF- $\kappa$ B induce la transcripción de diversas quimiocinas, moléculas de adhesión y factores protrombóticos, los

cuales favorecen a su vez el reclutamiento de células inflamatorias hacia el espacio subendotelial. Estos eventos favorecen un estado inflamatorio crónico y derivan en la formación de la placa de ateroma al promover, entre otros mecanismos, la transición endotelio-mesénquima (EndMT, del inglés *endothelial-mesenchymal transition*) (1-4, 6, 7).

## **2. Transición endotelio-mesénquima (EndMT).**

La EndMT es un proceso biológico caracterizado por una transdiferenciación celular en el cual las células endoteliales (CEs) pierden sus características de endotelio y adquieren características parecidas a miofibroblastos (8, 9). Específicamente, existe una expresión a la baja de marcadores específicos de endotelio, como la cadherina vascular endotelial (VE-cadherina, del inglés *vascular endothelial-cadherin*), la molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas-1 (PECAM-1, del inglés *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) o CD31 y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, del inglés *endothelial nitric oxide synthase*), así como un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales, como la N-cadherina (9-11). Durante la EndMT, las CEs cambian su morfología normal de “patrón de calle empedrada” por una morfología fusiforme. Además, adquieren otras características similares a miofibroblastos, como su elevada capacidad migratoria y de síntesis de matriz extracelular. También se incrementa la permeabilidad vascular, como resultado de la pérdida de las uniones adherentes intercelulares, cuyos componentes centrales son la VE-cadherina y CD31 (9, 11-13). **(Figura 1).**



**Fig. 1 Transición endotelio-mesénquima (EndMT).** Las células endoteliales (CEs) experimentan EndMT mediante la disminución en la expresión de marcadores endoteliales, como VE-cadherina, CD31 y eNOS, así como el incremento en la expresión de marcadores mesenquimales, como N-cadherina. Durante este proceso, existe un cambio en la morfología típica de CEs de “patrón de calle empedrada” por una morfología fusiforme, así como un incremento en la capacidad migratoria, la síntesis de matriz extracelular y la permeabilidad vascular, relacionada con la pérdida de las uniones adherentes intercelulares. CEs = células endoteliales; EndMT = transición endotelio-mesénquima (del inglés *endothelial to mesenchymal transition*); eNOS = óxido nítrico sintasa endotelial (del inglés *endothelial nitric oxide synthase*); VE-cadherina = cadherina vascular endotelial (del inglés *vascular endothelial-cadherin*). Adaptado de Pérez et al, 2017.

La EndMT fue inicialmente descrita como un proceso fundamental en el desarrollo embriogénico de las válvulas cardíacas. Durante este proceso, las CEs derivadas del endocardio se someten a EndMT, la cual está favorecida por el microambiente local provisto por el miocardio y su matriz extracelular (14). Al poco tiempo, se relacionó a la EndMT con el desarrollo embriogénico de la aorta, la arteria pulmonar y otros tejidos vasculares, por la acción conjunta de diversos mediadores inflamatorios y vías de señalización, que se discutirán más adelante (9, 15-17). La EndMT también participa en otros procesos fisiológicos, como la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la regeneración tisular (18-20); representa una opción atractiva en ingeniería tisular dado el potencial de las CEs de diferenciarse en múltiples tipos de células a partir del fenotipo mesenquimal (18).

## **2.1 EndMT como mecanismo de disfunción endotelial asociado con inflamación.**

Aunque la EndMT es parte fundamental en procesos fisiológicos, en un contexto inadecuado también puede estar implicada en la fisiopatogenia de diversas enfermedades. Se ha propuesto a la EndMT como el enlace entre la inflamación y la disfunción endotelial (8, 21) y juega un papel crucial en la aterosclerosis (4, 18, 22) y otras condiciones patológicas relacionadas con fibrosis, vasculopatía e inflamación (9, 18). Dichas condiciones incluyen el cáncer (13, 23), la hipertensión arterial pulmonar (22, 24), enfermedades profibróticas, como la esclerosis sistémica (ES) (25, 26), la fibrosis cardíaca (22, 27-29) y la nefropatía diabética (30, 31), así como enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso generalizado (LEG) (32), las vasculitis sistémicas primarias (33, 34), la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (35, 36) y la esclerosis múltiple (37-39).

La EndMT es resultado del estímulo constante del endotelio vascular con diversas citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento. Estos mediadores favorecen la expresión

génica de factores de transcripción inductores de EndMT, los cuales tienen la función de reprimir la expresión de genes endoteliales y promover la expresión de genes mesenquimales (10, 29). Entre los principales factores de transcripción inductores de EndMT se encuentran Snail (*SNAI1*), Slug (*SNAI2*), homeobox-1 de unión a la E-box con dedos de zinc (ZEB1, del inglés *zinc finger E-box binding homeobox-1*), ZEB2/proteína que interactúa con Smad-1 (SIP1, del inglés *Smad-interacting protein 1*) y TWIST1 (29). Snail y Slug comprenden la familia de los factores de transcripción Snail (18). Presentan de cuatro a seis dedos de zinc en su extremo carboxilo-terminal, que reconocen una región específica del DNA en la región promotora de genes, la cual contiene un núcleo de seis bases nitrogenadas, denominado caja E (40, 41). ZEB1 y 2 comprenden la familia ZEB, que se distinguen por presentar dos grupos de dedos de zinc en sus extremos amino y carboxilo-terminal, respectivamente, para reconocer a la caja E, y se encuentran separados por un homeodominio que interactúa con otras proteínas que promueven su activación (40). TWIST1 pertenece a la familia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice básica (bHLH, del inglés *basic helix-loop-helix*), que contienen en su estructura un dominio conformado por una secuencia de aminoácidos básicos adyacente a dos hélices alfa unidas por un bucle inter-hélice. Las hélices permiten la unión con otro factor bHLH y formar dímeros que se unen a la caja E (42).

La EndMT se encuentra estrechamente regulada. Por ejemplo, la acción de Snail y probablemente de otros factores de transcripción inductores de EndMT, es regulada por proteínas inhibitoras de la unión al DNA (ID, del inglés *inhibitor of DNA-binding*) (43). Snail también se regula a través de la glucógeno sintasa cinasa-3 beta ( $GSK3\beta$ , del inglés *glycogen synthase kinase-3 beta*) que, al activarse por desfosforilación, fosforila a Snail para promover su ubiquitinación y degradación por la vía del proteosoma (44).

Entre los mediadores inflamatorios relacionados con EndMT, el factor de crecimiento transformante-beta ( $TGF\beta$ , del inglés *transforming growth factor-beta*) representa el inductor de EndMT mejor caracterizado (10, 45-47).

## **2.2 EndMT inducida por $TGF\beta$ como prototipo de EndMT.**

$TGF\beta$  constituye una familia de 33 moléculas en mamíferos, que incluyen  $TGF\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ , activinas, inhibinas y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs, del inglés *bone morphogenetic proteins*) (40, 48). Dichos elementos señalizan a través de dos receptores transmembranales. La unión del receptor tipo II ( $TGF\beta RII$ , del inglés *TGF $\beta$  receptor II*) o cinasa similar a receptores de activina (ALK, del inglés *activin receptor-like kinase*)-2 con actividad de serina-treonina cinasa constitutiva con su respectivo ligando, favorece la fosforilación de los receptores tipo I ( $TGF\beta RI$ , del inglés *TGF $\beta$  receptor I*) o ALK-5, que activan la vía canónica de  $TGF\beta$ , representada por las moléculas Smad reguladas por receptores (R-Smads) (29, 40). Las R-Smads activadas dependen a su vez de los ligandos involucrados. Por ejemplo, los  $TGF\beta$ s y las activinas promueven específicamente la fosforilación de las Smad2 y 3 (40). Tras ser activadas, las R-Smads forman complejos oligoméricos con el mediador común Smad4, los cuales se translocan al núcleo e interactúan con diversos factores de transcripción para regular la expresión de genes blanco (40, 48). La acción de las R-Smads puede ser antagonizada por las Smad6 y 7, las cuales impiden el reclutamiento de las Smad2 y 3 al  $TGF\beta RI$  y con ello, la formación del complejo con Smad4 (29). De manera no canónica,  $TGF\beta$  puede activar otras vías de señalización independientes a las R-Smads en contextos específicos, tales como las vías de fosfoinositol 3-cinasa (PI3K, del inglés *phosphoinositide 3-kinase*)/Akt/diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, del inglés *mammalian target*

of rapamycin), la ligasa de ubiquitina factor 6 asociado al receptor de  $TNF\alpha$  [TRAF6, del inglés *tumor necrosis factor-alpha receptor (TNFR)-associated factor 6*] y las vías de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, del inglés *mitogen-activated protein kinases*), entre las que se incluyen p38, las cinasas reguladas por señales extracelulares-1 y 2 (Erk1/2, del inglés *extracellular signal-regulated kinases-1/2*) y la cinasa N-terminal c-Jun (JNK, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*) (18, 40).

Las tres isoformas de  $TGF\beta$ , principalmente  $TGF\beta_2$ , pueden inducir EndMT a través de la vía canónica de  $TGF\beta$  (18, 49). La activación de la vía promueve la expresión de los factores de transcripción relacionados con EndMT de manera secuencial. Las R-Smads activadas interactúan directamente con la región promotora de Snail (50). Esta interacción favorece indirectamente la expresión de otros factores de transcripción, como ZEB1 (51) y el factor-A2 del grupo de alta movilidad (HGMA2, del inglés *high mobility group protein-A2*). HGMA2 promueve cambios conformacionales en el DNA que regulan la expresión de Snail, Slug (*SNAI2*) y TWIST1 (29, 52, 53).

Si bien Snail y Slug constituyen los inductores de EndMT relacionados con  $TGF\beta$  mejor caracterizados, el papel que desempeña Snail en la EndMT resulta esencial. Se ha sugerido una mayor afinidad de Snail por la unión al DNA en comparación con Slug y otros factores, como ZEB1 (51, 54). En un trabajo reciente, la depleción de Snail abrogó completamente la EndMT inducida por  $TGF\beta$  en CEs humanas (43). Sin embargo, la sobreexpresión de Snail no es suficiente para inducir EndMT (50). Esto indica que la activación de otros factores de transcripción inductores de EndMT y su cooperación con Snail parece necesaria para iniciar y mantener la EndMT. Al fungir Snail como el principal iniciador de la EndMT, su depleción pudo haberse acompañado de la depleción de otros factores de transcripción inductores de EndMT,

tal y como ocurre en el fenómeno de la transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*) (53), lo cual resulta en la completa inhibición de la EndMT. La inhibición de TWIST1 también redujo la EndMT inducida por TGF $\beta$ , resaltando la participación de otros factores de transcripción durante la EndMT además de Snail (55).

Algunas vías no canónicas de TGF $\beta$  también se han implicado con la EndMT. Por ejemplo, Medici y cols reportaron que TGF $\beta$ 2 puede inducir EndMT en CEs de microvasculatura de piel a través de las vías de PI3K/Akt y MAPKs (p38 y Erk1/2), ya que la presencia de inhibidores específicos de estos elementos revirtió la polarización hacia el fenotipo mesenquimal en CEs tratadas con TGF $\beta$ 2 (50). La vía de Akt/mTOR desempeña un papel importante en la EndMT inducida tanto por TGF $\beta$  como por bleomicina, un glucopéptido capaz de activar la vía de TGF $\beta$ , estímulos que promueven la fosforilación de Akt y de mTOR, p70S6K y S6, ubicadas río abajo en la vía de señalización. Además, la inhibición de mTOR ha demostrado disminuir la EndMT inducida por bleomicina en diferentes modelos, tanto *in vitro* como *in vivo* (56-58). La tirosina cinasa c-Abl y la proteína cinasa C-delta (PKC $\delta$ , del inglés *protein kinase C-delta*) participan en la EndMT inducida por TGF $\beta$ , ya que sus respectivos inhibidores específicos también disminuyeron la EndMT inducida por TGF $\beta$  en CEs de origen murino, al prevenir la fosforilación de GSK3 $\beta$  y favorecer con ello la degradación de Snail (59).

Otros mediadores inflamatorios y sus vías de señalización pueden favorecer la EndMT inducida por TGF $\beta$ , como se describió recientemente para el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ , del inglés *tumor necrosis factor-alpha*) (48). El co-tratamiento de CEs con TNF $\alpha$  y TGF $\beta$  incrementó su polarización hacia el fenotipo mesenquimal, en comparación con las CEs tratadas sólo con TGF $\beta$ . Este fenómeno se asoció a un incremento en la activación de la vía

canónica de TGF $\beta$  posiblemente mediante un mecanismo autocrino, al aumentar la expresión de los ligandos TGF $\beta$ 2 y activina-A, el receptor ALK-5, y la integrina  $\alpha$ v, implicada en la activación de TGF $\beta$ 1 y 3 latentes (48). También se documentó la implicación de NF- $\kappa$ B en dicho modelo, ya que su silenciamiento disminuyó la EndMT y la activación de la vía canónica de TGF $\beta$  en las CEs estimuladas con TNF $\alpha$  y TGF $\beta$  (48). En otro reporte reciente en donde se estudió la EndMT como parte de la disfunción de la barrera hematoencefálica en esclerosis múltiple, el co-tratamiento de CEs cerebrales humanas con interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y TGF $\beta$  promovió EndMT a través de la cinasa-1 activada por TGF $\beta$  (TAK1, del inglés *TGF $\beta$  activated kinase-1*), que a su vez favoreció la activación de NF- $\kappa$ B (38). Además, el tratamiento de CEs con IL-1 $\beta$  por sí sólo fue capaz de inducir EndMT a través de la transactivación de la vía ALKs-Smads1 y 5 mediada por la GTPasa factor de ribosilación de ADP-6 (ARF6, del inglés *ADP ribosylation factor-6*) (39).

El vasoconstrictor endotelina-1 (ET-1, del inglés *endothelin-1*) también fue capaz de potenciar la EndMT inducida por TGF $\beta$  en CEs de microvasculatura pulmonar de origen murino y CEs de microvasculatura de piel de pacientes con ES, al favorecer la expresión de todas las isoformas y receptores de TGF $\beta$  y el incremento en la fosforilación de las Smad2 y 3 (60, 61). Esto se corroboró en un modelo *in vivo* de ES, en donde el tratamiento con ET-1 exacerbó la fibrosis pulmonar y cutánea inducida por TGF $\beta$  (60). Además, TGF $\beta$ 1 también incrementó los niveles de ET-1 en CEs de microvasculatura pulmonar y la presencia de bosentán, un inhibidor de ET-1, previno su polarización hacia el fenotipo mesenquimal (62). La vía de Notch resulta esencial en el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, como lo demuestra el hecho de que los elementos de su vía de señalización, Notch1 y Jagged1 (Jag1), se incrementaron en las CEs de microvasculatura pulmonar provenientes de dicho modelo, a la

par de los marcadores mesenquimales (63). La vía de Notch constituye un blanco del receptor de la quimiocina CXCR7, la cual atenuó la EndMT en un modelo de fibrosis pulmonar inducida por TGF $\beta$  (64). De manera reciente, se demostró que la EndMT inducida por TGF $\beta$ 1 en CEs diferenciadas de células madre de origen tumoral, es dependiente tanto de la vía canónica de TGF $\beta$  como de la vía de Notch (23). Finalmente, las proteínas Wnt (del inglés, *Wingless*) inducen EndMT mediante un complejo entrecruzamiento con la vía de TGF $\beta$  que promueve la activación del marcador profibrótico beta-catenina (65-67) y favorece la fibrosis cardiaca (68), renal (69) y cutánea (70, 71). Por el contrario, la caveolina-1 (CAV-1) es una proteína integral de la membrana plasmática presente en las estructuras denominadas caveolas, que representa un elemento clave en la degradación de TGF $\beta$  por la vía del endosoma. El modelo deficiente de CAV-1 demostró un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales en CEs de microvasculatura pulmonar, tanto basal como tras el tratamiento de TGF $\beta$ , que se redujo al restaurar los dominios funcionales de CAV-1. Por lo tanto, CAV-1 actúa como represor de la EndMT inducida por TGF $\beta$  (72). Otros mediadores inflamatorios se han postulado como inhibidores de la EndMT inducida por TGF $\beta$ , tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF2, del inglés *fibroblasts growth factor-2*) (73, 74).

La EndMT inducida por TGF $\beta$  es entonces resultado de la activación de su vía canónica y de un complejo entrecruzamiento con diversas vías no canónicas y las vías de señalización de otros mediadores inflamatorios. Esto culmina en el aumento en la expresión de factores de transcripción inductores de EndMT y la polarización de CEs hacia el fenotipo mesenquimal. Por otro lado, TNF $\alpha$  y otras citocinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$  e interleucina-6 (IL-6),

también pueden inducir EndMT en CEs de manera independiente a la vía canónica de TGF $\beta$  (11, 75).

### **3. Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ).**

#### **3.1 Antecedentes históricos y generalidades.**

El TNF $\alpha$  se describió en 1975 por Lloyd J. Old tras identificar en suero al factor responsable de la actividad citotóxica y necrotizante de diversos agentes bacterianos sobre tumores, observación que fuera motivo de inquietud desde un siglo atrás. Se clonó el TNF $\alpha$  murino y humano, los cuales contaban con 80% de homología; se atribuyó su producción principalmente a macrófagos y se encontraron muchos tipos de células sensibles a su efecto citotóxico, con la posibilidad de generar resistencia tras la exposición prolongada (76). Actualmente se sabe que TNF $\alpha$  se produce en muchos tipos de células inmunes, además de CEs, fibroblastos, células de músculo liso, adipocitos, células tumorales, entre otras, y que ejerce su efecto prácticamente en todas las células nucleadas (77, 78).

TNF $\alpha$  constituye un importante regulador de la respuesta inmune, a través de un efecto doble (78, 79). Por un lado, es un importante mediador proinflamatorio, capaz de iniciar una intensa respuesta inflamatoria; al mismo tiempo, posee un efecto inmunosupresor y mantiene la homeostasis del sistema inmune al limitar la extensión de la inflamación. Además, participa en la defensa del hospedero contra diversos patógenos, principalmente contra bacterias intracelulares, como *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, los niveles altos de TNF $\alpha$  pueden conducir a choque séptico (77, 78). Por último, TNF $\alpha$  también promueve la muerte celular (79, 80). Se ha establecido el papel de TNF $\alpha$  en la fisiopatología de enfermedades alérgicas, como asma y dermatitis atópica; enfermedades autoinmunes,

como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, psoriasis y EII; cáncer y aterosclerosis, como se mencionará más adelante (77-79).

### **3.2 Estructura y vías de señalización asociadas.**

TNF $\alpha$  es una proteína transmembranal tipo II, es decir, atraviesa la membrana plasmática una única vez, con su extremo carboxilo-terminal en el medio extracelular y su extremo amino-terminal en la región intracitoplásmica (81). Se expresa en la membrana plasmática como un trímero, que puede escindirse por la enzima convertidora de TNF $\alpha$  (TACE, del inglés *TNF $\alpha$  converting enzyme*) y originar un ligando soluble (79).

Existen dos tipos de receptores de TNF $\alpha$ , el receptor de TNF $\alpha$  tipo I (TNFR1, del inglés *TNF $\alpha$  receptor I*) o CD120a y el receptor de TNF $\alpha$  tipo II (TNFR2, del inglés *TNF $\alpha$  receptor II*) o CD120b (79). TNFR1 se encuentra ampliamente expresado y reconoce al TNF $\alpha$  soluble y unido a membrana. TNFR2 se expresa en células inmunes y CEs y posee mayor afinidad por el TNF $\alpha$  unido a membrana (79). Ambos receptores poseen cuatro dominios homólogos ricos en cisteína (CRDs, del inglés *homologous cysteine-rich domains*) en su porción extracelular. Sin embargo, su estructura difiere en su porción intracitoplásmica. Mientras que TNFR1 posee dominios de muerte, TNFR2 presenta un sitio de unión a las proteínas adaptadoras TRAF (79). Ambos receptores señalizan a través de NF- $\kappa$ B y de otras vías atípicas de TNF $\alpha$ .

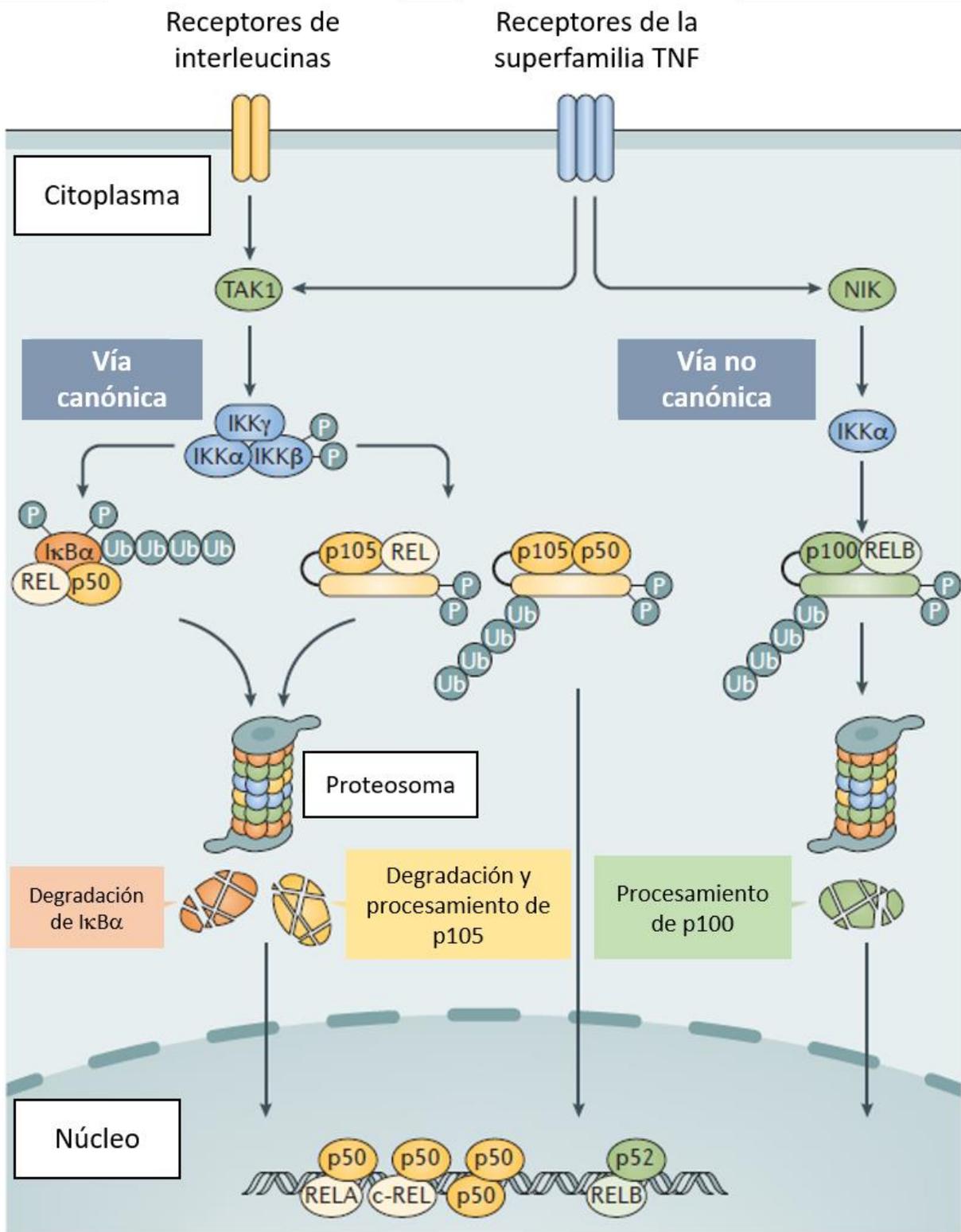
#### **3.2.1 Factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).**

Los miembros de la familia de NF- $\kappa$ B incluyen a los dímeros de NF- $\kappa$ B, los inhibidores de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B, del inglés *NF- $\kappa$ B inhibitor*) y los complejos de cinasas I $\kappa$ B (IKK, del inglés *I $\kappa$ B kinase complex*). En mamíferos, la familia de monómeros de NF- $\kappa$ B incluye a cinco subunidades:

RelA/p65, RelB, c-Rel y los precursores de NF- $\kappa$ B1 p50 y NF- $\kappa$ B2 p52 (p105 y p100) (82). Estos precursores contienen una región homóloga a I $\kappa$ B en su extremo carboxilo-terminal, por lo que también funcionan como inhibidores de NF- $\kappa$ B parecidos a I $\kappa$ B. La degradación de la región homóloga a I $\kappa$ B carboxilo-terminal por la vía del proteosoma en p105 y p100, origina las formas maduras NF- $\kappa$ B1 p50 y NF- $\kappa$ B2 p52 e interrumpe su función inhibitoria (83). Las subunidades de NF- $\kappa$ B pueden formar homodímeros o heterodímeros en su estado activo, con excepción de RelB, que sólo forma heterodímeros. Tras ser activados, los dímeros de NF- $\kappa$ B se translocan al núcleo, en donde regulan la expresión de genes blanco al unirse a sitios de reconocimiento en sus regiones promotoras (82). Dependiendo de los estímulos y componentes de la vía involucrados, NF- $\kappa$ B puede activarse a través de su vía canónica o de su vía no canónica. (**Figura 2**)

### **3.2.1.1 Vía canónica de NF- $\kappa$ B.**

La activación de la vía canónica de NF- $\kappa$ B es rápida pero transitoria (83). En condiciones basales, los dímeros de NF- $\kappa$ B son inactivados por los complejos de I $\kappa$ B en el citoplasma. Una vez estimulada la vía, se activan los complejos IKK, los cuales se componen por las subunidades IKK $\alpha$ /IKK1, IKK $\beta$ /IKK2 y la proteína de andamio modulador esencial de NF- $\kappa$ B (NEMO, del inglés *NF- $\kappa$ B essential modulator*). En la vía canónica, IKK $\beta$  desempeña un papel predominante. Sin embargo, ante ciertos estímulos específicos, IKK $\alpha$  también puede tener participación (84). Los complejos IKK activados fosforilan directamente a los I $\kappa$ Bs y los I $\kappa$ Bs fosforilados se ubiquitinan para su degradación a través de la vía del proteosoma. Los dímeros de NF- $\kappa$ B son liberados y se translocan al núcleo (82). Esta vía promueve así la activación de las subunidades NF- $\kappa$ B1 p50, RelA/p65 y c-Rel (83).



---

**Fig. 2 Vías canónica y no canónica de NF- $\kappa$ B.** La vía canónica de NF- $\kappa$ B es activada por los receptores de TNF $\alpha$  y otros receptores de interleucinas. Se activan los complejos IKK con la participación de TAK1. Los complejos IKK activados, principalmente IKK $\beta$ , fosforilan directamente a los I $\kappa$ Bs y a la molécula parecida a I $\kappa$ B, p105. Los I $\kappa$ Bs y p105 fosforilados se ubiquitinan para su degradación a través de la vía del proteosoma. Los dímeros de NF- $\kappa$ B son liberados y se translocan al núcleo para regular la expresión de genes blanco. Esta vía promueve la activación de las subunidades NF- $\kappa$ B1 p50, RelA/p65 y c-Rel. La vía no canónica de NF- $\kappa$ B es activada por receptores de la superfamilia de TNF $\alpha$ . Se activa NIK, que fosforila a IKK $\alpha$ . IKK $\alpha$  su vez fosforila directamente a p100 para favorecer su proteólisis a NF- $\kappa$ B2 p52. La vía culmina en la activación de los miembros secuestrados por p100, NF- $\kappa$ B2 p52 y RelB. IKK = complejo de cinasas I $\kappa$ B (del inglés *I $\kappa$ B kinase complex*); I $\kappa$ B = inhibidor del factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (del inglés *nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor*); NF- $\kappa$ B = factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (del inglés *nuclear factor  $\kappa$ B*); NIK = cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (del inglés *NF- $\kappa$ B inducing kinase*); TAK1 = cinasa 1 activada por TGF $\beta$  (del inglés *TGF $\beta$  activated kinase 1*); TNF $\alpha$  = factor de necrosis tumoral-alfa (del inglés *tumor necrosis factor-alpha*). Adaptado de Sun et al, 2017.

---

La vía canónica de NF- $\kappa$ B se activa a través de los receptores de TNF $\alpha$  (82). Tras la unión de TNF $\alpha$  con TNFR1, se reclutan la proteína-1 que interactúa con el receptor (RIP1, del inglés *receptor interacting protein-1*) y el dominio de muerte asociado con el receptor de TNF $\alpha$  (TRADD, del inglés *TNF $\alpha$  receptor associated death domain*), que juntos ensamblan el complejo I (79, 85). TRADD recluta a su vez a TRAF2 y 5, lo que favorece la unión de las ligasas de ubiquitina inhibidores celulares de apoptosis-1 y 2 (c-IAP1 y 2, del inglés *cellular inhibitors of apoptosis-1 and 2*) y la ubiquitinación de varios componentes del complejo I. c-IAP1 y 2 se autoubiquitinan y ubiquitinan a RIP1 en los residuos de lisina K63, K48 y K11 (85-87). Las cadenas de poliubiquitina conjugadas a IAP1 y 2 en K63 permiten el reclutamiento del complejo de ensamblaje de cadenas lineales de ubiquitina (LUBAC, del inglés *linear ubiquitin chain assembly complex*), que genera cadenas de ubiquitina en diversas moléculas, como TNFR1, RIP1, LUBAC y NEMO (79, 80, 88). Esto genera sitios de anclaje para el complejo IKK y la antes mencionada TAK1 (79, 80). NEMO se dimeriza y se une a las IKKs,

lo que promueve la activación de IKKs por trans-autofosforilación. Las IKKs activas fosforilan a las I $\kappa$ Bs, principalmente I $\kappa$ B $\alpha$  en S32/36, favoreciendo la degradación de I $\kappa$ Bs y la liberación de los dímeros de NF- $\kappa$ B (85, 89).

La expresión de genes inducida por NF- $\kappa$ B requiere de mecanismos postraduccionales adicionales a la degradación de I $\kappa$ Bs (85). Por ejemplo, la interacción de p65 con coactivadores transcripcionales, como la proteína de unión a CREB (CBA, del inglés CREB-binding protein) y p300, está mediada por múltiples fosforilaciones en diferentes residuos de serina. La proteína cinasa-A (PKA, del inglés *protein kinase-A*) y las cinasas activadas por mitógenos y estrés-1 y 2 (MSK1 y 2, del inglés *mitogen- and stress-activated protein kinase-1 and 2*) fosforilan a p65 en S276. Las IKKs y la proteína cinasa-C zeta (PKC $\zeta$ , del inglés *protein kinase-C zeta*) fosforilan a p65 en S536 y S311, respectivamente. La unión de p65 con CBA/p300 promueve a su vez la acetilación de p65 en K310 para incrementar su actividad transcripcional (85).

La vía canónica de NF- $\kappa$ B se encuentra estrechamente regulada por diversos mecanismos a diferentes niveles. Como ya se mencionó, la ubiquitinación resulta esencial en la activación de la vía. Las deubiquitininasas (DUB), como A20, inhiben la ubiquitinación en K63 durante la activación de NF- $\kappa$ B, lo que promueve la descomposición del complejo IKK. A20 también favorece la ubiquitinación RIP1 en K48 y su degradación por la vía del proteosoma (79, 80, 85, 89). La deubiquitinasa OTU con especificidad lineal (OTULIN, del inglés *OTU deubiquitinase with linear specificity*) remueve específicamente las cadenas lineales de ubiquitina del complejo LUBAC (79, 80). Además, la unión de NEMO con IKKs favorece la fosforilación de NEMO en S68 y de IKK $\beta$  en S740. Esto provoca la separación de los dímeros

de NEMO y la separación de NEMO e IKKs. A su vez, las IKKs se desfosforilan en sus dominios cinasas por la proteína fosfatasa 2A (PP2A, del inglés *protein phosphatase 2A*) (79, 85). NF- $\kappa$ B promueve la expresión de I $\kappa$ Bs como un importante mecanismo de retroalimentación negativa (85, 89). Adicionalmente, p65 y c-Rel pueden interactuar con el supresor de señales de citocinas-1 (SOCS1, del inglés *suppressor of cytokine signaling-1*) y otras ligasas de ubiquitina, que favorecen su degradación por la vía del proteosoma (85, 89).

NF- $\kappa$ B regula la respuesta inmune innata y la inflamación en múltiples niveles, así como diferentes funciones de la respuesta inmune adaptativa. Su papel en la fisiopatogenia de las enfermedades autoinmunes, cáncer y aterosclerosis se encuentra bien establecido (79, 89).

### **3.2.1.2 Vía no canónica de NF- $\kappa$ B.**

En contraste con la vía canónica, la activación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B es lenta y persistente (83). El componente central y específico de esta vía es la cinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK, del inglés *NF- $\kappa$ B inducing kinase*), que al activarse promueve la fosforilación y activación de IKK $\alpha$  (90). La IKK $\alpha$  activada a su vez fosforila directamente a p100 para favorecer su proteólisis a NF- $\kappa$ B2 p52. La vía culmina en la activación de los miembros secuestrados por p100, predominantemente NF- $\kappa$ B2 p52 y RelB (82, 83). Aunque los componentes centrales de la vía no canónica son NF- $\kappa$ B2 p52 y RelB, la subunidad p65 también puede estar asociada a p100 y activarse tras su proteólisis (84).

La vía no canónica de NF- $\kappa$ B es activada predominantemente a través de miembros de la superfamilia de receptores de TNF $\alpha$ , los cuales tienen la capacidad de unirse a TNF $\alpha$  a través de CRDs. Entre ellos se encuentran el receptor del inductor débil de apoptosis similar al TNF $\alpha$  (TWEAK-R, del inglés *TNF $\alpha$ -related weak inducer of apoptosis receptor*)/factor

inducible por el FGF-14 (Fn14, del inglés *FGF-inducible 14*), el receptor de linfotoxina-beta (LT $\beta$ R, del inglés *lymphotoxin-beta receptor*), el receptor del factor activador de células B (BAFF-R, del inglés *B cell activating factor receptor*), el receptor activador de NF- $\kappa$ B (RANK, del inglés *receptor activator of NF- $\kappa$ B*) y CD40 (83, 91). Otra característica en común de estos receptores es la presencia de motivos intracelulares de unión a las ligasas de ubiquitina TRAF2 y 3, que forman un complejo con cIAP1 y 2 y NIK (83, 91). Al activarse la vía, existe un desacoplamiento del complejo, que favorece la degradación de TRAF3 y la liberación de NIK (90).

Existen varios mecanismos de regulación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B. El principal regulador de la vía es TRAF3, que promueve la ubiquitinación y degradación de NIK (90). NIK y TRAF3 a su vez, están regulados por la proteína-12 que contiene dominios NACHT, LRR y PYD (NLRP12, del inglés *NACHT, LRR and PYD domain-containing protein 12*) y TRAF3 es regulada por la deubiquitinasa OTUD7B (92, 93). Además, la IKK $\alpha$  activada fosforila a NIK en varios residuos de serina de su extremo carboxilo-terminal para su desestabilización, como un mecanismo de retroalimentación negativa (94). La cinasa-1 de unión a TANK relacionada con IKK (TBK1, del inglés *TANK-binding kinase-1*) también fosforila a NIK para promover su degradación (95).

Al desempeñar la vía no canónica de NF- $\kappa$ B diferentes funciones en la regulación del sistema inmune, que incluyen la regulación del desarrollo de órganos linfoides, la supervivencia y maduración de células B y la diferenciación de osteoclastos, su desregulación se ha asociado al desarrollo de patología autoinmune (83, 91). También se ha relacionado con la angiogénesis patológica asociada con tumores cancerosos (96, 97).

### 3.2.2 Vías atípicas de TNF $\alpha$ .

Además de la vía de NF- $\kappa$ B, TNF $\alpha$  induce la activación de vías atípicas de señalización, como como las vías de PI3/Akt y las MAPKs p38, JNK y Erk1/2 (98, 99). Estas vías contribuyen con la actividad biológica de TNF $\alpha$  al inducir una respuesta secundaria incrementando la expresión de citocinas proinflamatorias, incluyendo el mismo TNF $\alpha$  (99). Las vías atípicas de TNF $\alpha$  también se activan tras la unión de TNF $\alpha$  con su receptor y el ensamblaje del complejo I (79, 88). En el caso de las MAPKs, su señalización comparte una estructura común, que incluye a las MAPK cinasas (MAP2K o MAPKK, del inglés *MAPK kinase*) y las MAPKK cinasas (MAP3K o MAPKKK, del inglés *MAPKK kinase*). Las MAP3Ks fosforilan a diferentes MAP2Ks que son específicas para cada vía de señalización (99). En este proceso, TAK1 e IKK $\beta$  desempeñan un papel importante dependiente de ubiquitinación (80). Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la activación de estas vías por TNF $\alpha$  no se han definido con precisión.

Durante la activación de NF- $\kappa$ B, las vías de las MAPKs p38 y Erk1/2 participan en la activación de las cinasas MPK1 y 2 que fosforilan a la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en S276. Por lo tanto, estas cinasas también median el entrecruzamiento entre NF- $\kappa$ B y las MAPKs a nivel transcripcional (85).

### 3.3 TNF $\alpha$ como estímulo inflamatorio inductor de EndMT.

TNF $\alpha$  desempeña un papel crítico en la fisiopatogenia de muchas enfermedades inflamatorias relacionadas con daño vascular y aterosclerosis acelerada (6). TNF $\alpha$  actúa sobre el endotelio vascular, donde promueve diversos eventos relacionados con aterosclerosis, como la expresión de moléculas de adhesión en CEs y la inducción de EndMT, tanto de manera

independiente como de forma sinérgica como otras citocinas proinflamatorias, primordialmente a través de la activación de NF- $\kappa$ B (11, 48, 75, 100-102). En este sentido, Mahler y cols reportaron una expresión incrementada de NF- $\kappa$ B en células mesenquimales derivadas de endotelio en los sitios distales a lesiones calcificadas en válvulas aórticas humanas (75). Por su parte, Fleenor y cols describieron la EndMT relacionada con la senescencia en CEs aórticas humanas, la cual es dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B, y reprodujeron la EndMT en células endoteliales “jóvenes” tras el estímulo con TNF $\alpha$  que, similar a lo reportado por Mahler y cols, favoreció la polarización hacia el fenotipo mesenquimal (103). Además, otras vías de señalización atípicas, como las vías de PI3K/Akt y las MAPKs p38 y Erk1/2 pueden estar involucradas en la EndMT inducida por TNF $\alpha$  (11, 102, 104, 105). NF- $\kappa$ B y sus genes asociados están regulados al alta en el endotelio susceptible a aterosclerosis en respuesta a TNF $\alpha$  y a otras citocinas proinflamatorias (101, 106-112). Se ha descrito incluso la participación de la vía no canónica de NF- $\kappa$ B y de vías atípicas de TNF $\alpha$  en la aterosclerosis (109, 113). La activación de NF- $\kappa$ B favorece la expresión de los genes de los factores de transcripción inductores de EndMT, como Snail, ZEB1 y TWIST1 (10, 52, 114). Como se mencionó anteriormente, estos factores de transcripción reprimen la expresión de genes endoteliales y promueven la expresión de genes mesenquimales, favoreciendo así la polarización de CEs hacia el fenotipo mesenquimal en el ambiente inflamatorio.

Las vías de señalización asociadas a TNF $\alpha$  están regulada por proteínas con actividad de fosfatasa de tirosina (PTPs, del inglés *protein tyrosine phosphatases*) (115). Para algunas PTPs se han sugerido sustratos específicos en estas vías de señalización. Por ejemplo, Wei y cols reportaron la regulación de la EndMT inducida por IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B/Snail por la proteína fosfatasa de tirosina-L1 (PTPL1, del inglés *protein tyrosine phosphatase-L1*) al favorecer la

desfosforilación de pI $\kappa$ B $\alpha$  en Y42 y prevenir su degradación (116). Cho y cols documentaron la regulación de la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, del inglés *intercellular adhesion molecule-1*) en queratinocitos por la proteína fosfatasa de tirosina-D1 (PTPD1, del inglés *protein tyrosine phosphatase-D1*) al desfosforilar directamente a pIKK $\beta$  en S177/181 e inhibir NF- $\kappa$ B (117). Hai Thi y cols reportaron la regulación de NF- $\kappa$ B y MAPKs Erk1/2 y p38 en macrófagos por la proteína fosfatasa de tirosina de células T (TC-PTP, del inglés *T-cell protein tyrosine phosphatase*) al desfosforilar directamente al proto-oncogén pSrc en el residuo inhibitorio Y527 y favorecer la activación del complejo IKK (118). La proteína fosfatasa de tirosina-1B (PTP1B, del inglés *protein tyrosine phosphatase-1B*) también puede estar implicada en la regulación de las vías de señalización asociadas a TNF $\alpha$ , como se comentará a continuación.

#### **4. Proteína fosfatasa de tirosina-1B (PTP1B):**

##### **4.1 Antecedentes históricos y generalidades.**

Las PTPs son una superfamilia de enzimas que se encargan de remover grupos fosfato de residuos de tirosina en proteínas fosforiladas. Las PTPs se dividen en cuatro clases (I-IV) según la secuencia de aminoácidos en su dominio catalítico y el aminoácido nucleofílico en su sitio activo empleado para llevar a cabo sus reacciones catalíticas. Las PTPs pertenecientes a las clases I-III emplean cisteína como aminoácido nucleofílico, mientras que las PTPs de la clase IV emplean aspartato (119). La clase más extensa de PTPs es la clase I, que a su vez se divide en dos subfamilias: las PTPs clásicas o específicas que tirosina, que incluyen PTPs de tipo receptor y PTPs de tipo no receptor, con base en la presencia de un dominio transmembranal, y las proteínas fosfatasas de especificidad dual (DUSPs, del inglés *dual-specificity phosphatases*) similares a la fosfatasa H1 del virus vaccinia (VH1, del inglés *vaccinia*

*virus H1*), que constituyen un grupo muy diverso y pueden desfosforilar residuos de serina y treonina además de tirosina (119, 120). PTP1B pertenece a las PTPs clásicas de tipo no receptor dentro de la clase I. Se expresa de manera ubicua en el citoplasma y es considerada el prototipo de las fosfatasa de tipo no receptor (119-121).

PTP1B fue la primera PTP en ser purificada, clonada y cristalizada (119). Los primeros reportes de su purificación y caracterización datan de 1988, por Tonks y cols. Este grupo purificó a homogeneidad PTP1B a partir de placenta humana mediante cromatografía en columna, empleando como sustrato una lisozima fosforilada en un residuo de fosfotirosina (pTyr) por el receptor de insulina (IR, del inglés *insulin receptor*) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *epidermal growth factor*), que tienen actividad de tirosin-quinasas (122, 123). En 1990 se clonó PTP1B por dos grupos de investigación independientes (124, 125) y en 1994 se purificó y cristalizó su dominio catalítico tras su sobreexpresión en bacterias *E. coli* (126). En 1999, Elchebly y cols reportaron un modelo murino deficiente en PTP1B, el cual no presentó diferencias fenotípicas en comparación con ratones silvestres. Sin embargo, mostró una mayor sensibilidad a la insulina y resistencia a la obesidad tras una dieta hipercalórica (127). Estos hallazgos fueron confirmados un año más tarde por Klamann y cols (128) y dieron pauta para entender las principales funciones de PTP1B, como se describe más adelante.

#### **4.2 Estructura, regulación y vías de señalización asociadas.**

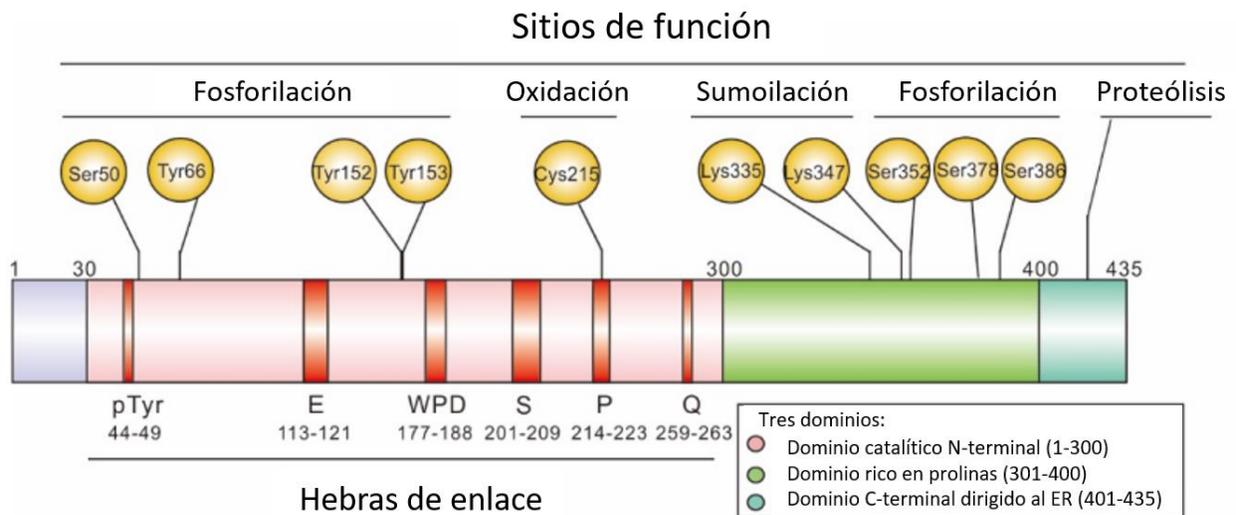
PTP1B se codifica por el gen *PTPN1*, que en humanos se localiza en el cromosoma 20q13.1. En humanos existen dos transcritos de PTP1B: uno más largo, de 4.7 kb, que contiene un intrón 9, y otro más corto, de 3.5 kb, sin dicho intrón (119). La proteína contiene 435 aminoácidos y está conformada por un dominio catalítico amino-terminal (residuos 30-

278), dos dominios ricos en prolina (residuos 278-401) y un dominio carboxilo-terminal (residuos 401-435) que dirige a PTP1B a la cara citoplásmica del retículo endoplásmico (ER, del inglés *endoplasmic reticulum*) (119, 121). Esto le facilita a PTP1B el acceso a diversos blancos intracelulares (129). (**Figura 3**)

El gen de PTP1B contiene sitios de unión para factores de transcripción que regulan su expresión, entre los que se encuentra NF- $\kappa$ B (119, 130, 131). También se regula a través de modificaciones postraduccionales, como oxidación, S-nitrosilación, fosforilación, sumoilación y escisión proteolítica por calpaínas (119). La oxidación de PTP1B en C215 inhibe su actividad al provocar cambios conformacionales reversibles en su sitio catalítico que previenen la unión con sus sustratos (132). La S-nitrosilación de PTP1B en C215 protege a su sitio catalítico de la oxidación irreversible ante el estrés oxidativo (133). La fosforilación en residuos de tirosina y serina también regulan la actividad de PTP1B. Por ejemplo, su fosforilación en S50 por Akt inhibe su actividad e impide su habilidad para desfosforilar al IR (134). La sumoilación en residuos de lisina disminuye la actividad de PTP1B (135). La sumoilación de PTP1B también favorece su distribución perinuclear, lo cual permite la regulación de la fosforilación de la proteína nuclear emerina en residuos de pTyr por PTP1B durante el ciclo celular (136). La escisión proteolítica por calpaínas de PTP1B en su dominio carboxilo-terminal libera a PTP1B del ER y genera una enzima activa de forma constitutiva (105).

PTP1B participa en diversas vías de señalización y funciones biológicas (129). Sus sustratos comprenden proteínas citosólicas, nucleares, unidas a la membrana plasmática, mitocondriales y de las uniones adherentes (119). La interacción de PTP1B con el IR se caracterizó integrando análisis de cristalografía, cinética de desfosforilación y de unión de la PTP1B mutante inactiva (Cys $\rightarrow$ Ser) con diferentes sustratos. Se determinó que los péptidos

que contienen residuos de pTyr dispuestos en tándem poseen una afinidad aproximadamente 70 veces mayor a PTP1B en comparación con los péptidos con un residuo único de pTyr (137). Este modelo se aplicó para predecir nuevos sustratos de PTP1B, como las proteínas Janus cinasa-2 (JAK2, del inglés *Janus kinase-2*) y tirosina cinasa-2 (TYK2, del inglés *tyrosine kinase-2*) y el transductor de señal y activador de la transcripción-6 (STAT6, del inglés *signal transducer and activator of transcription-6*) (138, 139). Con base en estos sustratos caracterizados en estudios tempranos, se puede inferir que PTP1B es un regulador esencial de procesos metabólicos y de inflamación (120). Como se mencionó, PTP1B es un importante regulador del IR. Además, PTP1B desfosforila al sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1, del inglés *insulin receptor substrate-1*) con lo cual regula la vía de PI3K/Akt estimulada tras la activación de IR/IRS-1 y mantiene la homeostasis de la glucosa (140). PTP1B también regula a la leptina al desfosforilar a JAK2 y con ello atenuar la vía JAK2/STAT3 (141, 142). Estos efectos explican la mayor sensibilidad a la insulina y la resistencia a la obesidad observada en el modelo murino deficiente en PTP1B (127). Por último, PTP1B regula la respuesta al estrés del ER al desfosforilar a la cinasa del ER parecida a la proteína cinasa de RNA (PERK, del inglés *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) (143). Al incrementar PTP1B su expresión bajo condiciones inflamatorias (130, 144) y tener como sustratos a miembros de la vía JAK/STAT (138, 139), se ha propuesto como un mecanismo de retroalimentación negativa para limitar la respuesta inflamatoria (129). Sin embargo, su delección específica en el compartimiento mieloide protegió a los ratones contra la inflamación aguda y crónica al incrementar los niveles de interleucina-10 (IL-10) (145). De manera similar, se han reportado hallazgos contradictorios en cuanto a la regulación de NF- $\kappa$ B por PTP1B (146, 147). Por lo tanto, PTP1B puede tener efectos proinflamatorios o antiinflamatorios, dependiendo del contexto biológico (129).

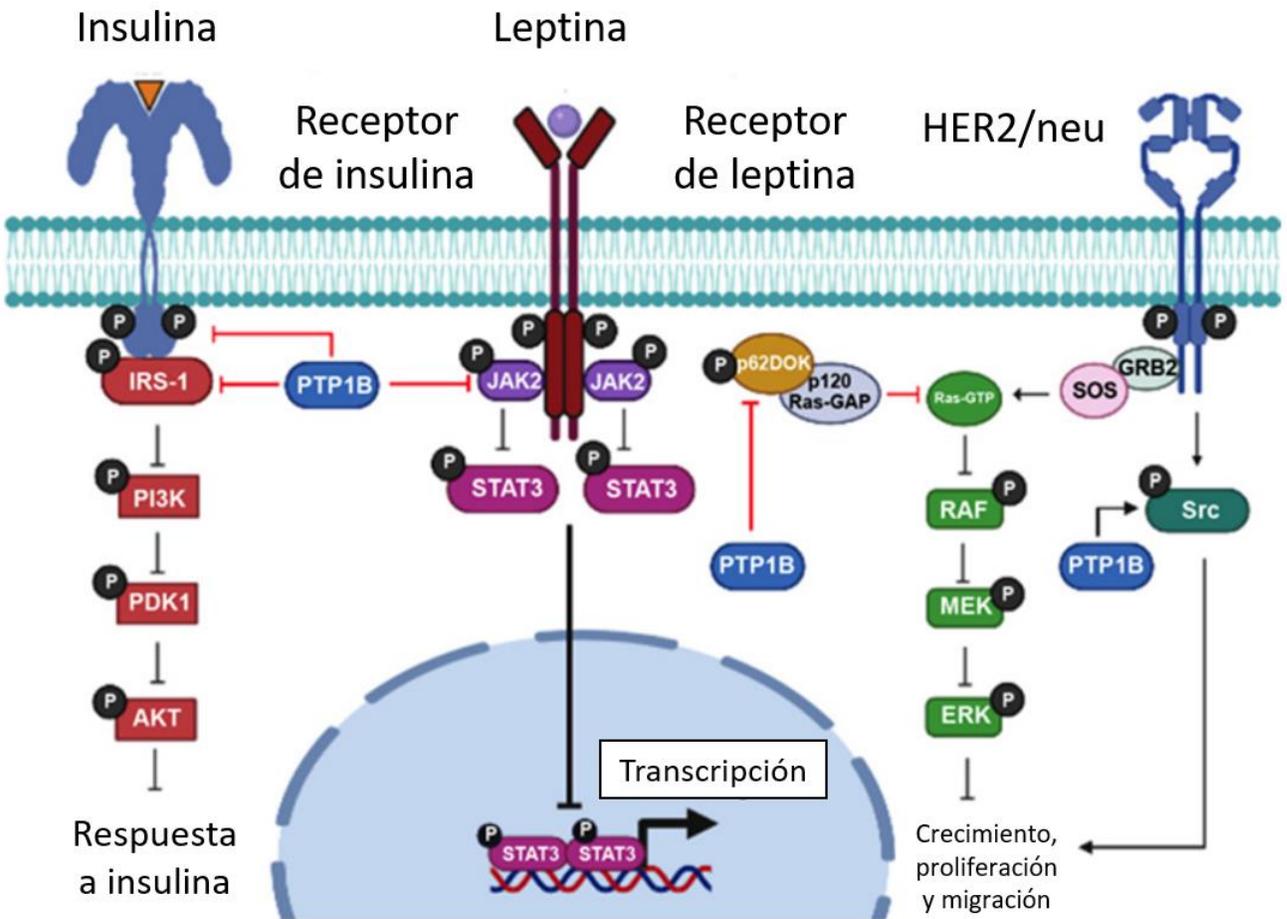


**Fig. 3 Representación esquemática de la estructura de los dominios de la PTP1B completa.** La PTP1B completa se compone de un dominio catalítico N-terminal que contiene varias hebras de enlace importantes (1-300) y un dominio C-terminal dirigido al ER (401-435), que flanquean a dos dominios ricos en prolina (301-400), con múltiples funciones en los diferentes sitios de la PTP1B. ER = retículo endoplásmico (del inglés *endoplasmic reticulum*). Adaptado de Liu et al, 2022.

PTP1B también puede actuar como un oncogén. Por ejemplo, promueve el desarrollo de cáncer de mama y otros tipos a través de HER2/Neu al actuar directamente sobre la proteína de acoplamiento-1 (p62Dok o Dok1, del inglés *docking protein-1*, 62kDa). Esta inhibe a la proteína activadora de GTPasa (GAP, del inglés *GTPase-activating protein*) p120/Ras e incrementa la activación de Ras-MAPKs, promoviendo la proliferación celular (148). Además, PTP1B desfosforila a Src en Y529, favorece la activación de Erk1/2 MAPK y, con ello, la proliferación celular y metástasis (149). **(Figura 4)**

### **4.3 Papel de PTP1B en la disfunción endotelial**

PTP1B se encuentra altamente expresada en el endotelio vascular. Contribuye al mantenimiento de la barrera endotelial mediante su interacción con elementos de las uniones adherentes endoteliales, como VE-cadherina, favoreciendo su estabilidad al promover bajos niveles de fosforilación en residuos de pTyr (104, 150-159). No obstante, PTP1B también se ha asociado con disfunción endotelial y enfermedades cardiovasculares (160, 161). Al regular tanto la señalización a través del IR y leptina como las vías asociadas a varios mediadores inflamatorios, PTP1B se ha propuesto como molécula blanco en el tratamiento de enfermedades relacionadas con resistencia a la insulina, como obesidad y diabetes (105, 162-164). Actualmente se evalúa la eficacia y seguridad de un inhibidor anti-sentido de PTP1B para el tratamiento de la diabetes en ensayos clínicos fase II (121). La inhibición de PTP1B también previno y revirtió la formación de la placa de ateroma en dos modelos murinos de aterosclerosis (165, 166). Además de estos hallazgos contrastantes, se desconoce si PTP1B está implicada en la EndMT inducida bajo condiciones inflamatorias. En el presente estudio, nos propusimos establecer un modelo de EndMT en CEs humanas inducido bajo condiciones inflamatorias, para explorar la posible implicación de PTP1B durante este proceso.



---

**Fig. 4 Principales vías de señalización reguladas por PTP1B.** PTP1B desempeña un papel negativo en la señalización de insulina y leptina, mientras que favorece la tumorigénesis inducida por HER2/Neu. La señalización a través del IR promueve la fosforilación de IRS-1 y la activación de PI3K/Akt. PTP1B atenúa la señalización de insulina al desfosforilar al IR y a IRS-1. La señalización de leptina activa la vía JAK2/STAT3, que también regula en forma negativa PTP1B. En cuanto a su papel oncogénico, PTP1B desfosforila a p62Dok, quien inhibe p120RasGAP y favorece la proliferación celular mediada por Ras-MAPK. PTP1B también desfosforila a Src en Y529 para promover la migración celular y favorece la subsecuente activación de GTPasas pequeñas, como Ras and Rac1. ERK (Erk1/2) = Cinasas reguladas por señales extracelulares-1 y 2 (del inglés *extracellular signal-regulated kinases-1/2*); GRB2 = proteína-2 unida al receptor del factor de crecimiento (del inglés *growth factor receptor-bound protein 2*); IRS-1 = Sustrato del receptor de insulina-1 (del inglés *insulin receptor substrate-1*); JAK2 = Janus cinasa-2 (del inglés *Janus kinase-2*); MEK (MAP2Ks) = MAPK cinasas (del inglés *MAPK kinases*); P62DOK (Dok1) = Proteína de acoplamiento-1 (del inglés, *docking protein 1, 62kDa*); PDK1 = Proteína cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido (del inglés *3-phosphoinositide-dependent kinase-1*); PI3K = Fosfoinositol 3-cinasa (del inglés *phosphoinositide 3-kinase*); PTP1B = Proteína fosfatasa de tirosina-1B (del inglés *protein tyrosine phosphatase-1B*); GAPs = Proteínas activadoras de GTPasas (del inglés *GTPase-activating proteins*); SOS = Hijo de Sevenless (del inglés *son of Sevenless*); STAT3 = transductor de señal y activador de la transcripción-3 (del inglés *signal transducer and activator of transcription-3*). Adaptado de Villamar-Cruz et al, 2021.

---

# JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La aterosclerosis representa la causa subyacente de las enfermedades cardiovasculares, como infarto del agudo de miocardio, evento vascular cerebral, angina inestable y muerte súbita cardíaca. De manera global, dichas enfermedades representan la primera causa de muerte a nivel mundial y su incidencia continúa en incremento, como resultado de la epidemia internacional de obesidad y diabetes mellitus 2 (2).

La disfunción endotelial constituye el estadio más temprano en la historia natural de la aterosclerosis (1). El enlace entre la disfunción endotelial y la inflamación ocurre a través del fenómeno biológico de la EndMT (8, 21), que a su vez constituye un evento clave en la fisiopatología de la aterosclerosis y otras condiciones patológicas relacionadas con fibrosis, vasculopatía e inflamación (9, 13, 24-26, 28, 31). Por otro lado, las PTPs, como PTP1B, constituyen importantes reguladores de las vías de señalización de citocinas proinflamatorias asociadas con disfunción endotelial y EndMT, como  $\text{TNF}\alpha$  (129, 146, 147). Más aún, PTP1B se ha propuesto como una molécula blanco en la disfunción endotelial y las enfermedades cardiovasculares (160, 161) y su inhibición revirtió la formación de la placa de ateroma en dos modelos murinos de aterosclerosis (165, 166). Sin embargo, el papel de PTP1B en la EndMT inducida bajo condiciones inflamatorias hasta ahora resulta poco claro. Con el presente estudio se pretende ampliar el modelo fisiopatogénico de la disfunción endotelial asociada con inflamación y plantear futuros blancos terapéuticos para la aterosclerosis y otras condiciones patológicas en las que está implicada la EndMT.

# PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La fosfatasa de tirosina PTP1B participa en la EndMT inducida por inflamación en CEs humanas?

## **HIPÓTESIS**

La fosfatasa de tirosina PTP1B participa en la EndMT inducida por inflamación en CEs humanas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Dilucidar si la fosfatasa de tirosina PTP1B participa en un modelo *in vitro* de EndMT inducida bajo condiciones inflamatorias en CEs humanas.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar la capacidad de  $\text{TNF}\alpha$  para inducir EndMT mediante los cambios en la expresión de los marcadores endoteliales, mesenquimales y factores de transcripción relacionados con EndMT y en la evaluación de cambios funcionales, como lo son cambios en la morfología y la capacidad migratoria. Analizar los cambios en la expresión de PTP1B en CEs humanas durante la EndMT inducida por  $\text{TNF}\alpha$ .
2. Evaluar la activación de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  y de otras vías atípicas de señalización, como Akt y MAPKs (Erk1/2 y p38), ante el estímulo con  $\text{TNF}\alpha$  en CEs humanas.

3. Determinar el efecto de la inhibición farmacológica de IKK $\beta$  en la activación de NF- $\kappa$ B, Akt y MAPKs (Erk1/2 y p38), así como en la expresión de PTP1B inducidas por TNF $\alpha$  en CEs humanas.
4. Determinar el efecto de la inhibición farmacológica de IKK $\beta$  en la EndMT inducida por TNF $\alpha$  en CEs humanas.
5. Determinar el efecto del silenciamiento de PTP1B en la EndMT y la activación de Akt y MAPKs (Erk1/2 y p38) inducidas por TNF $\alpha$  en CEs humanas.

# MATERIAL Y MÉTODOS

**Reactivos y anticuerpos.** El TNF $\alpha$  recombinante humano (No. cat. 300-01A) fue adquirido de PeproTech (Rocky Hill, NJ). El inhibidor de IKK III BMS-345541 (No. cat. 401840) fue adquirido de Calbiochem/SigmaAldrich (St. Louis, MO). Los anticuerpos contra VE-cadherina (No. cat. 2500S; clona D87F2; 1:1000), N-cadherina (No. cat. 13116S; clona D4R1H; 1:1000), eNOS (No. cat. 32027S; clona D9A5L; 1:1000), CD31 (No. cat. 3528S; clona 89C2; 1:1000), TWIST1 (No. cat. 69366S; clona E7E26; 1:1000), ZEB1 (No. cat. 3396S; clona D80D3; 1:1000), pNF- $\kappa$ B p65-S536 (No. cat. 3033S; clona 93H1; 1:1000), I $\kappa$ B $\alpha$  (No. cat. 4812S; clona 44D4; 1:1000), pI $\kappa$ B $\alpha$ -S32/36 (No. cat. 9246S; clona 5A5; 1:1000), Akt (pan) (No. cat. 2920S; clona 40D4; 1:1000), pAkt-S473 (No. cat. 9271S; 1:1000), p38 MAPK (No. cat. 9212S; 1:1000), pp38 MAPK-T180/Y182 (No. cat. 9216S; clona 28B10; 1:1000), p44/42 MAPK (Erk1/2) (No. cat. 9102S; 1:1000) y pp44/42 MAPK (Erk1/2)-T202/Y204 (No. cat. 4370S; clona D13.14.4E; 1:1000) se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). El anticuerpo contra Snail (No. cat. GTX100754; 1:1000) se obtuvo de GeneTex (Irvine, CA). Los anticuerpos contra PTP1B (No. cat. ab244207; clona EPR22474; 1:1000), NF- $\kappa$ B p65 (No. cat. ab7970; 1:1000 para Western blot y 1:100 para inmunofluorescencia), y lámina B1 (No. cat. ab16048; 1:1000) se obtuvieron de Abcam (Cambridge, UK). El anticuerpo contra GAPDH (No. cat. AM4300; 1:1000) se obtuvo de Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Los anticuerpos contra tubulina (No. cat. T5168; clona B-5-1-2; 1:1000) y pVE-cadherina-Y685 (No. cat. ABT1760; 1:1000) se obtuvieron de MilliporeSigma (St. Louis, MO).

**Cultivo de CEs.** Los experimentos se realizaron sobre una línea celular immortalizada endotelial humana de aorta (HAECs, del inglés *humana aortic endothelial cells*) (No. cat. CC-2535; Lonza, Basilea, Suiza) con menos de 10 pases. Las HAECs se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> recubiertos de gelatina y con tapón ventilado, en medio endotelial EBM-2

(No. cat. CC-3156; Lonza, Basilea, Suiza), suplementado con suero bovino fetal al 5% y enriquecido con “SingleQuots” endoteliales EGM-2 (No. cat. CC4147; Lonza, Basilea, Suiza), que contienen: 3 ng/mL EGF, 25.5  $\mu$ g/mL ácido ascórbico, 20 ng/mL VEGF, 4 ng/mL FGF y 20 ng/mL factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1, del inglés *insulin growth factor-1*), a 37 °C. El medio de cultivo se reemplazó cada día alterno.

**Estímulo de CEs.** Las HAECs se sembraron sobre placas de cultivo de 6 pozos recubiertas de 0.2% gelatina porcina (No. cat. G1890; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (200,000-250,000 células/pozo para alcanzar una adecuada confluencia en el respectivo periodo de incubación) y se estimularon con 25 ng/mL TNF $\alpha$  durante los tiempos indicados. Se trataron las HAECs con 5  $\mu$ M BMS-345541 2 h antes de la adición de 25 ng/mL TNF $\alpha$  durante los tiempos indicados, con cuatro diferentes condiciones experimentales: sin tratamiento, 25 ng/mL TNF $\alpha$ , 5  $\mu$ M BMS-345541 y la combinación TNF $\alpha$  + BMS-345541.

**Silenciamiento de PTP1B.** Las HAECs se sembraron sobre placas de cultivo de 12 pozos recubiertas de 0.2% gelatina porcina (100,000-150,000 células/pozo para alcanzar una adecuada confluencia en el respectivo periodo de incubación) y se transfectaron transitoriamente con un RNA pequeño de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA*) dirigido específicamente contra la PTP1B humana (sentido: 5'-GGAUUAAACUACAUCAAGATT-3', antisentido: 5'-UCUUGAUGUAGUUUAAUCCGA-3') (No. cat. AM51331) o un siRNA control negativo (No. cat. AM4611) sintetizado por Ambion/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) con el reactivo de transfección HiPerFect (No. cat. 301705; Qiagen, Hilden, Alemania), según la recomendación del fabricante. Brevemente, antes de la transfección se reemplazó el medio de cultivo con 200  $\mu$ L de medio de cultivo completo y fresco. Se diluyeron 75 ng siRNA en 200  $\mu$ L de medio de cultivo sin suero (para una

concentración final del siRNA de 10 nM); se añadieron 12  $\mu$ L de HiPerFect a la dilución y se mezcló mediante vórtex. Las mezclas se incubaron por 10 min a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos de transfección, tras lo cual se añadieron a las células en cultivo mediante goteo. Se agitó gentilmente la placa de cultivo para asegurar una distribución uniforme de los complejos y se incubó a 37 °C por 6 h. Se añadieron 800  $\mu$ L de medio completo a las células para un volumen final de 1200  $\mu$ L por pozo y se incubaron por 2 días, tras los cuales se reemplazó el medio de cultivo. Estas células fueron inducidas a EndMT o activadas con TNF $\alpha$  para su evaluación posterior.

**Western blot.** Se lisaron las HAECs con buffer de lisis RIPA, que contiene 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 (No. cat. R0278; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con mini-tabletas de inhibidores de proteasas (aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina, AEBSF y pepstatina A) (No. cat. A32955; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) en frío durante 30 min. Se centrifugaron los lisados a 20,817 g durante 10 minutos a 4 °C y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos Eppendorf. Para la obtención de extractos citoplásmicos y extractos nucleares, se utilizó un kit de extracción nuclear (No. cat. 40010; Active Motif, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo. Brevemente, se resuspendieron las HAECs en buffer hipotónico 1X en frío durante 15 min y se centrifugaron durante 30 segundos a 20,817 g; se transfirieron los sobrenadantes (fracción citoplásmica) a tubos Eppendorf pre-enfriados. Se resuspendieron los pellets nucleares en buffer de lisis “complete”, que contiene 10 mM DTT, buffer de lisis AM1 y coctel de inhibidores de proteasas, en frío durante 30 min y se centrifugaron durante 10 min a 20,817 g; se transfirieron los sobrenadantes (fracción nuclear) a tubos Eppendorf pre-enfriados. La cantidad de proteína se cuantificó mediante un kit de ensayo de ácido bicinconínico (BCA, del inglés *bicinchoninic acid*)

(No. cat. 23225; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se emplearon 15-20  $\mu\text{g}$  de proteína por cada condición experimental. Se realizó electroforesis en gel de acrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) de gradiente 4-12% (No. cat. NP0335BOX, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), que se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa (No. cat. 1704270; BioRad Laboratories, Hercules, CA). Las membranas se bloquearon con leche al 5% en PBS-Tween durante 1 h y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente anti-conejo (No. cat. 926-32213; 1:10000) o anti-ratón (No. cat. 926-32212; 1:10000) acoplados a IRDye 800CW, o anti-conejo (No. cat. 926-68071; 1:10000) o anti-ratón (No. cat. 926-68072; 1:10000) acoplados a IRDye 680RD, obtenidos de LI-COR Biosciences (Lincoln, NE), durante 1 h a temperatura ambiente. Se detectaron las bandas fluorescentes mediante un escáner LI-COR Odyssey Clx. Se determinó la densidad de cada banda con apoyo del programa Image J 1.53k y se normalizó para las proteínas de carga GAPDH, tubulina (fracción citoplásmica) o lámina B1 (fracción nuclear).

**Inmunofluorescencia.** Las HAECs se sembraron sobre cubreobjetos recubiertos de 0.2% gelatina porcina colocados de placas de cultivo de 24 pozos (50,000 células/pozo) y se estimularon con 25 ng/mL  $\text{TNF}\alpha$  por 0 y 15 min. Se fijaron las células en 4% paraformaldehído (PFA) diluido en PBS durante toda la noche a 4°C; se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno, se permeabilizaron las células con 0.2% Triton X-100 durante 10 min y se realizaron tres nuevos lavados con PBS de 5 min cada uno. Se bloquearon los cubreobjetos con 0.2% gelatina porcina durante 30 min y se incubó el anticuerpo primario durante 1 h en una cámara húmeda a 37 °C. Se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno; se incubó el anticuerpo secundario anti-conejo (No. cat. A27039; 1:400) acoplado a Alexa Fluor 555

obtenido de Invitrogen/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) durante 30 min a 37 °C y se realizaron tres nuevos lavados con PBS de 5 min cada uno. Se tiñeron los núcleos con 1:1000 Hoechst 33342 (No. cat. H3570; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) diluido en PBS en el segundo lavado durante 10 min a temperatura ambiente. Se montaron los cubreobjetos en portaobjetos de vidrio con la solución ProLong Gold (No. cat. P36930; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se obtuvieron las imágenes en un microscopio confocal Leica. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en el compartimiento nuclear con apoyo del programa Image J 1.53k.

**Ensayo de migración celular.** Las HAECs se sembraron sobre placas de cultivo de 12 pozos recubiertos de 0.2% gelatina porcina (150,000 células/pozo) y se dejaron adherir durante toda la noche. Se practicó una herida sobre la monocapa celular con la punta de una micropipeta; se lavaron las células con PBS y se trataron con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 4, 8 y 10 h, o bien, con 5  $\mu$ M BMS-345541 2 h antes del estímulo con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 10 h, con cuatro diferentes condiciones experimentales: sin tratamiento, 25 ng/mL TNF $\alpha$ , 5  $\mu$ M BMS-345541 y la combinación TNF $\alpha$  + BMS-345541. Se transfectaron las HAECs transitoriamente con un siRNA dirigido específicamente contra la PTP1B humana (sentido: 5'-GGAUUAAACUACAUCAAGATT-3', antisentido: 5'-UCUUGAUGUAGUUUAAUCCGA-3') (No. cat. AM51331) o un siRNA control negativo (No. cat. AM4611) sintetizado por Ambion/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) como se describió previamente y se incubaron durante 1 día. Se sembraron las células transfectadas en placas de cultivo de 12 pozos recubiertas de 0.2% gelatina porcina (150,000 células/pozo) y se dejaron adherir durante toda la noche. Se practicó una herida sobre la monocapa celular con la punta de una micropipeta; se lavaron las células con PBS y se trataron con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 10 h. Se adquirieron las imágenes en un

microscopio de luz ECHO Lite. Se cálculo el porcentaje de cierre de herida en cada condición experimental tomando como referencia el área de la herida a las 0 h, con apoyo del programa Image J 1.53k.

**Análisis estadístico.** Las variables cuantitativas se expresaron como mediana e intervalo intercuartil y para comparar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizo con apoyo del programa GraphPad Prism 9.5.0.

# RESULTADOS

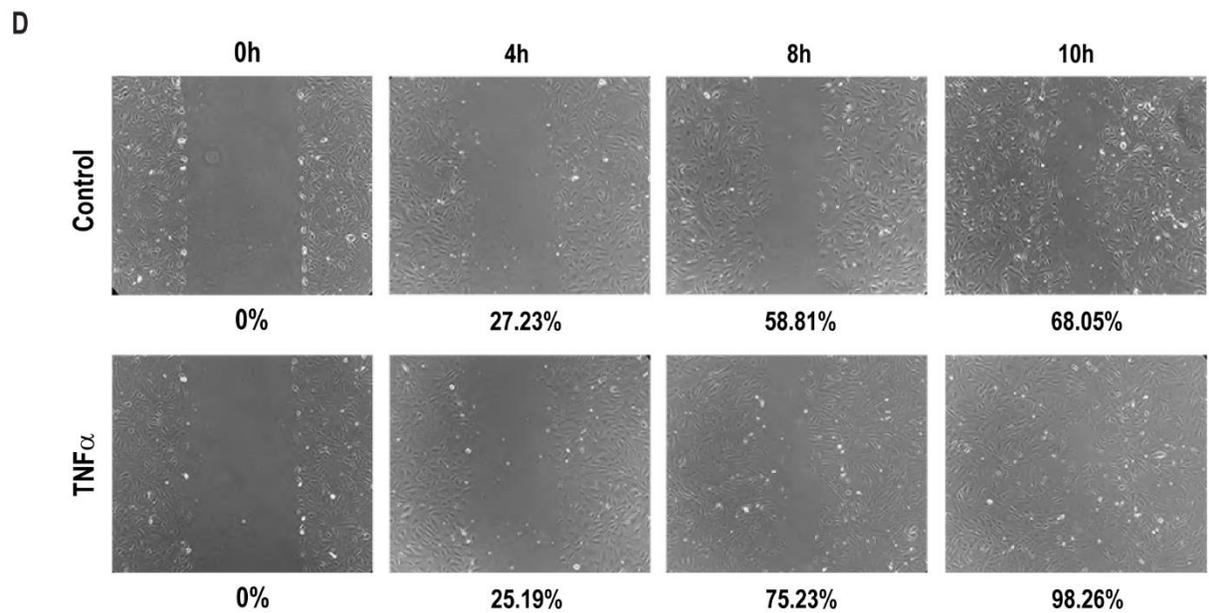
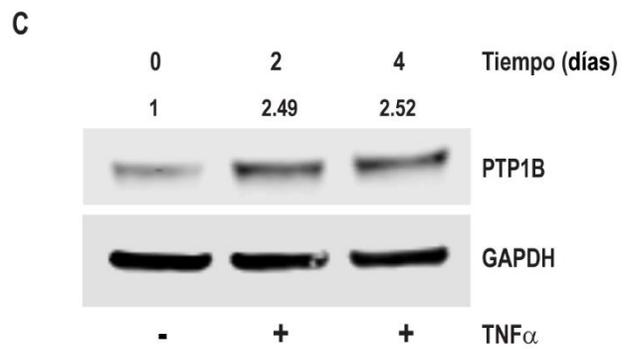
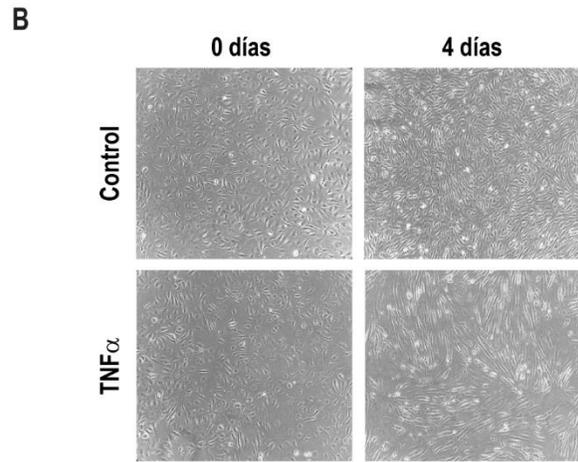
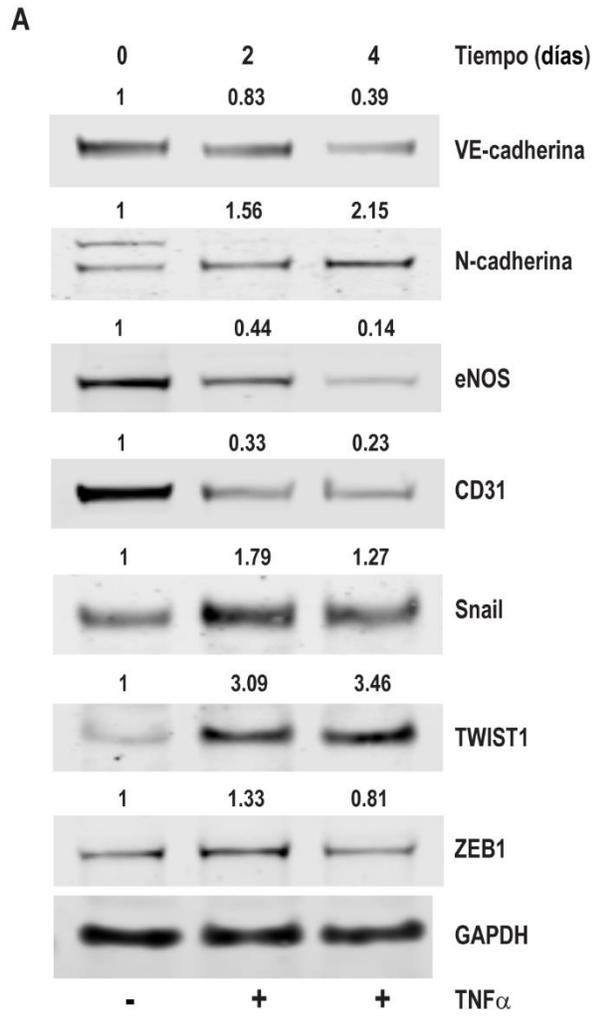
## 1. $\text{TNF}\alpha$ promueve EndMT e incrementa la expresión de PTP1B en HAECs.

PTP1B desempeña un papel crucial en la disfunción endotelial inducida por inflamación, como lo sugieren reportes recientes (160, 167, 168). Sin embargo, el papel de PTP1B durante la EndMT inducida por inflamación hasta ahora resulta poco claro. Para estudiar la posible participación de PTP1B en la EndMT inducida bajo condiciones inflamatorias, establecimos un modelo de EndMT inducido por  $\text{TNF}\alpha$  en CEs humanas.

Se estimularon las HAECs con 25 ng/mL  $\text{TNF}\alpha$  por 0, 2, y 4 días. Evaluamos la inducción de EndMT mediante la pérdida de los marcadores endoteliales y la expresión de marcadores mesenquimales por Western blot (Fig. 1A). Encontramos que los marcadores endoteliales, VE-cadherina, CD31 y eNOS, disminuyeron sus niveles de expresión en función del tiempo tras el tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$ . En contraste, la expresión del marcador mesenquimal N-cadherina y del factor de transcripción TWIST1 se incrementó en función del tiempo tras el tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$ . Los factores de transcripción Snail y ZEB1 presentaron un pico en su expresión después de 2 días de tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$  con una discreta disminución en el día 4 (Fig. 1A).

Después evaluamos los cambios morfológicos de las HAECs tratadas con 25 ng/mL  $\text{TNF}\alpha$  por 4 días. Las HAECs no estimuladas mantuvieron su morfología normal de “patrón de calle empedrada” tras 0 y 4 días en cultivo. En contraste, el  $\text{TNF}\alpha$  generó HAECs en forma de huso tras 4 días de tratamiento, mismas que corresponden al fenotipo mesenquimal (Fig. 1B).

Después evaluamos el efecto de  $\text{TNF}\alpha$  en la expresión de PTP1B por Western blot. Observamos un incremento en la expresión de PTP1B en el día 2 de tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$  y sus niveles se mantuvieron constantes hasta el día 4 (Fig. 1C).



---

**Fig. 1 TNF $\alpha$  promueve EndMT e incrementa PTP1B en CEs humanas.** **A** TNF $\alpha$  induce EndMT en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 2, y 4 días. Se realizó Western blot para detectar los niveles de expresión de los marcadores endoteliales, VE-cadherina, CD31 y eNOS, el marcador mesenquimal, N-cadherina, y los factores de transcripción, Snail, ZEB1 y TWIST1. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para GAPDH. **B** TNF $\alpha$  induce cambios morfológicos en HAECs consistentes con el fenotipo mesenquimal. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 4 días. Se adquirieron las imágenes en un microscopio de luz ECHO Lite. **C** TNF $\alpha$  promueve la expresión de PTP1B en HAECs. Se trataron HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 2 y 4 días. Se realizó Western blot para detectar los niveles de expresión de PTP1B. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para GAPDH. **D** TNF $\alpha$  acelera la migración celular en HAECs. Se evaluó la migración celular en un ensayo de cierre de herida. Se trataron HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 4, 8 y 10 h. Se adquirieron las imágenes en un microscopio de luz ECHO Lite.

---

Finalmente, investigamos el efecto de TNF $\alpha$  en la migración de HAECs en un ensayo de cierre de herida como una característica de la EndMT (Fig. 1D). Tratamos las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 4, 8, y 10 h. Observamos que las HAECs prácticamente cerraron la herida a las 10 horas del tratamiento con TNF $\alpha$  en comparación con las células no estimuladas, que mostraron un trazo remanente de la herida (Fig. 1D). Por lo tanto, nuestros resultados indican que TNF $\alpha$  induce EndMT con un concomitante aumento en la expresión de PTP1B y un incremento en la migración celular, lo cual es consistente con el fenotipo mesenquimal en HAECs.

## **2. Efecto de TNF $\alpha$ en la activación de NF- $\kappa$ B, Akt, MAPKs (Erk1/2 y p38) en HAECs.**

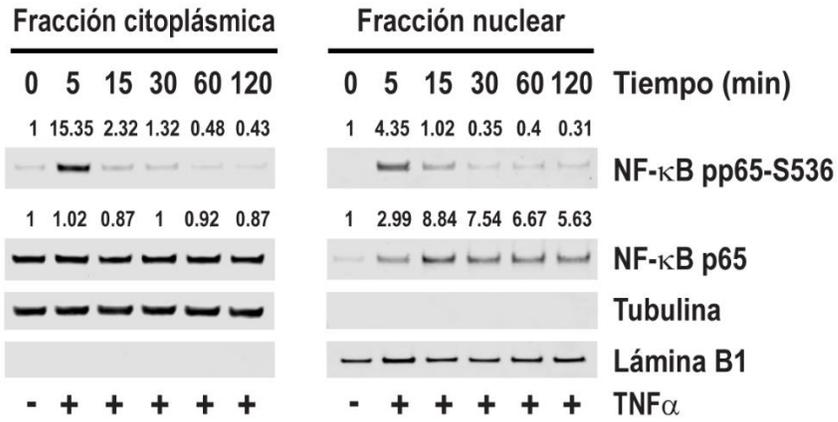
NF- $\kappa$ B es considerada la principal vía de señalización proinflamatoria de citocinas como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (79, 169). Tras haber demostrado que TNF $\alpha$  induce EndMT, evaluamos la activación de NF- $\kappa$ B mediante la fosforilación de su subunidad p65 en S536 tanto en el extracto citoplásmico como en el extracto nuclear de HAECs por Western blot.

Se estimularon las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min (Fig. 2A). Se observó un incremento en NF- $\kappa$ B pp65-S536 tras 5 min de tratamiento con TNF $\alpha$  en las fracciones proteicas citoplásmica y nuclear. NF- $\kappa$ B p65 no presentó cambios en su expresión en la fracción citoplásmica tras el tratamiento con TNF $\alpha$ . Sin embargo, NF- $\kappa$ B p65 se incrementó en la fracción nuclear tras 5 min de tratamiento con TNF $\alpha$  y disminuyó después de 15 min, tras lo cual se mantuvo estable hasta los 120 min (Fig. 2A).

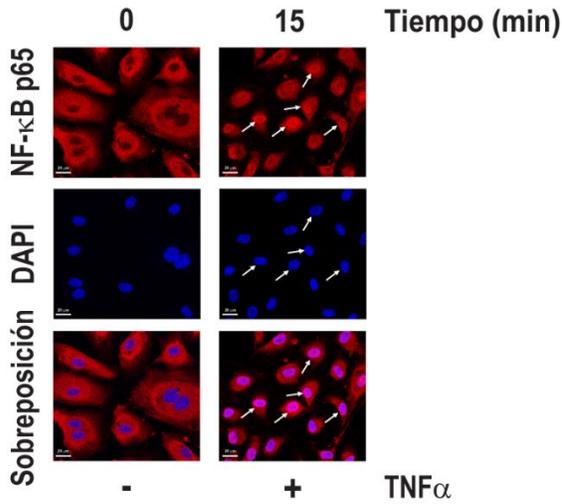
La traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B p65 fue corroborada por inmunofluorescencia (Fig. 2B-C). Se estimularon las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 15 min (Fig. 2B-C). En ausencia de TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 se localizó en el citoplasma en su forma inactiva, mientras que el estímulo con TNF $\alpha$  por 15 min indujo la traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B p65 de manera significativa (Fig. 2B-C).

Normalmente, NF- $\kappa$ B p65 reside en el citoplasma unido a su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ . Un paso temprano en la activación de NF- $\kappa$ B requiere la fosforilación del complejo de cinasas IKK $\alpha/\beta$  y las IKKs activadas fosforilan a I $\kappa$ B $\alpha$ . Posteriormente, NF- $\kappa$ B es liberado y traslocado al núcleo (79, 85). Evaluamos el efecto de TNF $\alpha$  sobre la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  por Western blot (Fig. 2C). Se estimularon las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min. La degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  se observó tan pronto como a los 5 min de tratamiento con TNF $\alpha$  y alcanzó su nivel mínimo a los 15 min, tras lo cual se mantuvo estable (Fig. 2C).

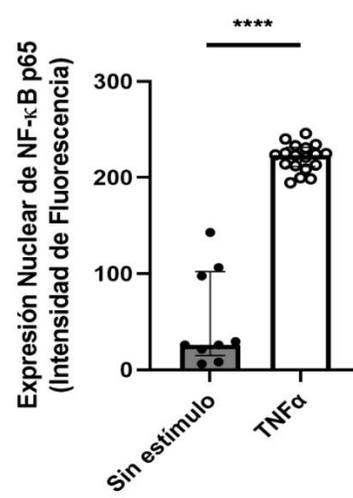
**A**



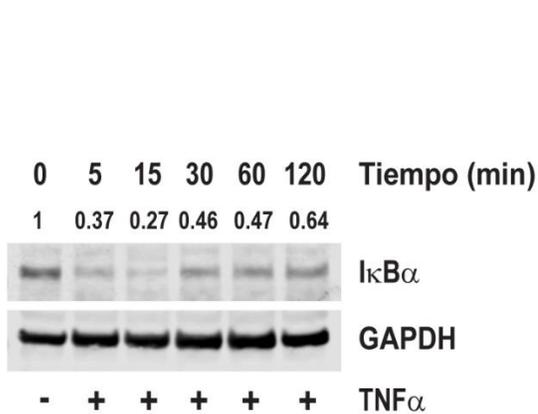
**B**



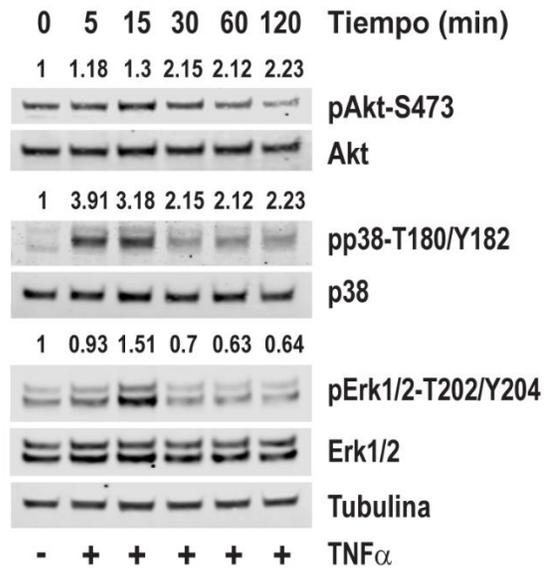
**C**



**D**



**E**



---

**Fig. 2 TNF $\alpha$  activa NF- $\kappa$ B, Akt y MAPKs (Erk1/2 y p38) en HAECs.** **A** TNF $\alpha$  activa NF- $\kappa$ B en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 5, 15, 30, 60, y 120 min. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de NF- $\kappa$ B pp65-S536 y los niveles de expresión de NF- $\kappa$ B p65 en las fracciones citoplásmica y nuclear. La pureza de ambas fracciones celulares se validó mediante el análisis de expresión de tubulina y lamina B1 por Western blot. **B-C** TNF $\alpha$  induce la traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B p65 en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 15 min. Se realizó inmunofluorescencia para visualizar NF- $\kappa$ B p65 y se obtuvieron imágenes de microscopía confocal. Se compararon las medianas con intervalo intercuartil de la intensidad de fluorescencia en el compartimiento nuclear entre ambas condiciones experimentales (\*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ). **D** TNF $\alpha$  promueve la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 5, 15, 30, 60, y 120 min. Se realizó Western blot para detectar los niveles de expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ . Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para GAPDH. **D** TNF $\alpha$  activa Akt y MAPKs (Erk1/2 y p38) en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 5, 15, 30, 60, y 120 min. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de pAkt-S473, pErk1/2-T202/Y204 y pp38-T180/Y182. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para las formas totales de Akt, Erk1/2 y p38, respectivamente, así como para tubulina.

---

TNF $\alpha$  activa diversas vías atípicas de señalización, como las MAPKs y PI3K/Akt, las cuales refuerzan sus efectos biológicos (75, 102, 130). Evaluamos la activación de moléculas transductores de señal inducidas por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min y se midió la fosforilación de pAkt-S473, pp38-T180/Y182 y pErk1/2-T202/Y204 por Western blot (Fig. 2D). Encontramos un discreto incremento en la fosforilación de pAkt-S473 después de 15 min de tratamiento con TNF $\alpha$ ; pp38-T180/Y182 se elevó tras 5 min de tratamiento con TNF $\alpha$  y mostró un pico en su expresión a los 15 min y pErk1/2-T202/Y204 mostró una tendencia al alza entre los 5 y los 15 min de tratamiento con TNF $\alpha$ , regresando a sus niveles basales a los 30 min (Fig. 2D). Por lo tanto, TNF $\alpha$  promueve la activación de las vías NF- $\kappa$ B/Akt/p38/Erk1/2, que potencialmente participan en la EndMT.

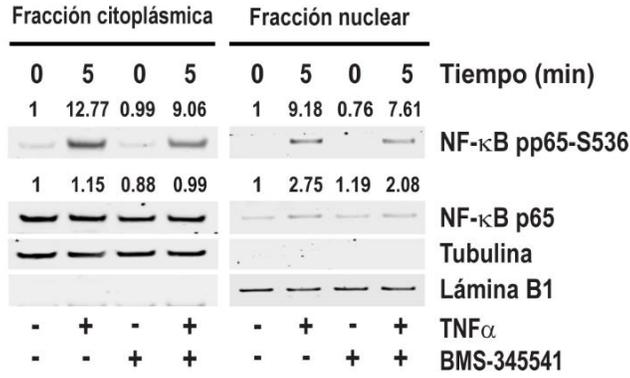
### **3. La inhibición de IKK $\beta$ interfiere con la activación NF- $\kappa$ B/Akt/Erk1/2 y la expresión de PTP1B inducidas por TNF $\alpha$ en HAECs.**

Tras observar que TNF $\alpha$  promueve EndMT a través de la activación de NF- $\kappa$ B p65, evaluamos si al interferir con la activación de NF- $\kappa$ B p65 a través de la inhibición de IKK $\beta$ , pueden afectarse la EndMT y la expresión de PTP1B inducidas por TNF $\alpha$ .

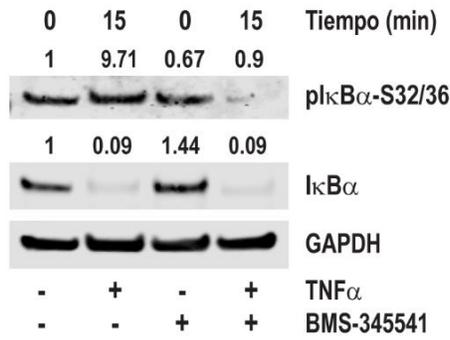
Empleamos el inhibidor específico de IKK $\beta$ , BMS-345541, para tratar las HAECs antes del estímulo con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 5 min. Evaluamos la activación de NF- $\kappa$ B mediante la fosforilación de NF- $\kappa$ B pp65-S536 tanto en el extracto citoplásmico como en el extracto nuclear de HAECs por Western blot (Fig. 3A). El estímulo con TNF $\alpha$  incrementó la fosforilación de NF- $\kappa$ B pp65-S536 en las fracciones citoplásmica y nuclear, así como la expresión nuclear de NF- $\kappa$ B p65. La presencia del 5  $\mu$ M BMS-345541 se asoció a una disminución en la fosforilación de NF- $\kappa$ B pp65-S536 inducida por TNF $\alpha$  en ambas fracciones proteicas (Fig. 3A).

Después determinamos el efecto de la inhibición de IKK $\beta$  en la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  por Western blot. Se estimularon las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 15 min y evaluamos la fosforilación de pI $\kappa$ B $\alpha$ -S32/36 y la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3B). El estímulo con TNF $\alpha$  incrementó la fosforilación de pI $\kappa$ B $\alpha$ -S32/36 y disminuyó la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3B, carril 2). La presencia de 5  $\mu$ M BMS-345541 disminuyó la fosforilación de pI $\kappa$ B $\alpha$ -S32/36 inducida por TNF $\alpha$  (Fig. 3B, carril 4). Aunque el BMS-345541 no previno la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  tras el estímulo con TNF $\alpha$ , su presencia incrementó la expresión basal de I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3B, carril 3).

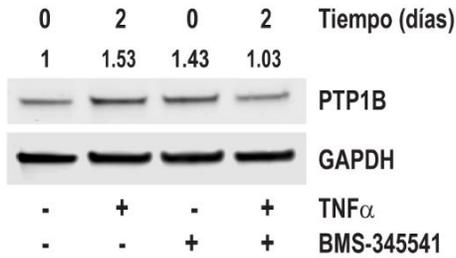
**A**



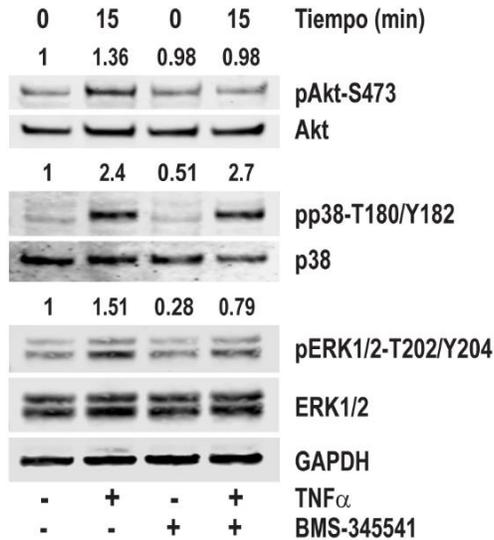
**B**



**C**



**D**



---

**Fig. 3 La inhibición de IKK $\beta$  atenúa la activación NF- $\kappa$ B/Akt/Erk1/2 y la expresión de PTP1B inducidas por TNF $\alpha$  en HAECs.** **A** La inhibición de IKK $\beta$  atenúa la activación NF- $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 5 min. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de NF- $\kappa$ B pp65-S536 y los niveles de expresión de NF- $\kappa$ B p65 en las fracciones citoplásmica y nuclear. La pureza de ambas fracciones proteicas se validó mediante el análisis de expresión de tubulina y lámina B1 por Western blot. **B** La inhibición de IKK $\beta$  disminuye la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ -S32/36 inducida por TNF $\alpha$  e incrementa I $\kappa$ B $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF por 0 y 15 min. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de pI $\kappa$ B $\alpha$ -S32/36 y los niveles de expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ . Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para GAPDH. **C** La inhibición de IKK $\beta$  disminuye la expresión de PTP1B inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 2 días. Se realizó Western blot para detectar los niveles de expresión de PTP1B. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para GAPDH. **D** La inhibición de IKK $\beta$  disminuye la activación de Akt y Erk1/2 inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 15 min. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de pAkt-S473, pErk1/2-T202/Y204 y pp38-T180/Y182. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para las formas totales de Akt, Erk1/2 y p38, respectivamente, así como para GAPDH.

---

Para investigar si la inhibición de IKK $\beta$  interfiere con la expresión de PTP1B inducida por TNF $\alpha$ , evaluamos el efecto de BMS-345541 en la expresión de PTP1B por Western blot (Fig. 3C). Se estimularon las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 2 días. Encontramos que el tratamiento con TNF $\alpha$  durante 2 días promovió un incremento en la expresión de PTP1B (Fig. 3C, carril 2). La presencia de 5  $\mu$ M BMS-345541 por sí solo incrementó la expresión basal de PTP1B (Fig. 3C, carril 3). La combinación de BMS-345541 con TNF $\alpha$  previno el incremento en la expresión de PTP1B promovido por TNF $\alpha$  (Fig. 3C, carril 4). Estos hallazgos sugieren que la expresión de PTP1B inducida por TNF $\alpha$  es dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B.

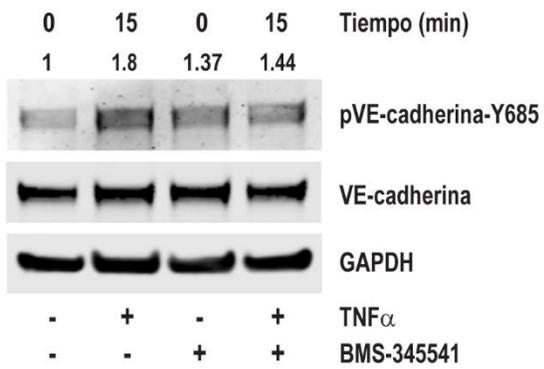
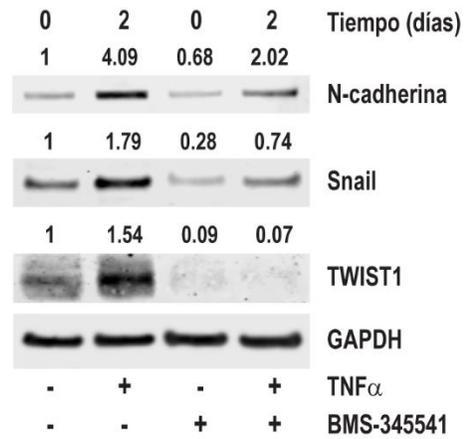
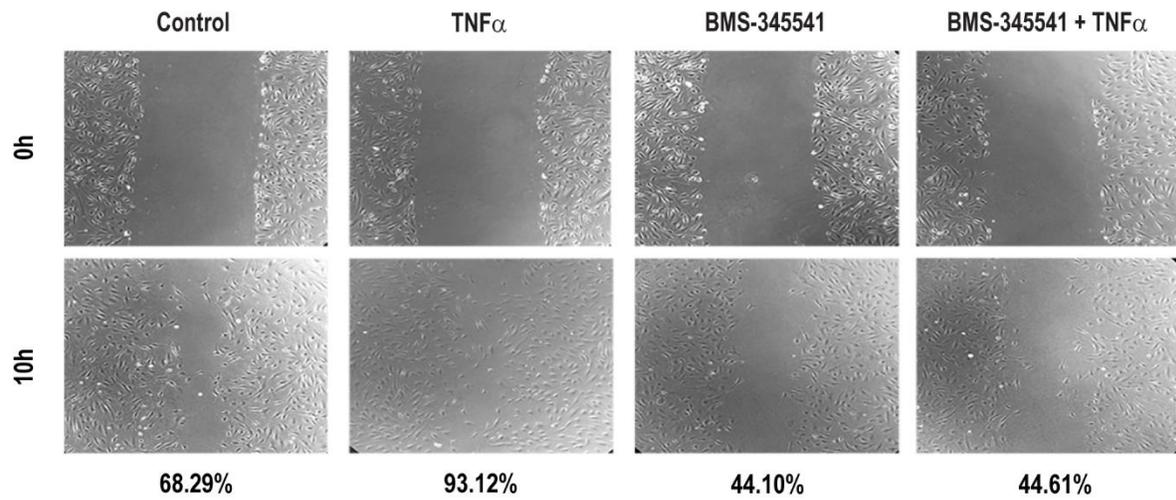
Finalmente, determinamos si la activación de NF- $\kappa$ B influye directamente en otras vías de señalización atípicas inducidas por TNF $\alpha$  potencialmente implicadas en EndMT. Se estimularon las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 15 min y se evaluó la fosforilación de pAkt-

S473, pp38-T180/Y182 y pErk1/2-T202/Y204 por Western blot (Fig. 3D). El tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$  incrementó la activación de Akt, p38 y Erk1/2. La presencia de 5  $\mu\text{M}$  BMS-345541 previno la fosforilación de pAkt-S473 y, en menor medida, de pErk1/2-T202/Y204. En contraste, la fosforilación de pp38-T180/Y182 inducida por  $\text{TNF}\alpha$  no se modificó en presencia de BMS-345541 (Fig. 3D). Por lo tanto, la inhibición de IKK $\beta$  disminuyó la activación de NF- $\kappa$ B/Akt/Erk1/2 y la expresión de PTP1B inducidas por  $\text{TNF}\alpha$ .

#### **4. La inhibición de IKK $\beta$ reduce la EndMT inducida por $\text{TNF}\alpha$ .**

Tras demostrar que la inhibición de IKK $\beta$  disminuye la activación de NF- $\kappa$ B/Akt/Erk1/2 y la expresión de PTP1B inducidas por  $\text{TNF}\alpha$ , nos planteamos si la inhibición de IKK $\beta$  también reduce la EndMT inducida por  $\text{TNF}\alpha$ .

Se trataron las HAECs con 5  $\mu\text{M}$  BMS-345541 antes del estímulo con 25 ng/mL  $\text{TNF}\alpha$  por 0 y 15 min. Se evaluó la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 por Western blot (Fig. 4A). El estímulo con  $\text{TNF}\alpha$  indujo la fosforilación pVE-cadherina-Y685 (Fig. 4A, carril 2). El tratamiento con 5  $\mu\text{M}$  BMS-345541 por sí sólo incrementó discretamente la pVE-cadherina-Y685 (Fig. 4A, carril 3). La combinación de BMS-345541 con  $\text{TNF}\alpha$  previno la inducción de pVE-cadherina-Y685 por  $\text{TNF}\alpha$ ; solamente se observó la fosforilación promovida por el BMS-345541 por sí solo (Fig. 4A, carril 4).

**A****B****C**

---

**Fig. 4 La inhibición de IKK $\beta$  reduce la EndMT inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. A** La inhibición de IKK $\beta$  inhibe la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 15 min. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de pVE-cadherina-Y685. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para VE-cadherina total y GAPDH. **B** La inhibición de IKK $\beta$  reduce la EndMT inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 2 días. Se realizó Western blot para detectar los niveles de expresión del marcador mesenquimal, N-cadherina, y los factores de transcripción, Snail y TWIST1. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para GAPDH. **C** La inhibición de IKK $\beta$  disminuye la migración celular promovida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se evaluó la migración celular en un ensayo de cierre de herida. Se trataron HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 10 h. Se adquirieron las imágenes en un microscopio de luz ECHO Lite.

---

Después evaluamos el efecto de la inhibición de IKK $\beta$  sobre la EndMT inducida por TNF $\alpha$ . Se trataron las HAECs con 5  $\mu$ M BMS-345541 antes del estímulo con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 2 días. Evaluamos la expresión del marcador mesenquimal, N-cadherina y los factores de transcripción, Snail y TWIST1, por Western blot (Fig. 4B). Encontramos que N-cadherina, Snail y TWIST1 incrementaron su expresión tras el tratamiento con TNF $\alpha$ . BMS-345541 por sí solo indujo la regulación a la baja de estas tres moléculas. La combinación de BMS-345541 con TNF $\alpha$  redujo el incremento de N-cadherina, Snail y TWIST1 inducido por TNF $\alpha$  (Fig. 4B).

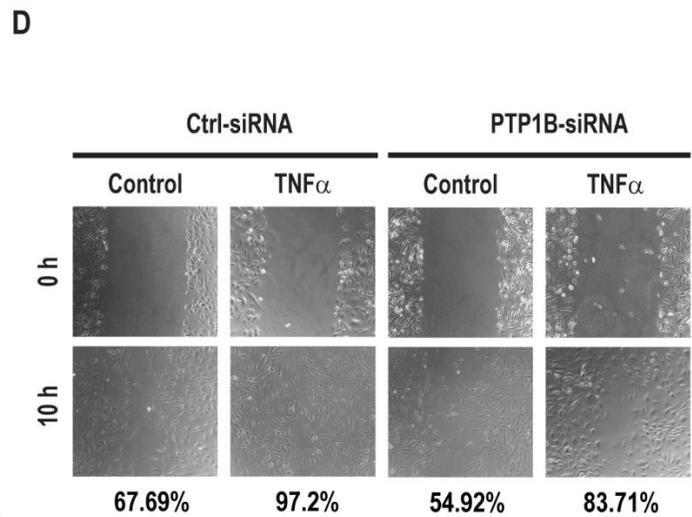
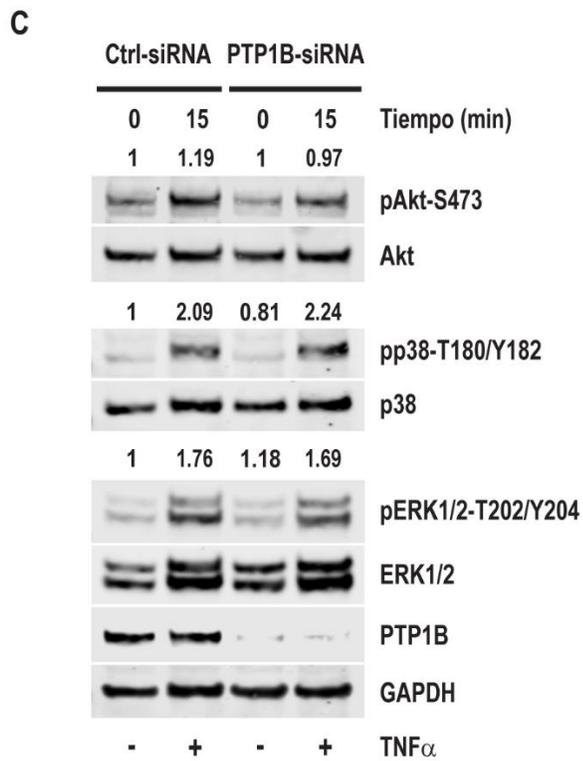
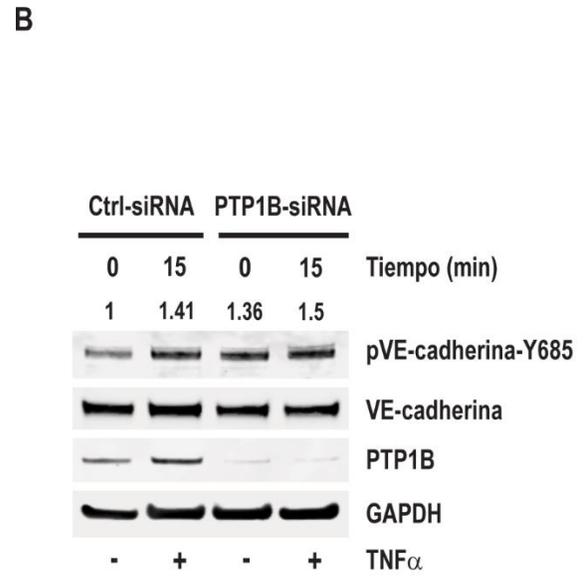
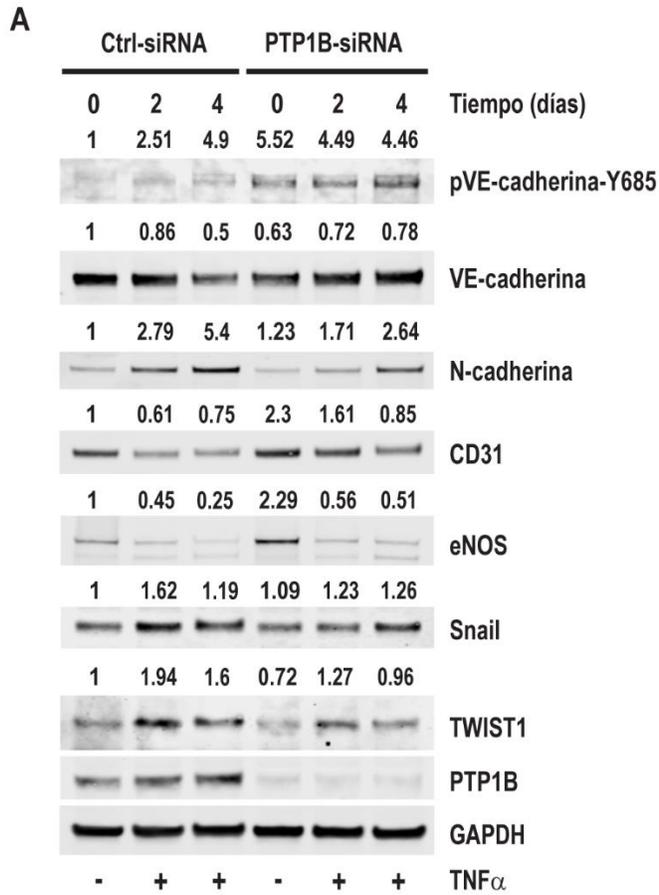
Por último, determinamos el efecto de la inhibición de IKK $\beta$  en la migración de HAECs en un ensayo de cierre de herida como una característica de la EndMT (Fig. 4C). Tratamos las HAECs con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 10 h. Observamos que las HAECs prácticamente cerraron la herida tras 10 h de tratamiento con TNF $\alpha$ , mientras que las células no tratadas mostraron un trazo remanente de la herida. La presencia de 5  $\mu$ M BMS-345541 retrasó el cierre de la herida tanto en células no estimuladas, como en células estimuladas con TNF $\alpha$  por 10 h (Fig. 4C). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la inhibición de IKK $\beta$  reduce la EndMT inducida por TNF $\alpha$ .

## 5. El silenciamiento de PTP1B disminuye la EndMT inducida por TNF $\alpha$ .

La EndMT inducida por TNF $\alpha$  se asoció a un incremento en los niveles de expresión de PTP1B. La EndMT y la expresión de PTP1B inducidas por TNF $\alpha$  disminuyeron al inhibir NF- $\kappa$ B. Además, reportes previos indican que PTP1B modula la integridad del complejo de VE-cadherina manteniendo niveles bajos de fosforilación en residuos de pTyr (104, 156, 158). Nos planteamos evaluar el efecto del silenciamiento de PTP1B en la EndMT promovida por TNF $\alpha$  en HAECs.

Se estimularon las HAECs transfectadas con un siRNA contra PTP1B o un siRNA control negativo con 25 ng/mL TNF $\alpha$  durante 0, 2 y 4 días. Evaluamos la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 y la expresión de los marcadores endoteliales, VE-cadherina, CD31 y eNOS, el marcador mesenquimal, N-cadherina, y los factores de transcripción, Snail y TWIST1, por Western blot (Fig. 5A).

Encontramos que en las HAECs transfectadas con el siRNA control negativo, la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 se incrementó en función del tiempo. VE-cadherina, CD31 y eNOS disminuyeron su expresión en función del tiempo tras el tratamiento con TNF $\alpha$ . N-cadherina se incrementó en función del tiempo. La expresión de Snail y TWIST1 presentó un pico en su expresión tras 2 días de tratamiento con TNF $\alpha$ , con una discreta disminución en el día 4.



---

**Fig. 5 El silenciamiento de PTP1B disminuye la EndMT inducida por TNF $\alpha$  en HAECs.** **A** El silenciamiento de PTP1B reduce la EndMT inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs transfectadas con un siRNA contra PTP1B o un siRNA control negativo con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0, 2 y 4 días. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 y los niveles de expresión de los marcadores endoteliales, VE-cadherina, CD31 y eNOS, el marcador mesenquimal, N-cadherina, y los factores de transcripción, Snail y TWIST1. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para GAPDH. **B** El silenciamiento de PTP1B incrementa la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs transfectadas con un siRNA contra PTP1B o un siRNA control negativo, con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 15 min. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de pVE-cadherina-Y685. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para VE-cadherina total y GAPDH. **C** El silenciamiento de PTP1B tiene un papel limitado en la activación de Akt y MAPKs (p38 y Erk1/2) inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se estimularon HAECs transfectadas con un siRNA contra PTP1B o un siRNA control negativo, con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 15 min. Se realizó Western blot para detectar la fosforilación de pAkt-S473, pErk1/2-T202/Y204 y pp38-T180/Y182. Los niveles de expresión de proteína se normalizaron para las formas totales de Akt, Erk1/2 y p38, respectivamente, así como para GAPDH. **D** El silenciamiento de PTP1B disminuye la migración celular inducida por TNF $\alpha$  en HAECs. Se evaluó la migración celular en un ensayo de cierre de herida. Se estimularon HAECs transfectadas con un siRNA contra PTP1B o un siRNA control negativo con 25 ng/mL TNF $\alpha$  por 0 y 10 h. Se adquirieron las imágenes en un microscopio de luz ECHO Lite.

---

En contraste, en las HAECs silenciadas para PTP1B se observó un incremento en la fosforilación basal de pVE-cadherina-Y685, que se mantuvo prácticamente sin cambios tras el tratamiento con TNF $\alpha$ . Se observó un discreto incremento en la VE-cadherina total tras el tratamiento con TNF $\alpha$  en las HAECs silenciadas para PTP1B, lo que sugiere una reversión en su degradación durante la EndMT. El silenciamiento de PTP1B incrementó la expresión basal de CD31 y eNOS e incrementó los niveles de CD31 en respuesta a TNF $\alpha$  por 2 y 4 días y los niveles de eNOS en respuesta a TNF $\alpha$  por 4 días. Además, el silenciamiento de PTP1B también disminuyó los niveles de N-cadherina y TWIST1 en respuesta a TNF $\alpha$  por 2 y 4 días

y retrasó el pico en la expresión de Snail hasta el día 4 (Fig. 5A). Estos hallazgos indican que el silenciamiento de PTP1B previene parcialmente la EndMT inducida por  $TNF\alpha$ .

Después evaluamos la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 tras el tratamiento con  $TNF\alpha$  de manera temprana. Se estimularon las HAECs transfectadas con un siRNA contra PTP1B o un siRNA control negativo con 25 ng/mL  $TNF\alpha$  por 0 y 15 min. Evaluamos la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 por Western blot (Fig. 5B). Encontramos que la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 se incrementó en HAECs transfectadas con el siRNA control negativo tras el tratamiento con  $TNF\alpha$  (Fig. 5B, carril 2). En contraste, la fosforilación de pVE-cadherina-Y685 en las HAECs silenciadas para PTP1B presentó un incremento basal (Fig. 5B, carril 3) y un discreto aumento tras el tratamiento con  $TNF\alpha$  (Fig. 5B, carril 4).

Después evaluamos el efecto del silenciamiento de PTP1B en la activación de vías de señalización atípicas de  $TNF\alpha$  y potencialmente implicadas en EndMT. Se estimularon las HAECs transfectadas con un siRNA contra PTP1B o un siRNA control negativo con 25 ng/mL  $TNF\alpha$  por 0 y 15 min y se evaluó la fosforilación de pAkt-S473, pp38-T180/Y182 y pErk1/2-T202/Y204 por Western blot (Fig. 5C). El tratamiento con  $TNF\alpha$  incrementó la activación de Akt, p38 y Erk1/2 en HAECs transfectadas con el siRNA control. En contraste, el incremento en la fosforilación de pAkt-S473 y pErk1/2-T202/Y204 tras el tratamiento con  $TNF\alpha$  en HAECs silenciadas para PTP1B fue discretamente menor en comparación con las HAECs transfectadas con el siRNA control negativo. El incremento en la fosforilación de pp38-T180/Y182 en HAECs silenciadas para PTP1B tras el tratamiento con  $TNF\alpha$  se mantuvo prácticamente sin cambios en comparación con las HAECs transfectadas con el siRNA control negativo (Fig. 5C). Estos hallazgos sugieren que las vías de señalización de Akt, p38 y Erk1/2

tienen un papel limitado en la disminución de la EndMT inducida por  $\text{TNF}\alpha$  que observamos en ausencia de PTP1B.

Finalmente, evaluamos el efecto del silenciamiento de PTP1B en la migración de HAECs en un ensayo de cierre de herida como una característica de la EndMT (Fig. 5D). Se estimularon las HAECs transfectadas con un siRNA contra PTP1B o un siRNA control negativo con 25 ng/mL  $\text{TNF}\alpha$  por 0 y 10 h. Observamos que las HAECs transfectadas con el siRNA control negativo y estimuladas con  $\text{TNF}\alpha$  cerraron la herida a las 10 h de tratamiento en comparación con las células no estimuladas, que mostraron un trazo remanente de la herida. En contraste, las HAECs silenciadas para PTP1B mostraron un trazo remanente de la herida tras el tratamiento con  $\text{TNF}\alpha$  por 10 h, consistente con una migración disminuida (Fig. 5D). Por lo tanto, el silenciamiento de PTP1B disminuye la EndMT promovida por  $\text{TNF}\alpha$ .

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

La EndMT es un proceso biológico que representa el enlace entre la disfunción endotelial e inflamación y constituye un evento clave en la fisiopatogenia de la aterosclerosis y otras enfermedades relacionadas con fibrosis, vasculopatía e inflamación (8, 9, 13, 21, 24-26, 28, 31). Este fenómeno es promovido por muchos mediadores inflamatorios y están implicadas diversas vías de señalización, como NF- $\kappa$ B (10, 11). La fosfatasa de tirosina PTP1B se produce bajo condiciones inflamatorias y regula diferentes vías de señalización relacionadas con inflamación (129-131, 146, 147). También se ha implicado en la disfunción endotelial y aterosclerosis (160, 161, 165, 167, 168). Sin embargo, su participación en la EndMT promovida por inflamación hasta este momento resulta poco claro.

En el presente estudio, establecimos un modelo de EndMT inducido por TNF $\alpha$  en CEs humanas con el fin de determinar la posible implicación de PTP1B en este fenómeno. Nuestro modelo de EndMT se caracterizó por la regulación a la baja de los marcadores endoteliales, VE-cadherina, CD31 y eNOS, así como la regulación al alta del marcador mesenquimal, N-cadherina, y de los factores de transcripción relacionados a EndMT, Snail, TWIST1 y ZEB1. De manera concomitante, detectamos un incremento en los niveles de expresión de PTP1B. NF- $\kappa$ B y otras vías atípicas relacionadas con TNF $\alpha$ , como PI3K/Akt y las vías de MAPKs p38 y Erk1/2, se activaron de manera temprana durante este proceso. La inhibición de IKK $\beta$  atenuó la activación de estas vías de señalización y la EndMT promovidos por TNF $\alpha$ , así como el incremento en PTP1B. Además, el silenciamiento de PTP1B disminuyó la polarización de CEs hacia el fenotipo mesenquimal en condiciones inflamatorias.

Varios mediadores inflamatorios inducen EndMT a través de la activación de factores de transcripción asociados con EndMT, como Snail, ZEB1 y TWIST1 (9, 10). De acuerdo con lo anterior, en nuestro modelo *in vitro* TNF $\alpha$  promovió la EndMT a través de la activación de estos factores de transcripción, que favorecieron la regulación a la baja de marcadores endoteliales y la regulación al alta de marcadores mesenquimales. Observamos un pico en la expresión de Snail y ZEB1 de manera temprana durante la EndMT. Esto sugiere que Snail y ZEB1 son los principales inductores de la EndMT inducida por TNF $\alpha$ , que se activan de manera secuencial para favorecer la expresión de otros factores de transcripción relacionados a EndMT, tal cual ocurre en la EndMT inducida a través de la vía canónica de TGF $\beta$  (29, 50-53). De esta manera se favorece la cooperación témporo-espacial entre los factores de transcripción relacionados a EndMT para iniciar y mantener del proceso, como también se ha descrito entre Snail y TWIST1 en el fenómeno de la EMT (170). También observamos cambios morfológicos compatibles con el fenotipo mesenquimal y una capacidad migratoria incrementada en las CEs estimuladas con TNF $\alpha$ , características bien reconocidas de la EndMT (11, 171).

TNF $\alpha$  promovió la activación temprana de NF- $\kappa$ B y de otras vías de señalización potencialmente involucradas en EndMT, incluyendo PI3K/Akt y las vías de MAPKs p38 y Erk1/2. En efecto, la mayor invasividad y potencial migratorio del fenotipo mesenquimal que corroboramos en nuestro sistema (9, 13), pueden corresponder al incremento en el eje TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B/Snail, como se ha reportado en células tumorales (172, 173), así como a la activación de vías atípicas de señalización relacionadas con TNF $\alpha$ , incluyendo PI3K/Akt y la MAPK p38 (11, 104, 105).

La inhibición de IKK $\beta$  disminuyó la activación de NF- $\kappa$ B y de otras vías de señalización, como Akt y Erk1/2 MAPK, promovida por TNF $\alpha$ . En contraste, no observamos efecto sobre la activación de p38 MAPK. Esto concuerda con la participación de IKK $\beta$  en cooperación con TAK1 en la activación de la vía de las MAPKs, pero específicamente en la vía de Erk1/2 MAPK (99). La inhibición de IKK $\beta$  también previno la polarización hacia el fenotipo mesenquimal de CEs al atenuar la EndMT y la migración celular. Disminuyó el incremento de los factores de transcripción relacionados a EndMT, Snail y TWIST1, así como del marcador mesenquimal, N-cadherina. Nuestros hallazgos resultan consistentes con el efecto protector de la inhibición de NF- $\kappa$ B contra la disfunción endotelial y aterosclerosis (101, 108-111, 174-177), así como con el papel crucial de NF- $\kappa$ B en la EndMT inducida por inflamación (11, 75). En particular, se sabe que la expresión de TWIST1 está directamente regulada por NF- $\kappa$ B (178-180). La inhibición de IKK $\beta$  también disminuyó la fosforilación de VE-cadherina inducida por TNF $\alpha$ , lo cual confiere estabilidad al complejo de VE-cadherina en las uniones adherentes endoteliales para mantener la barrera endotelial (157, 159). No obstante, la inhibición de IKK $\beta$  por sí sola también incrementó los niveles basales de I $\kappa$ B $\alpha$  y aumentó discretamente la fosforilación de VE-cadherina. Esto podría corresponder a la activación de vías de señalización alternas al inhibir IKK $\beta$ , como la vía no canónica de NF- $\kappa$ B, la cual es dependiente de la activación de IKK $\alpha$  y también está implicada en la angiogénesis patológica y aterosclerosis, ambas relacionados con EndMT (83, 96, 113).

PTP1B regula muchas vías de señalización asociadas a diferentes citocinas proinflamatorias (129). Específicamente, PTP1B regula TNF $\alpha$  y la vía de NF- $\kappa$ B en diferentes tipos de células (146, 164, 181, 182). Encontramos que PTP1B incrementa sus niveles de

expresión durante la EndMT inducida por  $\text{TNF}\alpha$  y que disminuyen en presencia del inhibidor de  $\text{IKK}\beta$ . Esto concuerda con estudios previos que han reportado un incremento en la expresión de PTP1B tras el reclutamiento de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  a la región promotora de PTP1B inducido por  $\text{TNF}\alpha$  y otros estímulos inflamatorios (130, 131). Cabe señalar que la inhibición de  $\text{IKK}\beta$  por sí sola también aumentó los niveles de PTP1B, lo cual también puede corresponder a un incremento en su transcripción a través de la vía no canónica de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Esto podría estar asociado a la activación de  $\text{IKK}\alpha$  tras inhibir  $\text{IKK}\beta$  y a la subsecuente fosforilación de p100 por  $\text{IKK}\alpha$ , que favorece su proteólisis a  $\text{NF-}\kappa\text{B2 p52}$  (82, 83).

Como se ha descrito en otras células no inmunes, el silenciamiento de PTP1B disminuye la activación de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  (147, 181) con un efecto mínimo en otras vías asociadas a  $\text{TNF}\alpha$ , como lo observamos en nuestro sistema. Proponemos que PTP1B desfosforila residuos inhibitorios de pTyr en moléculas que regulan la activación del complejo IKK, como podría tratarse del proto-oncogén Src, que se ha postulado como sustrato de PTP1B en Y527 y que el aumento en su fosforilación previene la degradación de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (183). El incremento en la fosforilación de Src en Y527 también se relacionó con la disminución en la señalización mediada por fibronectina en fibroblastos embrionarios murinos inmortalizados deficientes en PTP1B (184).

El resultado de este efecto fue la reducción de la polarización de CEs silenciadas para PTP1B hacia el fenotipo mesenquimal a través de la disminución de la EndMT y la migración celular en condiciones inflamatorias. Aunque observamos un incremento basal en la fosforilación de VE-cadherina en Y685 en las CEs silenciadas para PTP1B y la fosforilación desestabiliza el complejo VE-cadherina (156, 158), en condiciones inflamatorias no

observamos un incremento en su fosforilación y los marcadores endoteliales incrementaron su expresión. Esto puede corresponder la disminución de NF- $\kappa$ B y de los factores de transcripción relacionados a EndoMT, como Snail y TWIST1, en ausencia de PTP1B. Se sabe que Src fosforila a VE-cadherina en Y685 para incrementar la permeabilidad vascular (151, 156), por lo que el efecto inhibitorio del silenciamiento de PTP1B sobre Src podría explicar también que la fosforilación de VE-cadherina en Y685 se mantenga prácticamente sin cambios en condiciones inflamatorias en ausencia de PTP1B.

Nuestros hallazgos son consistentes con reportes previos sobre el efecto de la deficiencia de PTP1B en la disfunción endotelial (167, 168). En contraste, Chen y cols encontraron que la inhibición de PTP1B en células tumorales promovió la EMT a través del incremento del eje MAPK p38/GSK3 $\beta$ /Snail. En nuestro sistema, no encontramos incremento de MAPK p38 ni de Snail (44). Además, Zhang y cols reportaron un incremento en la migración celular en respuesta al VEGF en CEs silenciadas para PTP1B (105). Estos hallazgos contrastantes pueden explicarse por nuestro modelo de EndMT inducido por TNF $\alpha$ , el cual es dependiente de la activación de NF- $\kappa$ B y su regulación por PTP1B. Por último, aunque se sabe que el estrés oxidativo asociado con inflamación inhibe la actividad de PTP1B (171), el incremento sostenido en sus niveles de expresión promovidos por NF- $\kappa$ B pueden explicar su efecto positivo durante la EndMT.

Dados nuestros hallazgos de que el silenciamiento de PTP1B disminuye la EndMT y que la EndMT representa un enlace entre la inflamación y la disfunción endotelial (21), el presente estudio favorece la evidencia actual del efecto de la terapia blanco contra PTP1B para prevenir disfunción endotelial y aterosclerosis (160, 165).

Aunque nuestro modelo es representativo de la EndMT promovida por  $\text{TNF}\alpha$  a través de la activación de NF- $\kappa$ B y otras vías de señalización, este fenómeno está influenciado *in vivo* por la interacción con otras citocinas proinflamatorias y sus vías asociadas. Además,  $\text{TNF}\alpha$  activa otras vías de señalización independientes de NF- $\kappa$ B, como la MAPK p38, potencialmente envueltas en EndMT y que no se modificaron al silenciar PTP1B (50, 185, 186). La MAPK p38 a su vez favorece la vía de NF- $\kappa$ B a nivel transcripcional (85).

Dentro de las limitaciones del presente estudio se encuentra la naturaleza *in vitro* de nuestro modelo que, aunque nos permitió caracterizar vías de señalización asociadas con  $\text{TNF}\alpha$  e implicadas en EndMT, excluye la influencia de otros mediadores inflamatorios y sus vías de señalización. En este sentido, no se exploraron otras citocinas inflamatorias que podrían tener efecto sinérgico con  $\text{TNF}\alpha$  ni otras vías de señalización potencialmente involucradas durante la EndMT, como la vía no canónica de NF- $\kappa$ B. No se analizó el efecto de la sobreexpresión de PTP1B en CEs en la EndMT inducida por  $\text{TNF}\alpha$ . Hace falta también caracterizar los sustratos específicos de PTP1B en la vía de NF- $\kappa$ B, como hemos postulado al proto-oncogén Src en Y527.

Como perspectivas, se deben caracterizar los sustratos de PTP1B en la vía de NF- $\kappa$ B mediante el empleo de una PTP1B mutante inactiva en CEs ante el estímulo inflamatorio. Se requieren más estudios para definir el papel en diversas condiciones patológicas en donde está involucrada la EndMT. Para estos estudios, se podría plantear un modelo animal de la enfermedad con ablación condicional del gen de PTP1B en el endotelio vascular y analizar su efecto en términos de fibrosis, vasculopatía e inflamación. Por último, se necesita la

generación de inhibidores específicos de PTP1B que pudieran complementar la terapia estándar actual para enfermedades en donde está implicada la EndMT.

En conclusión,  $TNF\alpha$  promueve la EndMT en CEs humanas a través de la activación temprana de las vías de señalización de NF- $\kappa$ B, PI3k/Akt y MAPKs (Erk1/2 y p38). PTP1B está involucrada en dicho proceso. Estos hallazgos desvelan un mecanismo crucial de disfunción endotelial asociada con inflamación y respaldan la evidencia actual sobre PTP1B como un posible nuevo blanco terapéutico en la aterosclerosis y otras condiciones patológicas asociadas con EndMT.

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- ❖  $\text{TNF}\alpha$  induce EndMT en CEs humanas a través de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  y otras vías atípicas relacionadas con  $\text{TNF}\alpha$ , como PI3K/Akt y MAPKs (p38 y Erk1/2). Dichas vías de señalización se activan de manera temprana durante la EndMT. Esto favorece la expresión de factores de transcripción relacionados a EndMT, como Snail, ZEB1 y TWIST1, que promueven la pérdida de marcadores endoteliales, como VE-cadherina, CD31 y eNOS, así como el incremento en la expresión de marcadores mesenquimales, como N-cadherina.
- ❖ De manera concomitante a la EndMT inducida por  $\text{TNF}\alpha$  en CEs humanas, PTP1B incrementa sus niveles de expresión. El incremento en PTP1B inducido por  $\text{TNF}\alpha$  en CEs humanas durante la EndMT es dependiente de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ .
- ❖ PTP1B favorece la EndMT inducida por  $\text{TNF}\alpha$  en CEs humanas a través de la expresión de factores de transcripción relacionados con EndMT y el incremento en la fosforilación de VE-cadherina.
- ❖ PTP1B participa en la EndMT inducida por inflamación en CEs humanas. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios previos que sugieren el papel de PTP1B en la disfunción endotelial inducida por inflamación, así como su posible implicación terapéutica en la aterosclerosis y otras condiciones patológicas asociadas con EndMT.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
2. Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 2015;209(1):13-22.
3. Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, Krenning G. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2018;114(4):565-77.
4. Chen PY, Schwartz MA, Simons M. Endothelial-to-Mesenchymal Transition, Vascular Inflammation, and Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:53.
5. Patel H, Zaghloul N, Lin K, Liu SF, Miller EJ, Ahmed M. Hypoxia-induced activation of specific members of the NF- $\kappa$ B family and its relevance to pulmonary vascular remodeling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;92:141-7.
6. Steyers CM, 3rd, Miller FJ, Jr. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):11324-49.
7. Lai B, Li Z, He M, Wang Y, Chen L, Zhang J, et al. Atheroprone flow enhances the endothelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315(5):H1293-H303.
8. Li Y, Lui KO, Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):445-56.
9. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1281-324.
10. Perez L, Munoz-Durango N, Riedel CA, Echeverria C, Kalergis AM, Cabello-Verrugio C, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;33:41-54.
11. Adjuto-Saccone M, Soubeyran P, Garcia J, Audebert S, Camoin L, Rubis M, et al. TNF- $\alpha$  induces endothelial-mesenchymal transition promoting stromal development of pancreatic adenocarcinoma. *Cell Death Dis.* 2021;12(7):649.
12. Good RB, Gilbane AJ, Trinder SL, Denton CP, Coghlan G, Abraham DJ, et al. Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Pathol.* 2015;185(7):1850-8.
13. Platel V, Faure S, Corre I, Clere N. Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT): Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance. *J Oncol.* 2019;2019:8361945.
14. Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res.* 1995;77(1):1-6.
15. Arciniegas E, Servin M, Arguello C, Mota M. Development of the aorta in the chick embryo: structural and ultrastructural study. *Atherosclerosis.* 1989;76(2-3):219-35.
16. Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci.* 1992;103 ( Pt 2):521-9.

17. Arciniegas E, Neves CY, Carrillo LM, Zambrano EA, Ramirez R. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. *Endothelium*. 2005;12(4):193-200.
18. Ma J, Sanchez-Duffhues G, Goumans MJ, Ten Dijke P. TGF-beta-Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:260.
19. Guo L, Mi JW, Zhang HC, Gao J, Zhang S, Li LX, et al. Endothelial-mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during wound healing and scarring. *J Cosmet Dermatol*. 2022.
20. Wagner JUG, Pham MD, Nicin L, Hammer M, Bottermann K, Yuan T, et al. Dissection of heterocellular cross-talk in vascularized cardiac tissue mimetics. *J Mol Cell Cardiol*. 2020;138:269-82.
21. Cho JG, Lee A, Chang W, Lee MS, Kim J. Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Front Immunol*. 2018;9:294.
22. Alvandi Z, Bischoff J. Endothelial-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(9):2357-69.
23. Li ZX, Chen JX, Zheng ZJ, Cai WJ, Yang XB, Huang YY, et al. TGF-beta1 promotes human breast cancer angiogenesis and malignant behavior by regulating endothelial-mesenchymal transition. *Front Oncol*. 2022;12:1051148.
24. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Pechoux C, Bogaard HJ, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2015;131(11):1006-18.
25. Di Benedetto P, Ruscitti P, Berardicurti O, Vomero M, Navarini L, Dolo V, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2021;205(1):12-27.
26. Manetti M, Romano E, Rosa I, Guiducci S, Bellando-Randone S, De Paulis A, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(5):924-34.
27. Lai YJ, Tsai FC, Chang GJ, Chang SH, Huang CC, Chen WJ, et al. miR-181b targets semaphorin 3A to mediate TGF-beta-induced endothelial-mesenchymal transition related to atrial fibrillation. *J Clin Invest*. 2022;132(13).
28. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*. 2007;13(8):952-61.
29. Cheng W, Li X, Liu D, Cui C, Wang X. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Role in Cardiac Fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2021;26(1):3-11.
30. Guan G, Xie J, Dai Y, Han H. TFPI2 suppresses the interaction of TGF-beta2 pathway regulators to promote endothelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *J Biol Chem*. 2022;298(3):101725.
31. Giordo R, Ahmed YMA, Allam H, Abusnana S, Pappalardo L, Nasrallah GK, et al. EndMT Regulation by Small RNAs in Diabetes-Associated Fibrotic Conditions: Potential Link With Oxidative Stress. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:683594.
32. Pieterse E, Rother N, Garsen M, Hofstra JM, Satchell SC, Hoffmann M, et al. Neutrophil Extracellular Traps Drive Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(7):1371-9.

33. Orenstein JM, Shulman ST, Fox LM, Baker SC, Takahashi M, Bhatti TR, et al. Three linked vasculopathic processes characterize Kawasaki disease: a light and transmission electron microscopic study. *PLoS One*. 2012;7(6):e38998.
34. He M, Chen Z, Martin M, Zhang J, Sangwung P, Woo B, et al. miR-483 Targeting of CTGF Suppresses Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Therapeutic Implications in Kawasaki Disease. *Circ Res*. 2017;120(2):354-65.
35. Li C, Kuemmerle JF. Mechanisms that mediate the development of fibrosis in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(7):1250-8.
36. Sadler T, Scarpa M, Rieder F, West G, Stylianou E. Cytokine-induced chromatin modifications of the type I collagen alpha 2 gene during intestinal endothelial-to-mesenchymal transition. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(7):1354-64.
37. Derada Troletti C, de Goede P, Kamermans A, de Vries HE. Molecular alterations of the blood-brain barrier under inflammatory conditions: The role of endothelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(3):452-60.
38. Derada Troletti C, Fontijn RD, Gowing E, Charabati M, van Het Hof B, Didouh I, et al. Inflammation-induced endothelial to mesenchymal transition promotes brain endothelial cell dysfunction and occurs during multiple sclerosis pathophysiology. *Cell Death Dis*. 2019;10(2):45.
39. Sun Z, Zhao H, Fang D, Davis CT, Shi DS, Lei K, et al. Neuroinflammatory disease disrupts the blood-CNS barrier via crosstalk between proinflammatory and endothelial-to-mesenchymal-transition signaling. *Neuron*. 2022;110(19):3106-20 e7.
40. Miyazono K, Katsuno Y, Koinuma D, Ehata S, Morikawa M. Intracellular and extracellular TGF-beta signaling in cancer: some recent topics. *Front Med*. 2018;12(4):387-411.
41. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):155-66.
42. Qin Q, Xu Y, He T, Qin C, Xu J. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res*. 2012;22(1):90-106.
43. Ma J, van der Zon G, Goncalves M, van Dinther M, Thorikay M, Sanchez-Duffhues G, et al. TGF-beta-Induced Endothelial to Mesenchymal Transition Is Determined by a Balance Between SNAIL and ID Factors. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:616610.
44. Chen C, Li S, Xue J, Qi M, Liu X, Huang Y, et al. PD-L1 tumor-intrinsic signaling and its therapeutic implication in triple-negative breast cancer. *JCI Insight*. 2021;6(8).
45. Xiong J, Kawagishi H, Yan Y, Liu J, Wells QS, Edmunds LR, et al. A Metabolic Basis for Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Mol Cell*. 2018;69(4):689-98 e7.
46. Sanchez-Duffhues G, Garcia de Vinuesa A, van de Pol V, Geerts ME, de Vries MR, Janson SGT, et al. Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2. *J Pathol*. 2018.
47. Man S, Sanchez Duffhues G, Ten Dijke P, Baker D. The therapeutic potential of targeting the endothelial-to-mesenchymal transition. *Angiogenesis*. 2019;22(1):3-13.
48. Yoshimatsu Y, Wakabayashi I, Kimuro S, Takahashi N, Takahashi K, Kobayashi M, et al. TNF-alpha enhances TGF-beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition via TGF-beta signal augmentation. *Cancer Sci*. 2020;111(7):2385-99.
49. Sabbineni H, Verma A, Somanath PR. Isoform-specific effects of transforming growth factor beta on endothelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Physiol*. 2018;233(11):8418-28.

50. Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor-beta2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J.* 2011;437(3):515-20.
51. Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, et al. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39209-16.
52. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007;7(6):415-28.
53. Thuault S, Tan EJ, Peinado H, Cano A, Heldin CH, Moustakas A. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2008;283(48):33437-46.
54. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 3):499-511.
55. Li Z, Chen B, Dong W, Kong M, Fan Z, Yu L, et al. MKL1 promotes endothelial-to-mesenchymal transition and liver fibrosis by activating TWIST1 transcription. *Cell Death Dis.* 2019;10(12):899.
56. Zhang W, Chen G, Ren JG, Zhao YF. Bleomycin induces endothelial mesenchymal transition through activation of mTOR pathway: a possible mechanism contributing to the sclerotherapy of venous malformations. *Br J Pharmacol.* 2013;170(6):1210-20.
57. Shen C, Jiang Y, Li Q, Liu C, Hu F, Li M. Bone morphogenetic protein-7 inhibits endothelial-to-mesenchymal transition in primary human umbilical vein endothelial cells and mouse model of systemic sclerosis via Akt/mTOR/p70S6K pathway. *J Dermatol Sci.* 2021;103(2):82-92.
58. Qi Q, Mao Y, Tian Y, Zhu K, Cha X, Wu M, et al. Geniposide inhibited endothelial-mesenchymal transition via the mTOR signaling pathway in a bleomycin-induced scleroderma mouse model. *Am J Transl Res.* 2017;9(3):1025-36.
59. Li Z, Jimenez SA. Protein kinase Cdelta and c-Abl kinase are required for transforming growth factor beta induction of endothelial-mesenchymal transition in vitro. *Arthritis Rheum.* 2011;63(8):2473-83.
60. Wermuth PJ, Li Z, Mendoza FA, Jimenez SA. Stimulation of Transforming Growth Factor-beta1-Induced Endothelial-To-Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis by Endothelin-1 (ET-1): A Novel Profibrotic Effect of ET-1. *PLoS One.* 2016;11(9):e0161988.
61. Cipriani P, Di Benedetto P, Ruscitti P, Capece D, Zazzeroni F, Liakouli V, et al. The Endothelial-mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis Is Induced by Endothelin-1 and Transforming Growth Factor-beta and May Be Blocked by Macitentan, a Dual Endothelin-1 Receptor Antagonist. *J Rheumatol.* 2015;42(10):1808-16.
62. Bochenek ML, Leidinger C, Rosinus NS, Gogiraju R, Guth S, Hobohm L, et al. Activated Endothelial TGFbeta1 Signaling Promotes Venous Thrombus Nonresolution in Mice Via Endothelin-1: Potential Role for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circ Res.* 2020;126(2):162-81.
63. Yin Q, Wang W, Cui G, Nan H, Yan L, Zhang W, et al. The expression levels of Notch-related signaling molecules in pulmonary microvascular endothelial cells in bleomycin-induced rat pulmonary fibrosis. *Physiol Res.* 2017;66(2):305-15.
64. Guan S, Zhou J. CXCR7 attenuates the TGF-beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis. *Mol Biosyst.* 2017;13(10):2116-24.

65. Lam AP, Gottardi CJ. beta-catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(6):562-7.
66. Lipphardt M, Dihazi H, Jeon NL, Dadafarin S, Ratliff BB, Rowe DW, et al. Dickkopf-3 in aberrant endothelial secretome triggers renal fibroblast activation and endothelial-mesenchymal transition. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(1):49-62.
67. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun*. 2012;3:735.
68. Aisagbonhi O, Rai M, Ryzhov S, Atria N, Feoktistov I, Hatzopoulos AK. Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition. *Dis Model Mech*. 2011;4(4):469-83.
69. Li L, Chen L, Zang J, Tang X, Liu Y, Zhang J, et al. C3a and C5a receptor antagonists ameliorate endothelial-myofibroblast transition via the Wnt/beta-catenin signaling pathway in diabetic kidney disease. *Metabolism*. 2015;64(5):597-610.
70. Wei J, Fang F, Lam AP, Sargent JL, Hamburg E, Hinchcliff ME, et al. Wnt/beta-catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2734-45.
71. Lee WJ, Park JH, Shin JU, Noh H, Lew DH, Yang WI, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition induced by Wnt 3a in keloid pathogenesis. *Wound Repair Regen*. 2015;23(3):435-42.
72. Li Z, Wermuth PJ, Benn BS, Lisanti MP, Jimenez SA. Caveolin-1 deficiency induces spontaneous endothelial-to-mesenchymal transition in murine pulmonary endothelial cells in vitro. *Am J Pathol*. 2013;182(2):325-31.
73. Yang JH, Wylie-Sears J, Bischoff J. Opposing actions of Notch1 and VEGF in post-natal cardiac valve endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(3):512-6.
74. Correia AC, Moonen JR, Brinker MG, Krenning G. FGF2 inhibits endothelial-mesenchymal transition through microRNA-20a-mediated repression of canonical TGF-beta signaling. *J Cell Sci*. 2016;129(3):569-79.
75. Mahler GJ, Farrar EJ, Butcher JT. Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(1):121-30.
76. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science*. 1985;230(4726):630-2.
77. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:411-52.
78. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):984-1010.
79. Webster JD, Vucic D. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:365.
80. Varfolomeev E, Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*. 2018;101:26-32.
81. Chou KC, Elrod DW. Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins*. 1999;34(1):137-53.
82. Liu P, Li Y, Wang W, Bai Y, Jia H, Yuan Z, et al. Role and mechanisms of the NF-kB signaling pathway in various developmental processes. *Biomed Pharmacother*. 2022;153:113513.
83. Sun SC. The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(9):545-58.

84. Zarnegar B, Yamazaki S, He JQ, Cheng G. Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3503-8.
85. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.
86. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11778-83.
87. Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshayes K, et al. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 2008;283(36):24295-9.
88. Ikeda F, Deribe YL, Skanland SS, Stieglitz B, Grabbe C, Franz-Wachtel M, et al. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis. *Nature*. 2011;471(7340):637-41.
89. Zhang T, Ma C, Zhang Z, Zhang H, Hu H. NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *MedComm (2020)*. 2021;2(4):618-53.
90. Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem*. 2004;279(25):26243-50.
91. Pflug KM, Sitcheran R. Targeting NF-kappaB-Inducing Kinase (NIK) in Immunity, Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22).
92. Allen IC, Wilson JE, Schneider M, Lich JD, Roberts RA, Arthur JC, et al. NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF-kappaB signaling. *Immunity*. 2012;36(5):742-54.
93. Hu H, Brittain GC, Chang JH, Puebla-Osorio N, Jin J, Zal A, et al. OTUD7B controls non-canonical NF-kappaB activation through deubiquitination of TRAF3. *Nature*. 2013;494(7437):371-4.
94. Razani B, Zarnegar B, Ytterberg AJ, Shiba T, Dempsey PW, Ware CF, et al. Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. *Sci Signal*. 2010;3(123):ra41.
95. Jin J, Xiao Y, Chang JH, Yu J, Hu H, Starr R, et al. The kinase TBK1 controls IgA class switching by negatively regulating noncanonical NF-kappaB signaling. *Nat Immunol*. 2012;13(11):1101-9.
96. Maijer KI, Noort AR, de Hair MJ, van der Leij C, van Zoest KP, Choi IY, et al. Nuclear Factor-kappaB-inducing Kinase Is Expressed in Synovial Endothelial Cells in Patients with Early Arthritis and Correlates with Markers of Inflammation: A Prospective Cohort Study. *J Rheumatol*. 2015;42(9):1573-81.
97. Noort AR, van Zoest KP, Weijers EM, Koolwijk P, Maracle CX, Novack DV, et al. NF-kappaB-inducing kinase is a key regulator of inflammation-induced and tumour-associated angiogenesis. *J Pathol*. 2014;234(3):375-85.
98. Walsh MC, Lee J, Choi Y. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev*. 2015;266(1):72-92.
99. Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol*. 2014;26(3):237-45.
100. Farrar EJ, Butcher JT. Heterogeneous susceptibility of valve endothelial cells to mesenchymal transformation in response to TNFalpha. *Ann Biomed Eng*. 2014;42(1):149-61.

101. Kim CW, Oh ET, Park HJ. A strategy to prevent atherosclerosis via TNF receptor regulation. *FASEB J.* 2021;35(3):e21391.
102. Sethi JK, Hotamisligil GS. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat Metab.* 2021;3(10):1302-12.
103. Fleenor BS, Marshall KD, Rippe C, Seals DR. Replicative aging induces endothelial to mesenchymal transition in human aortic endothelial cells: potential role of inflammation. *J Vasc Res.* 2012;49(1):59-64.
104. Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, Mehta D, Urao N, Kim HW, et al. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res.* 2008;102(10):1182-91.
105. Zhang Y, Li Q, Youn JY, Cai H. Protein Phosphotyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) in Calpain-dependent Feedback Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR2) in Endothelial Cells: IMPLICATIONS IN VEGF-DEPENDENT ANGIOGENESIS AND DIABETIC WOUND HEALING. *J Biol Chem.* 2017;292(2):407-16.
106. Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):9052-7.
107. Brown JD, Lin CY, Duan Q, Griffin G, Federation A, Paranal RM, et al. NF-kappaB directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. *Mol Cell.* 2014;56(2):219-31.
108. Nakayama A, Albarran-Juarez J, Liang G, Roquid KA, Iring A, Tonack S, et al. Disturbed flow-induced Gs-mediated signaling protects against endothelial inflammation and atherosclerosis. *JCI Insight.* 2020;5(23).
109. Simion V, Zhou H, Pierce JB, Yang D, Haemmig S, Tesmenitsky Y, et al. LncRNA VINAS regulates atherosclerosis by modulating NF-kappaB and MAPK signaling. *JCI Insight.* 2020;5(21).
110. Karunakaran D, Nguyen MA, Geoffrion M, Vreeken D, Lister Z, Cheng HS, et al. RIPK1 Expression Associates With Inflammation in Early Atherosclerosis in Humans and Can Be Therapeutically Silenced to Reduce NF-kappaB Activation and Atherogenesis in Mice. *Circulation.* 2021;143(2):163-77.
111. Meng B, Li Y, Ding Y, Xu X, Wang L, Guo B, et al. Myeloid-derived growth factor inhibits inflammation and alleviates endothelial injury and atherosclerosis in mice. *Sci Adv.* 2021;7(21).
112. Singh B, Kosuru R, Lakshmikanthan S, Sorci-Thomas MG, Zhang DX, Sparapani R, et al. Endothelial Rap1 (Ras-Association Proximate 1) Restricts Inflammatory Signaling to Protect From the Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(2):638-50.
113. Maracle CX, Agca R, Helder B, Meeuwsen JAL, Niessen HWM, Biessen EAL, et al. Noncanonical NF-kappaB signaling in microvessels of atherosclerotic lesions is associated with inflammation, atheromatous plaque morphology and myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2018;270:33-41.
114. Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, et al. Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene.* 2007;26(53):7445-56.
115. Jung KJ, Lee EK, Yu BP, Chung HY. Significance of protein tyrosine kinase/protein tyrosine phosphatase balance in the regulation of NF-kappaB signaling in the inflammatory process and aging. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(7):983-91.

116. Wei XM, Wumaier G, Zhu N, Dong L, Li CW, Xia JW, et al. Protein tyrosine phosphatase L1 represses endothelial-mesenchymal transition by inhibiting IL-1beta/NF-kappaB/Snail signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2020;41(8):1102-10.
117. Cho YC, Kim BR, Cho S. Protein tyrosine phosphatase PTPN21 acts as a negative regulator of ICAM-1 by dephosphorylating IKKbeta in TNF-alpha-stimulated human keratinocytes. *BMB Rep.* 2017;50(11):584-9.
118. Ha Thi HT, Choi SW, Kim YM, Kim HY, Hong S. Protein Tyrosine Phosphatase N2 Is a Positive Regulator of Lipopolysaccharide Signaling in Raw264.7 Cell through Derepression of Src Tyrosine Kinase. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162724.
119. Villamar-Cruz O, Loza-Mejia MA, Arias-Romero LE, Camacho-Arroyo I. Recent advances in PTP1B signaling in metabolism and cancer. *Biosci Rep.* 2021;41(11).
120. Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. PTP1B: a simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013;48(5):430-45.
121. Liu R, Mathieu C, Berthelet J, Zhang W, Dupret JM, Rodrigues Lima F. Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): From Structure to Clinical Inhibitor Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13).
122. Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem.* 1988;263(14):6722-30.
123. Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem.* 1988;263(14):6731-7.
124. Brown-Shimer S, Johnson KA, Lawrence JB, Johnson C, Bruskin A, Green NR, et al. Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5148-52.
125. Chernoff J, Schievella AR, Jost CA, Erikson RL, Neel BG. Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(7):2735-9.
126. Barford D, Keller JC, Flint AJ, Tonks NK. Purification and crystallization of the catalytic domain of human protein tyrosine phosphatase 1B expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1994;239(5):726-30.
127. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science.* 1999;283(5407):1544-8.
128. Klamann LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2000;20(15):5479-89.
129. Pike KA, Tremblay ML. TC-PTP and PTP1B: Regulating JAK-STAT signaling, controlling lymphoid malignancies. *Cytokine.* 2016;82:52-7.
130. Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14230-41.
131. MohammadTaghvaei N, Taheripak G, Taghikhani M, Meshkani R. Palmitate-induced PTP1B expression is mediated by ceramide-JNK and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation. *Cell Signal.* 2012;24(10):1964-70.
132. van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature.* 2003;423(6941):773-7.
133. Chen YY, Chu HM, Pan KT, Teng CH, Wang DL, Wang AH, et al. Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. *J Biol Chem.* 2008;283(50):35265-72.

134. Ravichandran LV, Chen H, Li Y, Quon MJ. Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol Endocrinol.* 2001;15(10):1768-80.
135. Dadke S, Cotteret S, Yip SC, Jaffer ZM, Haj F, Ivanov A, et al. Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat Cell Biol.* 2007;9(1):80-5.
136. Yip SC, Cotteret S, Chernoff J. Sumoylated protein tyrosine phosphatase 1B localizes to the inner nuclear membrane and regulates the tyrosine phosphorylation of emerin. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 2):310-6.
137. Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Tonks NK, Barford D. Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell.* 2000;6(6):1401-12.
138. Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, et al. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem.* 2001;276(51):47771-4.
139. Lu X, Malumbres R, Shields B, Jiang X, Sarosiek KA, Natkunam Y, et al. PTP1B is a negative regulator of interleukin 4-induced STAT6 signaling. *Blood.* 2008;112(10):4098-108.
140. Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J Biol Chem.* 2000;275(6):4283-9.
141. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell.* 2002;2(4):489-95.
142. Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, et al. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell.* 2002;2(4):497-503.
143. Krishnan N, Fu C, Pappin DJ, Tonks NK. H<sub>2</sub>S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci Signal.* 2011;4(203):ra86.
144. Wu J, Yang LJ, Zou DJ. Rosiglitazone attenuates tumor necrosis factor-alpha-induced protein-tyrosine phosphatase-1B production in HepG2 cells. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(1):28-34.
145. Grant L, Shearer KD, Czopek A, Lees EK, Owen C, Agouni A, et al. Myeloid-cell protein tyrosine phosphatase-1B deficiency in mice protects against high-fat diet and lipopolysaccharide-induced inflammation, hyperinsulinemia, and endotoxemia through an IL-10 STAT3-dependent mechanism. *Diabetes.* 2014;63(2):456-70.
146. Traves PG, Pardo V, Pimentel-Santillana M, Gonzalez-Rodriguez A, Mojena M, Rico D, et al. Pivotal role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the macrophage response to pro-inflammatory and anti-inflammatory challenge. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1125.
147. Yang L, Sun YY, Liu YR, Yin NN, Bu FT, Yu HX, et al. PTP1B promotes macrophage activation by regulating the NF-kappaB pathway in alcoholic liver injury. *Toxicol Lett.* 2020;319:11-21.
148. Dube N, Cheng A, Tremblay ML. The role of protein tyrosine phosphatase 1B in Ras signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(7):1834-9.
149. Liu H, Wu Y, Zhu S, Liang W, Wang Z, Wang Y, et al. PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2015;359(2):218-25.

150. Potter MD, Barbero S, Cheresh DA. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31906-12.
151. Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, Vilgrain I, et al. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene.* 2007;26(7):1067-77.
152. Guo M, Breslin JW, Wu MH, Gottardi CJ, Yuan SY. VE-cadherin and beta-catenin binding dynamics during histamine-induced endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(4):C977-84.
153. Hatanaka K, Simons M, Murakami M. Phosphorylation of VE-cadherin controls endothelial phenotypes via p120-catenin coupling and Rac1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(1):H162-72.
154. Jiao ZY, Wu J, Liu C, Wen B, Zhao WZ, Du XL. Type 3 muscarinic acetylcholine receptor stimulation is a determinant of endothelial barrier function and adherens junctions integrity: role of protein-tyrosine phosphatase 1B. *BMB Rep.* 2014;47(10):552-7.
155. Huo Z, Kong Y, Meng M, Cao Z, Zhou Q. Atorvastatin enhances endothelial adherens junctions through promoting VE-PTP gene transcription and reducing VE-cadherin-Y731 phosphorylation. *Vascul Pharmacol.* 2019;117:7-14.
156. Klomp JE, Shaaya M, Matsche J, Rebiai R, Aaron JS, Collins KB, et al. Time-Variant SRC Kinase Activation Determines Endothelial Permeability Response. *Cell Chem Biol.* 2019;26(8):1081-94 e6.
157. Weng J, Yu L, Chen Z, Su H, Yu S, Zhang Y, et al. beta-Catenin phosphorylation at Y654 and Y142 is crucial for high mobility group box-1 protein-induced pulmonary vascular hyperpermeability. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;127:174-84.
158. Gorji A, Toh PJY, Ong HT, Toh YC, Toyama Y, Kanchanawong P. Enhancement of Endothelialization by Topographical Features Is Mediated by PTP1B-Dependent Endothelial Adherens Junctions Remodeling. *ACS Biomater Sci Eng.* 2021;7(6):2661-75.
159. Ninchoji T, Love DT, Smith RO, Hedlund M, Vestweber D, Sessa WC, et al. eNOS-induced vascular barrier disruption in retinopathy by c-Src activation and tyrosine phosphorylation of VE-cadherin. *Elife.* 2021;10.
160. Wang Y, Yan F, Zhang W, Pang S, Jiang F. Inhibiting Protein Tyrosine Phosphatase 1B to Improve Regenerative Functions of Endothelial Cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2018;71(2):59-64.
161. Abdelsalam SS, Korashy HM, Zeidan A, Agouni A. The Role of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP)-1B in Cardiovascular Disease and Its Interplay with Insulin Resistance. *Biomolecules.* 2019;9(7).
162. Agouni A, Tual-Chalot S, Chalopin M, Duluc L, Mody N, Martinez MC, et al. Hepatic protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) deficiency protects against obesity-induced endothelial dysfunction. *Biochem Pharmacol.* 2014;92(4):607-17.
163. Herren DJ, Norman JB, Anderson R, Tremblay ML, Huby AC, Belin de Chantemele EJ. Deletion of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Enhances Endothelial Cyclooxygenase 2 Expression and Protects Mice from Type 1 Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126866.
164. Huang T, Li X, Wang F, Lu L, Hou W, Zhu M, et al. The CREB/KMT5A complex regulates PTP1B to modulate high glucose-induced endothelial inflammatory factor levels in diabetic nephropathy. *Cell Death Dis.* 2021;12(4):333.

165. Thompson D, Morrice N, Grant L, Le Sommer S, Ziegler K, Whitfield P, et al. Myeloid protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) deficiency protects against atherosclerotic plaque formation in the ApoE(-/-) mouse model of atherosclerosis with alterations in IL10/AMPKalpha pathway. *Mol Metab.* 2017;6(8):845-53.
166. Thompson D, Morrice N, Grant L, Le Sommer S, Lees EK, Mody N, et al. Pharmacological inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B protects against atherosclerotic plaque formation in the LDLR(-/-) mouse model of atherosclerosis. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(20):2489-501.
167. Zhang C, Zhou T, Chen Z, Yan M, Li B, Lv H, et al. Coupling of Integrin alpha5 to Annexin A2 by Flow Drives Endothelial Activation. *Circ Res.* 2020;127(8):1074-90.
168. Zhang Y, Guan Q, Wang Z. PTP1B inhibition ameliorates inflammatory injury and dysfunction in ox-LDL-induced HUVECs by activating the AMPK/SIRT1 signaling pathway via negative regulation of KLF2. *Exp Ther Med.* 2022;24(1):467.
169. Diep S, Maddukuri M, Yamauchi S, Geshow G, Delk NA. Interleukin-1 and Nuclear Factor Kappa B Signaling Promote Breast Cancer Progression and Treatment Resistance. *Cells.* 2022;11(10).
170. Tran DD, Corsa CA, Biswas H, Aft RL, Longmore GD. Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence. *Mol Cancer Res.* 2011;9(12):1644-57.
171. Chamorro ME, Maltaner R, Schiappacasse A, Nesse A, Vittori D. Role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the increased sensitivity of endothelial cells to a promigratory effect of erythropoietin in an inflammatory environment. *Biol Chem.* 2020;401(10):1167-80.
172. Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 2010;102(4):639-44.
173. Lim YX, Lin H, Chu T, Lim YP. WBP2 promotes BTRC mRNA stability to drive migration and invasion in triple-negative breast cancer via NF-kappaB activation. *Mol Oncol.* 2022;16(2):422-46.
174. Wang J, Xu X, Li P, Zhang B, Zhang J. HDAC3 protects against atherosclerosis through inhibition of inflammation via the microRNA-19b/PPARgamma/NF-kappaB axis. *Atherosclerosis.* 2021;323:1-12.
175. Nan S, Wang Y, Xu C, Wang H. Interfering microRNA-410 attenuates atherosclerosis via the HDAC1/KLF5/IKBalpha/NF-kappaB axis. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021;24:646-57.
176. Chien CS, Li JY, Chien Y, Wang ML, Yarmishyn AA, Tsai PH, et al. METTL3-dependent N(6)-methyladenosine RNA modification mediates the atherogenic inflammatory cascades in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(7).
177. Ward AO, Angelini GD, Caputo M, Evans PC, Johnson JL, Suleiman MS, et al. NF-kappaB inhibition prevents acute shear stress-induced inflammation in the saphenous vein graft endothelium. *Sci Rep.* 2020;10(1):15133.
178. Pires BR, Mencialha AL, Ferreira GM, de Souza WF, Morgado-Diaz JA, Maia AM, et al. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169622.
179. Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res.* 2012;72(5):1290-300.

180. Lv N, Shan Z, Gao Y, Guan H, Fan C, Wang H, et al. Twist1 regulates the epithelial-mesenchymal transition via the NF-kappaB pathway in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine*. 2016;51(3):469-77.
181. Taheripak G, Bakhtiyari S, Rajabibazl M, Pasalar P, Meshkani R. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition ameliorates palmitate-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:1435-46.
182. Nasimian A, Taheripak G, Gorgani-Firuzjaee S, Sadeghi A, Meshkani R. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) modulates palmitate-induced cytokine production in macrophage cells. *Inflamm Res*. 2013;62(2):239-46.
183. Song GJ, Jung M, Kim JH, Park H, Rahman MH, Zhang S, et al. A novel role for protein tyrosine phosphatase 1B as a positive regulator of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):86.
184. Cheng A, Bal GS, Kennedy BP, Tremblay ML. Attenuation of adhesion-dependent signaling and cell spreading in transformed fibroblasts lacking protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem*. 2001;276(28):25848-55.
185. Luan Z, Hu B, Wu L, Jin S, Ma X, Zhang J, et al. Unfractionated Heparin Alleviates Human Lung Endothelial Barrier Dysfunction Induced by High Mobility Group Box 1 Through Regulation of P38-GSK3beta-Snail Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(5):1907-18.
186. Gong L, Lei Y, Liu Y, Tan F, Li S, Wang X, et al. Vaccarin prevents ox-LDL-induced HUVEC EndMT, inflammation and apoptosis by suppressing ROS/p38 MAPK signaling. *Am J Transl Res*. 2019;11(4):2140-54.

# ANEXOS :

## I. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### CULTIVO CELULAR

**Medio de cultivo endotelial.** A cada botella de medio de cultivo endotelial EBM-2 (No. cat. CC-3156; Lonza, Basilea, Suiza) de 500 mL se le extrajeron 25 mL. Dicho volumen se reemplazó con suero bovino fetal, para una concentración final del 5%. Se añadieron las “SingleQuotes” endoteliales EGM-2 (No. cat. CC4147; Lonza, Basilea, Suiza), que contienen: 3 ng/mL EGF, 25.5 µg/mL ácido ascórbico, 20 ng/mL VEGF, 4 ng/mL FGF y 20 ng/mL IGF-1, además de 30 µg/mL gentamicina y 15 ng/mL anfotericina-B. Se almacenó a 4 °C.

**0.2% Gelatina porcina.** Se disolvieron 0.1 g de gelatina porcina (No. cat. G1890; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en 50 mL de agua estéril, para una concentración final al 0.2%. Se calentó la mezcla durante 15 seg en horno de microondas a alta potencia, agitando periódicamente hasta asegurar la completa disolución. Se filtró la mezcla con filtro para jeringa de 0.2 µm. Se almacenó a 4 °C.

**100 ng/µl TNF $\alpha$ .** Se reconstituyó el TNF $\alpha$  recombinante humano (No. cat. 300-01A; PeproTech, Rocky Hill, NJ) de 50 µg en 500 µL de 0.1% BSA, para una concentración final de 100 ng/µL. Se almacenaron alícuotas a -80 °C. Se prepararon soluciones de trabajo de 100 µL, diluyendo 10 µL de la solución a 100 ng/µL en 90 µL de 0.1% BSA, para una concentración final de 10 ng/µL. Se almacenaron a 4 °C durante menos de 1 mes.

**5  $\mu$ M BMS-345541.** Se reconstituyó el BMS-345541 (No. cat. 401840; Calbiochem/SigmaAldrich, St. Louis, MO) de 1 mg (peso molecular = 483.36 D o g/mol) en 413.8  $\mu$ L de DMSO, para una concentración final de 5 mM, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$1 \text{ mg} \left( \frac{1 \text{ mmol}}{483.36 \text{ mg}} \right) \left( \frac{1000 \text{ mL}}{5 \text{ mmol}} \right) = \left( \frac{1000 \text{ mL}}{2416.8} \right) = 0.4138 \text{ mL} = 413.8 \mu\text{L}$$

Se almacenaron alícuotas a -20 °C. Para realizar los experimentos, se prepararon soluciones de trabajo de 50  $\mu$ L diluyendo 10  $\mu$ L de la solución a 5 mM en 40  $\mu$ L de medio de cultivo endotelial, para una concentración final de 1 mM. Se almacenaron a 4 °C durante menos de 1 mes.

**50  $\mu$ M PTP1B-siRNA.** Se resuspendió el siRNA dirigido específicamente contra la PTP1B humana (sentido: 5'-GGAUUAACUACAUCAAGATT-3', antisentido: 5'-UCUUGAUGUAGUUUAAUCCGA-3') (No. cat.AM51331; Ambion/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) de 5 nmol en 100  $\mu$ L de agua estéril, para una concentración final de 50  $\mu$ M. Se almacenó a -20 °C. Para realizar los experimentos, se prepararon soluciones de trabajo de 10  $\mu$ L diluyendo 2  $\mu$ L de la solución a 50  $\mu$ M en 8  $\mu$ L de agua estéril, para una concentración final de 10  $\mu$ M. Se eliminaron los volúmenes sobrantes.

## **WESTERN BLOT**

**1X Buffer de corrimiento.** Se diluyeron 50 mL de 20X buffer de corrimiento (No. cat. NP0002; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) en 950 mL de agua bidestilada, para una concentración final al 1X.

**1X Buffer de transferencia.** Se diluyeron 100 mL de 5X buffer de transferencia (No. cat. NP0002; Thermo Scientific, St. Louis, MO) en 300 mL de agua bidestilada y 100 mL de 100% etanol, para una concentración final al 1X.

**0.1% PBS-Tween.** Se diluyó 1 mL de Tween 20 (No. cat. 11TWEEN202; MP Biomedicals, Solon, OH) en 1 L de PBS, para una concentración final al 0.1%.

**5% BSA.** Se pesaron 1.5 g de BSA (No. cat. A9418-500G; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se añadieron 10 mL de PBS-Tween. Se agitó la mezcla mediante vórtex hasta asegurar la completa disolución. Se completó el volumen total de 30 mL de PBS-Tween, para una concentración final al 5%. Se almacenó a 4 °C.

**5% Leche.** Se pesaron 2.5 g de leche descremada y se añadieron 10 mL de PBS-Tween. Se agitó la mezcla mediante vórtex hasta asegurar la completa disolución. Se completó el volumen total de 50 mL de PBS-Tween, para una concentración final al 5%. Se almacenó a 4 °C.

## **INMUNOFLUORESCENCIA**

**0.2% Tritón X-100.** Se diluyeron 50  $\mu$ L de Tritón X-100 (No. cat. 9036-19-5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en 25 mL de PBS, para una concentración final al 0.2%. Se almacenó a temperatura ambiente.

**0.2% Gelatina porcina.** Se disolvieron 0.1 g de gelatina porcina (No. cat. G1890; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en 50 mL de agua estéril, para una concentración final al 0.2%. Se calentó la mezcla durante 15 seg en horno de microondas a alta potencia, agitando periódicamente hasta asegurar la completa disolución. Se filtró la mezcla con filtro para jeringa de 0.2  $\mu$ m. Se almacenó a 4 °C.

ANEXOS :  
II. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

**Resumen presentado en el congreso anual del Colegio Americano de Reumatología (ACR, del inglés *American College of Rheumatology*) 2020, modalidad virtual, a manera de póster.**

ABSTRACT NUMBER: 0290

Role of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) in Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT) Promoted by Inflammation: Implications for SLE

Jorge Romo-Tena<sup>1</sup>, José Esparza-López<sup>2</sup>, Carmelo Carmona-Rivera<sup>3</sup>, Luz Blanco<sup>4</sup>, Mariana Kaplan<sup>3</sup> and María de Jesús Ibarra-Sánchez<sup>2</sup>, <sup>1</sup>NIAMS, National Institute of Health, Bethesda, <sup>2</sup>INNSZ / UNAM-RAI, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup>National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, Bethesda, MD, <sup>4</sup>National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, Centreville

Meeting: ACR Convergence 2020

Keywords: Atherosclerosis, autoimmune diseases, cytokines, Inflammation, Systemic lupus erythematosus (SLE)

Background/Purpose: The endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) transdifferentiation process can be promoted by several proinflammatory mediators in many pathological conditions. Recently, it was suggested a crucial role of EndoMT in the pathogenesis of vasculopathy in systemic lupus erythematosus (SLE). However, it remains unclear which proinflammatory mediators and signaling pathways promote EndoMT. Phosphatase Tyrosine Protein 1B (PTP1B) regulates signaling pathways of proinflammatory cytokines that are known to be involved in EndoMT. Previous works have shown that type I Interferons (IFNs) are key players in the progression of vascular damage and atherogenesis in

SLE, but the role of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  in EndoMT remains to be investigated.

Objective: To elucidate the capacity of TNF- $\alpha$  as EndoMT inducer and the putative role of PTP1B in this process.

Methods: Human aortic endothelial cells (HAEC) and human glomerular microvascular endothelial cells (HGMVEC) were used as model for *in vitro* induction of EndoMT. These endothelial cells (ECs) lines were incubated with human recombinant TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) for 2 and 4 days. Expression of specific endothelial markers (eNOS, PECAM-1, VE-cadherin) and mesenchymal (SNAIL1, N-cadherin,  $\alpha$ -SMA) markers were analyzed by Western blot (WB). Canonical activation of TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B pathway in EndoMT was assessed by phosphorylation of p65-Ser536, degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and nuclear translocation of p65 by WB and immunofluorescence (IF), respectively. PTP1B expression changes during EndoMT were evaluated by WB. CRISPR-Cas9 gene editing assay will be performed to generate *PTPN1* knockdown ECs *in vitro* and corroborate its role in EndoMT.

Results: TNF- $\alpha$  induced EndoMT in both HAEC and HGMVEC by downregulation of endothelial markers (eNOS, PECAM-1, VE-cadherin) and upregulation of mesenchymal markers (SNAIL1, N-cadherin,  $\alpha$ -SMA). TNF- $\alpha$  induced phosphorylation of NF- $\kappa$ B (p65-Ser 536) and degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . Nuclear translocation of p65 was observed as early as 5 min after treatment and remained in the nucleus up to 1 h. TNF- $\alpha$ -induced EndoMT provoked an increase in PTP1B levels during the 4 days of EndoMT process. Additionally, PTP1B inhibition by CRISPR-Cas9 system is going to be investigated.

Conclusion: We established a model of TNF- $\alpha$ -induced EndoMT in the HAEC and HGMVEC endothelial cell lines. We observed decreased of endothelial markers and upregulation of mesenchymal markers. Concomitant with these changes of EndoMT markers, we found that PTP1B increases its expression. Furthermore, we found that NF- $\kappa$ B canonical signaling pathway is activated during this process. These findings unveil a putative important pathway in SLE vasculopathy and suggest novel avenues for intervention.

Romo-Tena J, Esparza-López J, Carmona-Rivera C, Blanco L, Kaplan M, Ibarra-Sánchez M. Role of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) in Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT) Promoted by Inflammation: Implications for SLE [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2020; 72 (suppl 10). <https://acrabstracts.org/abstract/role-of-protein-tyrosine-phosphatase-1b-ptp1b-in-endothelial-to-mesenchymal-transition-endomt-promoted-by-inflammation-implications-for-sle/>.

**Resumen presentado en el congreso anual del Colegio Americano de Reumatología (ACR, del inglés *American College of Rheumatology*) 2021, modalidad virtual, a manera de póster.**

ABSTRACT NUMBER: 0511

Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Modulates Endothelial-to-mesenchymal Transition and Increases Protein Tyrosine Phosphatase 1B

Jorge Romo-Tena<sup>1</sup>, José Esparza-Lopez<sup>2</sup>, Carmelo Carmona-Rivera<sup>3</sup>, Luz P blanco<sup>3</sup>, Mariana Kaplan<sup>4</sup> and María de Jesús Ibarra-Sánchez<sup>2</sup>, <sup>1</sup>INNSZ / NIAMS, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup>INNSZ, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup>NIAMS, Bethesda, MD, <sup>4</sup>National Institutes of Health, Bethesda, MD

Meeting: ACR Convergence 2021

Keywords: Atherosclerosis, cytokines, Inflammation, innate immunity, Tumor necrosis factor (TNF)

Background/Purpose: Endothelial dysfunction is a hallmark in the pathogenesis of many inflammatory diseases. The endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) is a process where endothelial cells lose their endothelial features and acquire fibroblast-like phenotype. EndoMT has been associated with vasculopathy, atherogenesis, and it is promoted by several proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) modulates many signaling pathways associated with inflammatory mediators and has been associated with endothelial dysfunction and cardiovascular disturbances. However, it remains unclear the role of PTP1B in TNF $\alpha$ -induced EndoMT.

Objective. To characterize EndoMT promoted by TNF- $\alpha$  in human endothelial cells (ECs) and the putative role of PTP1B in this process.

Methods: Human aortic endothelial cells (HAECs) were used as model for *in vitro* induction of EndoMT. These ECs were incubated with human recombinant TNF- $\alpha$  (25 ng/mL) for 2 and 4 days. Expression of endothelial markers (eNOS, CD31, VE-cadherin) and mesenchymal marker (N-cadherin), and the transcription factors SNAI1, TWIST1 and ZEB1 along with PTP1B during EndoMT were evaluated by Western blot (WB). Canonical NF- $\kappa$ B pathway activation in EndoMT was assessed by phosphorylation of p65-Ser536, degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  and nuclear translocation of p65 by WB and immunofluorescence (IF). Inhibition of NF- $\kappa$ B pathway was assessed by using the IKK- $\beta$  specific inhibitor BMS-345531 (5  $\mu$ M).

Results: HAECs underwent EndoMT after 2- and 4-days TNF- $\alpha$  treatment. Expression of eNOS, CD31 and VE-cadherin were downregulated, and N-cadherin was upregulated as well as the transcription factors SNAI1, TWIST1 and ZEB1. Concomitant with this process, PTP1B increased its expression levels. TNF- $\alpha$  induced phosphorylation of NF- $\kappa$ B (p65-Ser 536) and degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . Nuclear translocation of p65 was more evident 15 min after treatment. ECs pre-treated with BMS-345531 before TNF- $\alpha$  addition decreased TNF- $\alpha$ -induced phosphorylation of NF- $\kappa$ B (p65-Ser 536) and nuclear translocation of p65, and prevented degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . Furthermore, decreased expression of N-cadherin, SNAI1 and TWIST1 was observed after 2 days of treatment with BMS-345531 + TNF- $\alpha$ .

Conclusion: TNF- $\alpha$  promotes EndoMT in human ECs by activating canonical NF- $\kappa$ B pathway. During this process PTP1B increases its expression levels. Pharmacological inhibition of IKK- $\beta$  attenuated TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation with concomitant inhibition of EndoMT. These

findings unveil an important pathway in endothelial dysfunction and vasculopathy associated with inflammatory conditions and suggest novel avenues for intervention.

Romo-Tena J, Esparza-Lopez J, Carmona-Rivera C, Blanco L, Kaplan M, Ibarra-Sánchez M. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Modulates Endothelial-to-mesenchymal Transition and Increases Protein Tyrosine Phosphatase 1B [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2021; 73 (suppl 9). <https://acrabstracts.org/abstract/tumor-necrosis-factor-%ce%b1-modulates-endothelial-to-mesenchymal-transition-and-increases-protein-tyrosine-phosphatase-1b/>.