



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Efecto del Valproato de Sodio en la expresión de moléculas proinflamatorias inducida por hiperglucemia en células endoteliales de aorta porcina (PAEC)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
ANA GABRIELA FLORES NÚÑEZ

JURADO DEL EXAMEN

DIRECTORA: DRA. EMMA RODRÍGUEZ MALDONADO
ASESOR: DR. ARTURO EDUARDO CANO FLORES
ASERORA: DRA. GABRIELA ROSAS GAVILÁN
SINODAL: DR. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA
SINODAL: MTRO. ALFONSO MACARIO LUNA VÁSQUEZ



CIUDAD DE MÉXICO

22 DE ABRIL DEL 2024



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.

Efecto del Valproato de Sodio en la expresión de moléculas
proinflamatorias inducida por hiperglucemia en células
endoteliales de aorta porcina (PAEC)

DEDICATORIA

A mi bella familia:

Les agradezco infinitamente cada consejo, cada palabra de aliento, sus risas y momentos serios. Mami, eres un ser de luz en mi vida y en la de muchas personas, tu bondad ha llegado a tanta gente que es un modelo a seguir para mí, Papi, gracias por todo el apoyo que me has brindado y más en esta etapa del último esfuerzo, Mari, Vale y Rebe, gracias por ser mi pilar fundamental y la causa de mis más sinceras alegrías, por las aventuras desde la infancia y ahora como mujeres adultas. A mis queridas mascotas, por siempre estar y recibirme con tanto afecto, a mi gatita por acompañarme en tantos desvelos.

A mis amigas y amigos:

A mi amiga de toda la vida Guadalupe que hemos crecido juntas y en cada etapa nos hemos acompañado dándonos ánimo y apoyo incondicional, eres mi persona.

A mi familia del CCH Karen, Kike, Brenda y Nelly, por siempre estar conmigo en las buenas y en las malas, muchas gracias en particular a Karen por darme consejos y escucharme y reír hasta llorar y llorar hasta reír.

A mis compañeras de Biología Andrea, eres mi bebé gracias por ser incondicional conmigo, Ruth, gracias por tu apoyo siempre hacia conmigo y guiarme es mucha parte de este proceso, Pao contigo fueron las aventuras en las prácticas de campo más emocionantes y divertidas y Grecia mi abueli tu amistad y tu alegría y compañerismo en las clases es algo que atesoro, su apoyo y amistad durante la carrera hizo vital y muy amena las clases y prácticas de laboratorio y campo. Y Vale, te agradezco mucho por siempre incentivarme a dar siempre un paso más allá y estar conmigo en esos momentos donde quise rendirme y nunca me dejaste que lo hiciera, ¡ya merito lo logramos!

A mis compañeros del Instituto Nacional de Cardiología, que se convirtieron en amigos y apoyos durante esas largas horas en el laboratorio Axel, Jhonatan, Cristian, Karen, Bere, Adri, Angie, Luis, Polito y Betsabe, a los Doctores Massó y

Araceli por brindarnos este espacio armónico y tranquilo donde pudimos desarrollar este compañerismo.

A Gianina y a Frida, gracias a que el Instituto nos brindó la oportunidad de conocernos y convertirnos en amigas ¡muchas gracias!

Ars longa vita brevis – Hipócrates

“Que yo nunca rece para ser preservado de los peligros, sino para alzarme ante ellos y mirarlos cara a cara” - oración de Tagore.

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segunda casa durante mis años de carrera, que fue el espacio donde aprendí como nunca en muchas áreas de la Biología, donde los retos teóricos como tácticos fomentaron mi formación profesional y me brindaron herramientas para tener un criterio objetivo ante los demás retos de la vida, por ser el espacio donde conocí a personas extraordinarias y que dejaron muchos aprendizajes en mi vida.

A la Dra. Emma Rodríguez Maldonado que me instruyó desde el inicio y siempre estuvo presente durante todo el desarrollo de mi tesis. Gracias por la paciencia y sus consejos, por apoyarme más allá de lo académico y promover un espacio de seguridad y confianza, por las pláticas sobre la vida y escucharme durante momentos difíciles.

Al Dr. Martín Martínez Rosas, al Dr. Vicente Castrejón Téllez y a la Dra. Elvira Varela López, por su participación y acompañamiento en la realización de este proyecto.

Al cuerpo académico por su tiempo y colaboración para este proyecto y por estar presentes durante la carrera. A mis asesores, la Dra. Gabriela Rosas Gavilán, gracias por ser mi profesora de laboratorio y motivarme a terminar la carrera. Al Dr. Arturo Cano, retarme en las clases para dar un esfuerzo extra y ser más disciplinada. A mis sinodales, Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, por hacer amena y didáctica la clase de fisicoquímica. Al Mtro. Alonso Macario Luna Vásquez por hacer tan interesante la clase Genética de laboratorio y el alcance que tiene esta disciplina en los ámbitos de la vida social.



La tesis presentada a continuación fue realizada bajo la dirección de la Doctora Emma Rodríguez, en el Laboratorio de Medicina Traslacional, en la Unidad de Investigación UNAM-INC y bajo la supervisión y apoyo del Dr. Martín Martínez Rosas del Departamento de Fisiología, del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Este trabajo forma parte de la línea de investigación sobre Memoria Metabólica y Diabetes Mellitus, propuesta por el Dr. Martínez Rosas.

ABREVIATURAS

AGEs.....	Productos de Glicolización Avanzada
CF.....	Citometría de Flujo
DAMPs.....	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DM.....	Diabetes Mellitus
DM1.....	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2.....	Diabetes Mellitus Tipo 2
DE.....	Disfunción Endotelial
ERO.....	Especies Reactivas de Oxígeno
HG.....	Hiperglucemia
HDAC.....	Histona Deacetilasa
iHDAC.....	Inhibidor de Histona Deacetilasa
LPS.....	Lipopolisacárido
NO.....	Óxido Nítrico
PAMPs.....	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PRR.....	Receptores de Patrones de Reconocimiento
RII.....	Respuesta Inmune Innata
SM.....	Síndrome Metabólico
SIA.....	Sistema Inmune Adaptativo
SII.....	Sistema Inmune Innato
TLR.....	Receptores Tipo Toll
VPA.....	Valproato de Sodio

ÍNDICE	Páginas
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1.1. Diabetes Mellitus	7
3.1.2. Endotelio	7
3.1.3. Disfunción Endotelial	9
3.1.4. Sistema Inmune Innato	10
3.1.5. Receptores Tipo Toll	11
3.1.6. Vía de Señalización de TLR4	13
3.1.7. TLR y su relación con la Diabetes Mellitus	16
3.1.8. Moléculas de Adhesión	17
3.1.9. Valproato de Sodio	18
3.1.10. Papeles del VPA en la Inflamación y la Hiperglucemia	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
6. HIPÓTESIS	22
7. OBJETIVOS	23
7.1.1. General	23
7.1.2 Particulares	23
8. METODOLOGÍA	24
8.1.1. Cultivo Celular	24

8.1.2. Diseño Experimental	24
8.1.3. Evaluación de la expresión de Moléculas de superficie y moléculas intracelulares por citometría de flujo	26
8.1.4. Western Blot	27
8.1.4.1. Cultivo, Obtención y Preparación de PAEC	27
8.1.4.2. Lisis celular	27
8.1.4.3. Cuantificación de proteína por el método de Bradford	27
8.1.4.4. Electroforesis	28
8.1.4.5. Transferencia	28
8.1.4.6. Bloqueo de membrana	29
8.1.4.7. Incubación con anticuerpos	29
8.1.4.8. Revelado de las membranas	29
8.1.5. Inmunofluorescencia para la vía de señalización de TLR4/MyD88/NF-κB	29
8.1.6. Análisis estadístico	30
9. RESULTADOS	31
10. DISCUSIÓN	47
11. CONCLUSIONES	54
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
13. ANEXO	70
13.1. Proteína de Carga	70
13.1.2. Películas de Western Blot	72

1. RESUMEN

El nivel de glucosa en sangre superior a 110 g/dL en ayuno, conocido como hiperglucemia (HG), es una característica compartida por el Síndrome Metabólico y la Diabetes Mellitus. La persistencia de la HG causa complicaciones vasculares como retinopatía, nefropatía, pie diabético, enfermedad cardiovascular, entre otros padecimientos. El endotelio es la capa interior de los vasos sanguíneos que, al estar en contacto directo con la HG, favorece un estado proinflamatorio que se ha relacionado con la activación de los receptores tipo Toll. El valproato de sodio (VPA) es un medicamento antiepiléptico que ha mostrado efecto hipoglucemiante y antiinflamatorio. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del VPA sobre la expresión de TLR4, MyD88, NF- κ B (p65), ICAM-1 y VCAM-1 inducida por HG en las células endoteliales de aorta porcina (PAEC). Las PAEC se cultivaron en condiciones de normoglucemia (NG) (5 mM), HG (30 mM de glucosa) y VPA (0.1, 0.5, 1 y 10mM), durante 24 horas. Al final de la incubación se evaluó la expresión de las proteínas por citometría de flujo (CF) y Western Blot (WB). El VPA redujo la expresión de TLR4 del 20 al 50 % en HG mientras que en NG la concentración de VPA mayor (10 mM) incrementó la expresión de TLR4, mientras que en NG se observó una disminución, solo con la concentración mayor de VPA (10 mM), al ser evaluada por citometría; en tanto que, por WB, parece no haber efecto. El VPA no tuvo gran efecto sobre la expresión de MyD88 en ambas condiciones de glucosa, al ser evaluada por citometría. Sin embargo, al evaluar la expresión de MyD88 mediante WB, se observa un incremento del 50% y el VPA en todas sus concentraciones la disminuye hasta alcanzar los niveles de NG. El VPA no tuvo un efecto significativo en la expresión de p65 sin embargo sí se aprecia una tendencia al aumento en ambas condiciones de glucosa, al ser determinado mediante citometría. Aunque se observó que la expresión de p65 determinada mediante WB, tampoco se afectó por ninguna de las concentraciones de VPA, se observa que la HG tiene un efecto de disminución sobre p65, lo cual se muestra al utilizar ambas técnicas. En cuanto a la expresión de las moléculas de adhesión. El VPA con alta concentración (1 a 10 mM) disminuye la expresión de ambas moléculas de adhesión

en condiciones de HG. En las condiciones experimentales, se concluye que el VPA no tuvo efecto sobre en la expresión de TLR4 y MyD88 y que inhibe la expresión de NF- κ B (p65), ICAM-1 y VCAM-1, en HG.

2. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que agrupa una serie de alteraciones en el metabolismo de la glucosa asociados a un defecto en la secreción o en la acción de la insulina, lo que induce a un estado de hiperglucemia (HG) crónica y favorece alteraciones en prácticamente todo el cuerpo humano (Roden, 2016). Las complicaciones vasculares de la DM a largo plazo incluyen **retinopatía**, con la potencial pérdida de la visión; **nefropatía**, que conduce a la falla renal; y **neuropatía** tanto **periférica**, con alto riesgo de úlcera, sobre todo en las extremidades, como **autonómica**, que se asocia a síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares (van der Oever et al., 2010). Los pacientes con diabetes tienen una alta incidencia de aterosclerosis, que afecta el sistema cardiovascular, periférico y cerebrovascular. Como resultado de la afección renal hay gran riesgo de hipertensión y anormalidades en el metabolismo de las lipoproteínas (American Diabetes Association, 2002). Se han descrito principalmente dos tipos de diabetes mellitus: tipo 1 y 2 (DM1 y DM2, respectivamente). La DM1 es causada por la producción deficiente de insulina que se manifiesta por el inicio súbito de HG severa y, a modo de evitar una rápida progresión hacia cetoacidosis y muerte, se requiere de insulina para su tratamiento. Por otro lado, la DM2 se caracteriza por la resistencia a la insulina, es decir, por la disminución en la eficacia de la insulina para reducir los niveles de glucosa en sangre, lo que conlleva al aumento de insulina en sangre (hiperinsulinemia) y a la intolerancia a la glucosa, ambos factores eventualmente contribuyen a la persistencia de la HG (Ozougwu et al. 2013). De acuerdo con la International Diabetes Federation (IDF) la DM es un problema de salud a nivel mundial (Figura 1), ya que sólo en el año 2021, 537 millones de adultos mayores de 20 años, fueron diagnosticados con DM (IDF, 2021).

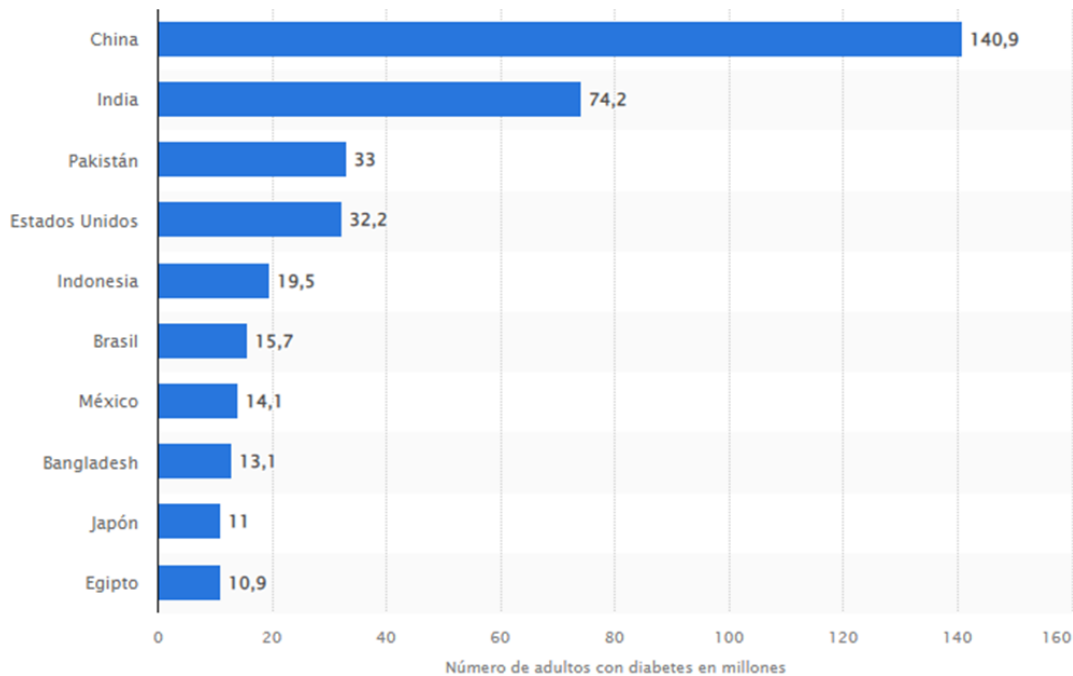


Figura 1 Incidencia de diabetes en adultos mayores de 20 años (en millones) por país (Statista, 2021).

En México, de acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, realizada en 2018, se estimó que 8.6 millones de personas mayores de 20 años, fueron diagnosticadas con DM en alguno de sus tipos, lo que representa el 10.7 % del total de la población mexicana (INEGI, 2021).

El síndrome metabólico (SM) se define como un conjunto de anormalidades metabólicas que se asocian con un alto riesgo para desarrollar DM (López et al., 2007). La asociación latinoamericana de diabetes (ALAD) estableció los criterios para evaluar si un paciente tiene SM, considerando la presencia de obesidad abdominal, aunado a triglicéridos elevados, colesterol HDL (High Density Lipoproteins) bajo, presión arterial elevada y alteración en la regulación de glucosa (Figura 2). El impacto del SM, en la salud pública en EUA y México tiene una prevalencia del 25% en la población adulta, lo que se relaciona con un incremento en la enfermedad aterosclerótica, sin un diagnóstico previo de DM (Lizarzaburu, 2013).

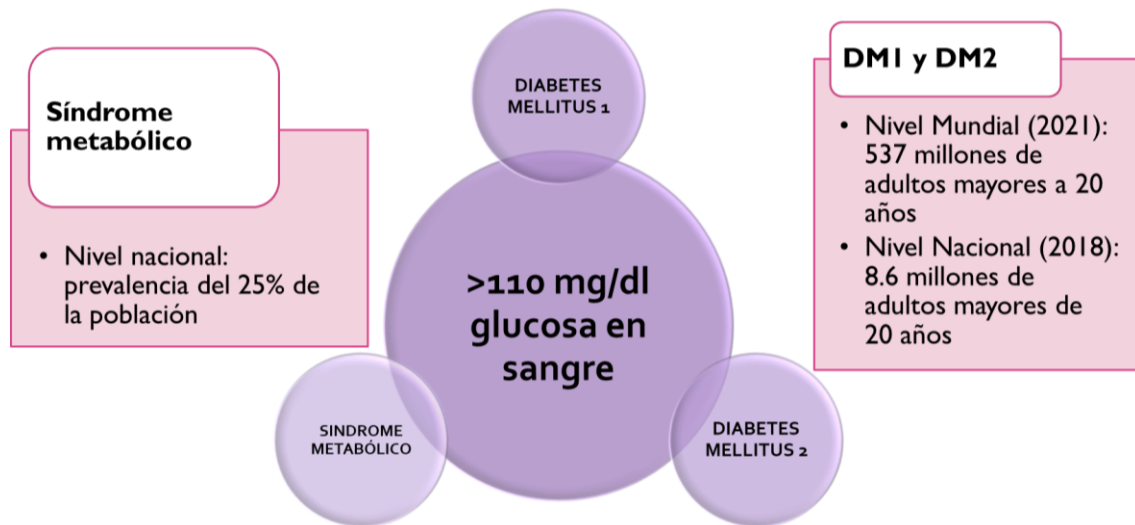


Figura 2 Enfermedades metabólicas relacionadas con la HG (imagen propia)

Un rasgo común entre la DM2 y el SM es la acumulación de tejido adiposo en la región abdominal y está relacionado con el incremento en la respuesta inmune debido a que se ha observado que órganos como el hígado y el páncreas, o los músculos, son sitios de inflamación (Esser et al., 2014). Aunado a ello, se ha mostrado que la HG propicia un estado proinflamatorio generalizado que, a largo plazo, deriva en el deterioro de la salud de los pacientes con diabetes, lo cual se manifiesta en pie diabético, retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedad macrovascular (Berbudi et al., 2020). La inflamación es una reacción de defensa natural del cuerpo y se encuentra fuertemente ligada a la inmunidad innata, la cual está involucrada en mantener la estabilidad del ambiente interno corporal y la homeostasia (Antonelli y Kushner, 2017). Los mediadores inflamatorios incluyen citocinas y quimiocinas, que establecen la reacción inflamatoria local y que actúan en los diversos sistemas corporales (Rask-Madsen, 2013). Estos son sintetizados por diferentes tipos celulares que, después de ser estimulados por agentes infecciosos o de daño, inician las cascadas de señalización a través de los receptores de patrones de reconocimiento (PRR) entre los que se encuentran los receptores tipo Toll (TLR) que forman parte de la respuesta inmune innata (RII) (Berbudi et al., 2020).

El valproato de sodio (VPA) es un medicamento antiepiléptico de amplio espectro, que se usa de forma efectiva para el tratamiento de diversas alteraciones de conducta y enfermedades neurales; posee efectos sedantes y antihipertensivos, tanto en humanos (Fagundes, 2008) como en modelos animales (Löscher, 2003), y recientemente, se ha propuesto su uso antiinflamatorio contra la DM (Yamato, 2018; Kühne et al., 20121). Esta propiedad del VPA en la DM puede ser utilizada para realizar estudios sobre la respuesta inflamatoria inducida por la HG.

3. MARCO TEÓRICO

3.1.1. Diabetes Mellitus

El tratamiento para los pacientes con DM se enfoca en controlar y disminuir los niveles de glucosa en sangre a lo largo de la vida del paciente, a través de diversas estrategias como el control de la dieta e implementar una rutina de actividad física, además es importante realizar el monitoreo constante de glucosa y una terapia regular de administración de insulina a través de inyecciones o bombas de insulina, entre otros métodos. Sin embargo, el mal manejo de la HG crónica, propicia un estado proinflamatorio en el cuerpo que, a largo plazo, resulta en un deterioro de la salud de estos pacientes. Así lo mostró el estudio para el control de la DM y sus complicaciones “Diabetes Control and Complications Trial” (DCCT), en el cual se observó que, durante el desarrollo de la enfermedad, existe una relación entre el nivel elevado de glucosa en sangre y el daño progresivo en tejidos y órganos, debido a la persistencia de las complicaciones vasculares aun cuando se normalizaron los niveles de glucosa en sangre (Lasker, 1993)

3.1.2. Endotelio

El sistema vascular se extiende a través de los órganos y tejidos del cuerpo humano. Los vasos sanguíneos (Figura 3) tienen diferencias en tamaño y estructura y se distinguen tres tipos: las arterias, las venas y los capilares. Un rasgo común en los vasos sanguíneos es que tienen un recubrimiento interno formado de una capa de células de tipo epitelial que recibe el nombre de endotelio (Konukoglu y Uzun, 2017). El cual consta de células poliédricas que se unen entre sí a través de un sistema de uniones intercelulares de tipo íntimo, discontinuo o uniones gap (Alexanderson et al., 2003).

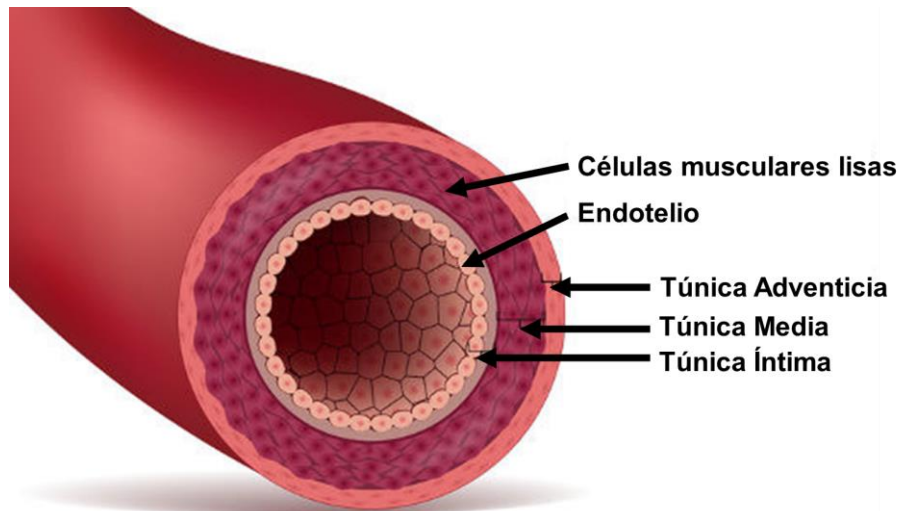


Figura 3 Estructura general de un vaso sanguíneo (iStock, 2017).

Las funciones del endotelio (Figura 4) consisten en mantener la hemostasia, la regulación del tono vascular y su participación en la respuesta del sistema inmune, se realiza a través de la síntesis y liberación de sustancias que actúan de manera paracrina, sobre los componentes sanguíneos o bien, regulando la expresión de receptores sobre su superficie celular que forman parte del sistema inmune innato (SII) (Sturtzel, 2017). En el endotelio se expresan moléculas de respuesta inmune por ejemplo las interleucinas, las quimiocinas, interferones y factores de crecimiento (Rudich et al., 1998).

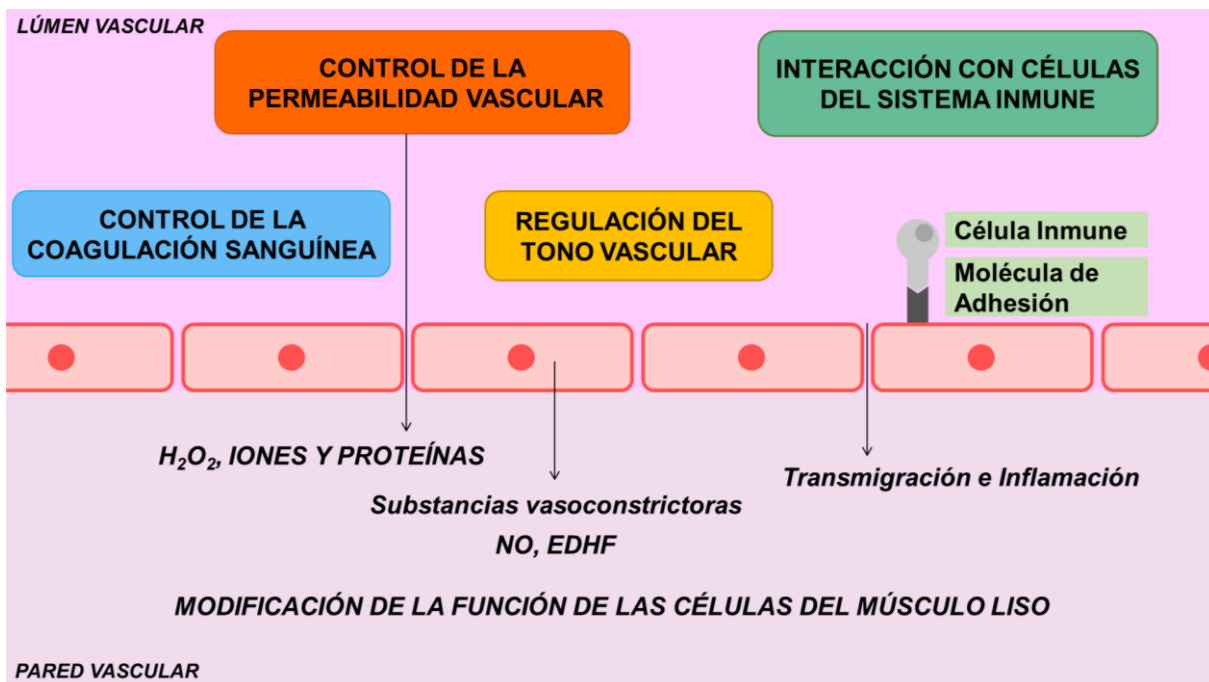


Figura 4 Funciones del endotelio (Óxido Nítrico NO, factor hiperpolarización dependiente del endotelio EDFH) (imagen modificada de Hirase y Node (2012))

3.1.3. Disfunción Endotelial

La DE es causada por la reducción en la producción o acción de factores relajantes derivados del endotelio lo que ocasiona en que el endotelio adquiera un estado vasoconstrictor, protrombótico y proinflamatorio (Deandfield et al., 2007) o bien, reacciona de manera inadecuada a un insulto o daño (Alexanderson et al., 2003). El endotelio contribuye y se ve afectado por los procesos inflamatorios a nivel celular; su activación tiene varias implicaciones por parte de la respuesta inmune, como el incremento de la expresión de moléculas de adhesión y moléculas quimioatrayentes, lo que da lugar a la elevación de la permeabilidad vascular para la inmigración de leucocitos y al desbalance en los mecanismos protectores y nocivos, esto resulta en el aumento de la vulnerabilidad vascular y perpetuación de la inflamación local (Luc et al., 2019). Cuando las células endoteliales son expuestas a niveles de alta o baja glucosa, se vuelven disfuncionales y la DE es variada dependiendo del tipo de vaso sanguíneo y lecho vascular (Clyne, 2021). La DE inducida por glucosa, está relacionada con el aumento en su metabolismo, a través

de las vías glucolíticas laterales, como la vía el poliol, la producción de AGE's, la activación de proteína C reactiva y la proteína O-GlcNAcilación, que en conjunto pueden resultar en una producción en exceso de superóxido mitocondrial que promueve la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Clyne, 2021).

El estrés oxidante es considerado el principal mecanismo de la patogénesis de la DE donde hay un incremento significativo de las ERO por la influencia de la inflamación, la resistencia a insulina, la dislipidemia, la vejez, el tabaquismo y la obesidad, ya que disminuyen la biodisponibilidad de Óxido Nítrico (NO) derivado del endotelio y cumple la función de vasodilatación (Konuloglu et al., 2021). Se ha observado que los malos hábitos en la alimentación, como el exceso de carbohidratos, puede propiciar periodos de HG en prediabetes, lo que conduce a la presencia de estrés oxidativo y una sobre regulación de factores proinflamatorios, que desembocan en la DE (Rudich et al., 1998; Luc et al., 2019). Actualmente, se reconoce que un mecanismo clave en la activación de las células endoteliales, que posteriormente deriva en la inflamación, es la disminución en la producción de NO endotelial debido a que, estímulos como la proteína-C reactiva (Konukoglu y Uzun, 2017), el lipopolisacárido (LPS) (Tsan y Gao, 2004), o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Muniandy et al., 2009), alteran la función del endotelio.

3.1.4. Sistema Inmune Innato

En años recientes, varios estudios señalan que los receptores tipo Toll (TLR) están involucrados en la patogénesis de la resistencia a la insulina, DM y aterosclerosis (Taha et al., 2004). La inflamación mediada por los receptores de patrones de reconocimiento (PRR) ha mostrado ser esencial en la patogénesis de complicaciones vasculares asociadas con la DM (Wang et al., 2020). Los PRR son responsables de detectar la presencia de microorganismos a través del reconocimiento de estructuras conservadas entre las especies microbianas nombrados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Medzhitov, 2007), como LPS, y también pueden reconocer moléculas endógenas del huésped que son liberadas por células dañadas, éstas se denominan patrones moleculares

asociados a daño (DAMPs), un ejemplo de esto son las altas concentraciones de la glucosa (Wang et al., 2020). Se han identificado cinco clases de familias de PRR, como son: Receptor de Lectina Tipo C (CLRs), Receptor de RIG-1 (RLRs), Receptor Tipo NOD (NLRs), Receptor de AIM2 (ALRs) y los ya mencionados TLR. En particular, para la familia de TLR se han identificado 11 miembros en mamíferos (Takeuchi y Akira, 2010). La función de los TLR radica en reconocer patógenos a partir de los patrones de repetición de estructura molecular sobre su superficie (Dasu et al., 2010).

3.1.5. Receptores Tipo Toll

Los TLR se clasifican de acuerdo con su localización y el tipo de ligandos que reconocen (Figura 5). Por su localización, los TLR se dividen en dos grupos: TLR de membrana citoplasmática (TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10) y TLR de membranas endosomales (TLR3, 7, 8 y 9) (Vadillo y Pelayo, 2012). Ya sea en monómeros o en heterodímeros cada TLR reconoce un patrón molecular distinto, algunos TLR requieren cooperar para detectar a los diferentes ligandos: TLR1 (en asociación con TLR2, TLR1/2) para lipopéptido triacil; TLR2 para lipoproteínas y peptidoglicanos; TLR3 para ARN bicatenario; TLR4 para LPS; TLR5 para flagelina; TLR6 (en asociación con TLR2, TLR2/6) para lipopéptido diacil; TLR7 para ARN monocatenario, TLR8 para oligonucleótidos con alto contenido de Guanina y TLR9 para ADN CpG no metilado (Tsan y Gao, 2004).

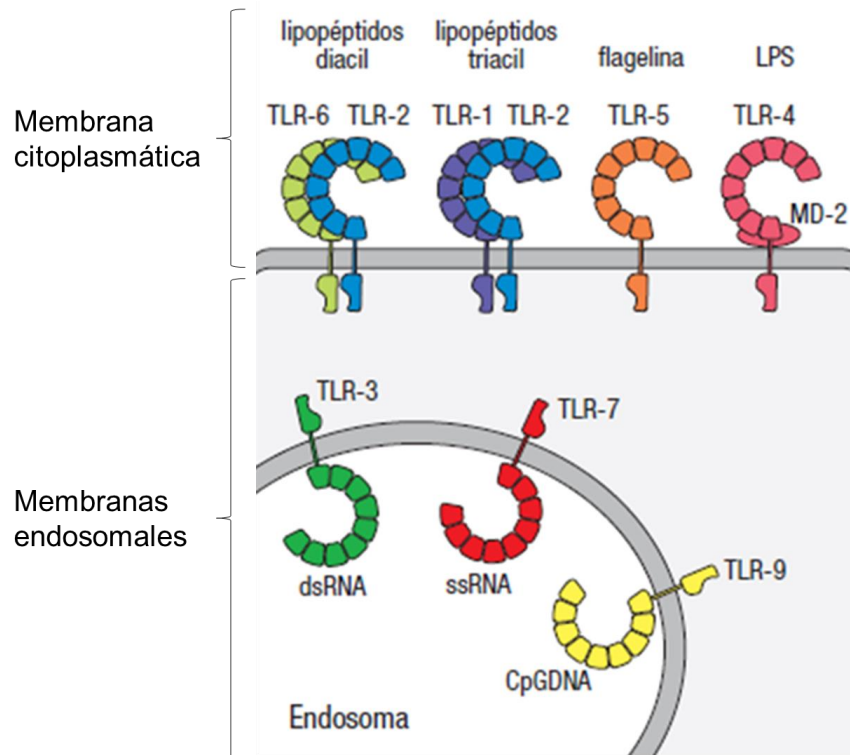


Figura 5 Familia de TLR (imagen tomada de Inmunología de Janeway (Murphy, 2008))

Los TLR se expresan en células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, natural killer y mastocitos del SII, linfocitos T y B del sistema inmune adaptativo (SIA) y células epiteliales y endoteliales, células no inmunes. La estructura general de los TLR (Figura 6) consta de un dominio extracelular en forma de solenoide que consiste en repeticiones ricas en leucina, un dominio intermembranar que consta en una glicoproteína integral de membrana tipo 1 y un dominio TIR (TLR/IL-1R) citoplasmático (Leifer y Medvedev, 2016).

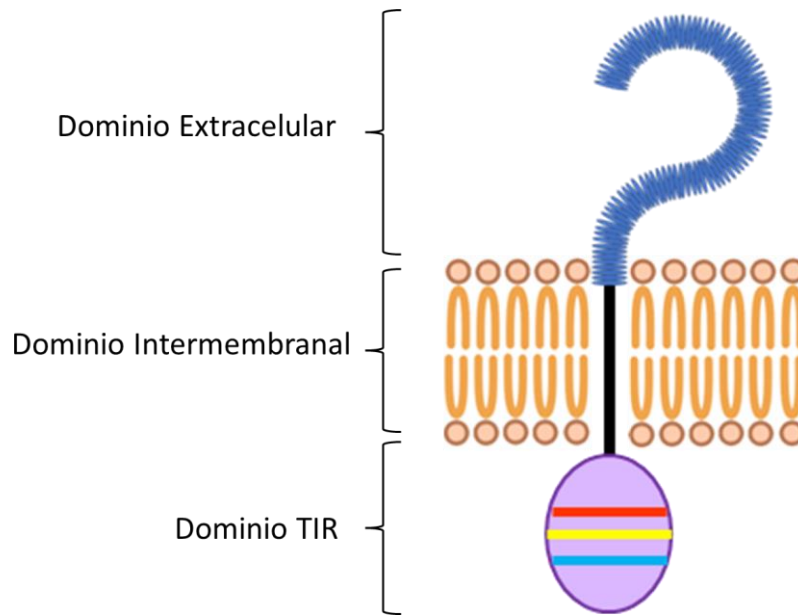


Figura 6 Estructura general de los TLR (Imagen modificada de Takeda y Akira, 2004).

3.1.6. Vía de Señalización de TLR4

La vía de señalización (Figura 7) mejor caracterizada es la de TLR4, y se han descrito dos rutas: la dependiente del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), que es compartida con TLR2, 5, 6 y 9; y la independiente de MyD88 que requiere de adaptadores citosólicos como TRIF y TRAM, que se comparte con TLR3 (Ohnishi et al., 2009). La vía de señalización dependiente de MyD88 puede ser iniciada por el reconocimiento de LPS por TLR4, lo que induce la unión del dominio TIR para activar a MyD88 (Moreno y Sánchez, 2003), la cual es una proteína adaptadora citosólica que participa en los SII y SIA, ya que es mediadora de la transducción de señales.

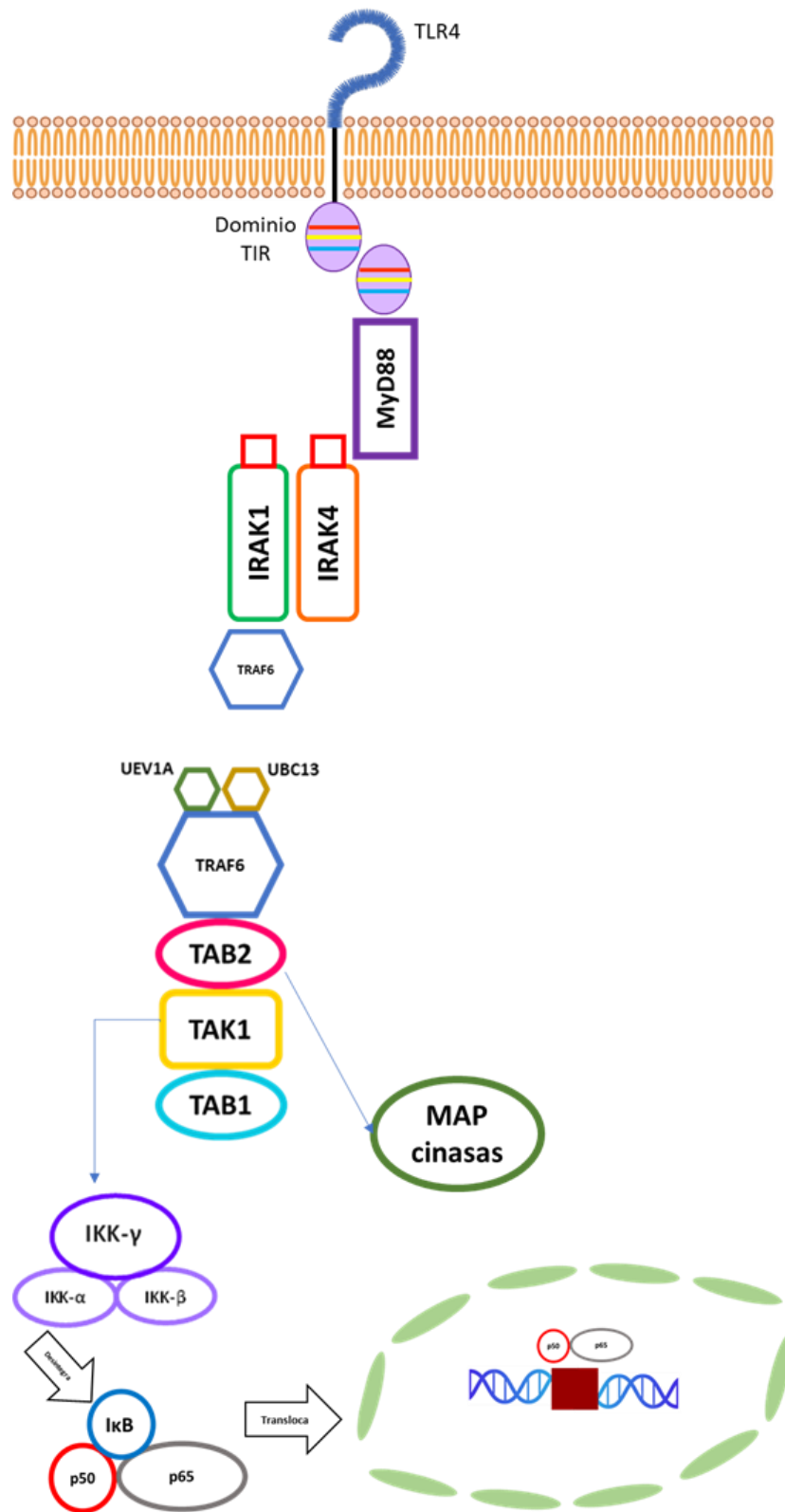


Figura 7 Vía de señalización dependiente de MyD88 (imagen modificada de Takeda y Akira (2004)).

La estructura de MyD88 (Figura 8) consiste en un dominio de muerte (death domain) en su amino terminal y un dominio TIR en su carbono terminal (Ohnishi et al., 2009).

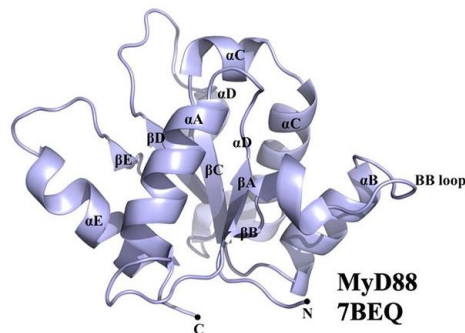


Figura 8 Estructura tridimensional de MyD88 (Nimma et al., 2021)

El dominio TIR de MyD88 interactúa con el dominio TIR de TLR4, esta interacción favorece que el dominio de muerte (DD) de MyD88 interactúe con IRAK (cinasa asociada a IL-1R). IRAK inicia una cascada de activación de cinasas IKK α e IKK β que forman un dímero llamado IKK, el cual fosforila a I κ B que es una proteína inhibitoria del factor de transcripción NF- κ B (Moreno y Sánchez, 2003). En condiciones basales I κ B inhibe a NF- κ B formando un complejo que permanece en el citoplasma. Tras la eliminación de I κ B, NF- κ B se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria inducida por diversos factores como LPS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-13 y IL-16 (Moreno y Sánchez, 2003) o la elevada concentración de glucosa en sangre (Choi et al., 2018). El complejo NF- κ B es un heterodímero compuesto de dos subunidades de unión a ADN, NF- κ B1 y Rel A (p65), está presente en todas las células del cuerpo, es un activador nuclear de la transcripción inducible que se une al ADN para liberar elementos proteicos en muchos tipos celulares y es activado por un estímulo patógeno (Mitchell et al., 2016). Una vez activado, NF- κ B actúa en el núcleo como factor de transcripción que favorece la expresión genética (Napetschnig y Wu, 2013) de moléculas proinflamatorias como las adhesinas ICAM-1 y VCAM-1 (Figura 9) (Yang et al., 2018).

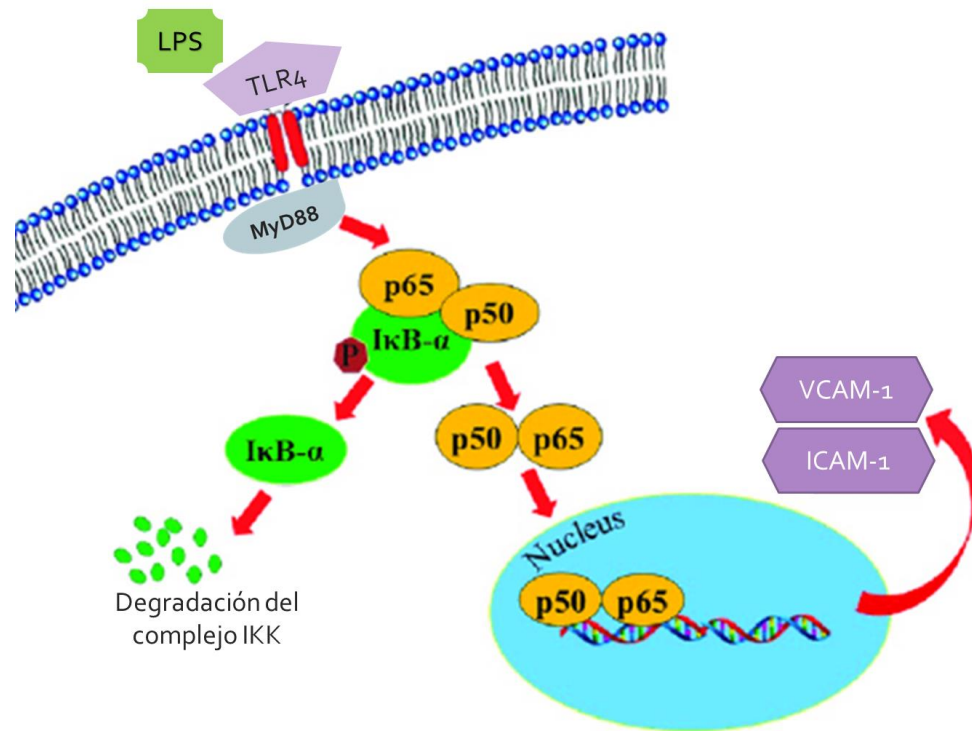


Figura 9 Translocación al núcleo de NF-κB (imagen modificada de Zhou et al. (2021)).

3.1.7. TLR y su relación con la Diabetes Mellitus

La expresión de los TLR se incrementa en algunos tipos celulares como monocitos, neutrófilos y células endoteliales en condiciones de HG, lo que conduce al aumento en la respuesta inflamatoria (Dasu et al., 2010; Gupta et al., 2016). Pahwa y Jialal (2016) observaron que, tanto en pacientes diagnosticados con DM, como en modelos animales con DM, hay un incremento en la actividad de TLR, principalmente TLR2 y TLR4. Existen varios reportes enfocados en la participación del TLR4 en la evolución de DM2. Singh et al. (2015) mostraron que existe una relación entre el TLR4, el factor tisular (TF) y el LPS en la activación del SII, durante la patogénesis debido a la resistencia a la insulina que, como consecuencia, influye en la respuesta inflamatoria, en pacientes con DM. Por otro lado, Wang et al. (2015) mostraron que en células endoteliales bajo condiciones de HG se presenta una sobreexpresión de TLR4. Debido a ello, se propone que la evaluación de la expresión de TLR4, MyD88 y la subunidad p65 de NF-κB, considerados como

marcadores de inflamación, podría ser un potencial objetivo terapéutico para la inflamación inducida por HG, como lo muestra una investigación realizada en células mesoteliales peritoneales humanas (HPMC) donde se observó que la HG induce la activación de dichas moléculas (Choi et al., 2017).

La unión de la glucosa con el TLR4 deriva en la translocación al núcleo del NF- κ B lo que induce la expresión de citocinas inflamatorias y moléculas de adhesión (Mitchell et al., 2016), en células endoteliales de microvasculatura de retina humana (HMOVREC), se observó que en condiciones de HG hay una elevación en la expresión y en la actividad de TLR2 y TLR4 (Rajamani y Jialil, 2014). Gupta et al. (2017) estudiaron la expresión los TLRs (1-10) en monocitos y neutrófilos de pacientes con DM2, agrupados en función del control de la glucosa y las complicaciones presentes debidas a la enfermedad, y encontraron que la expresión de todos los TLRs, excepto TLR2 y TLR6, en monocitos y en neutrófilos, se incrementó en los pacientes con buen control de glucosa y sin complicaciones, pero no en los pacientes con mal control, con y sin complicaciones, además se observó que la expresión del TLR4 aumentó en los neutrófilos de todos los grupos de pacientes con DM2, lo cual muestra que el TLR4 tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria inducida por HG, aun cuando hay un buen manejo terapéutico de la glucosa en los pacientes con DM2.

3.1.8. Moléculas de Adhesión

El endotelio tiene un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune y su activación puede ser inducida por varios estímulos como LPS, TNF- α y la oxidación de LDL, lo que puede promover la expresión de moléculas de adhesión o quimioatrayentes en la superficie de las células endoteliales (Treples et al., 2006). Las moléculas de adhesión son proteínas integrales de membrana que participan en las interacciones intercelulares y con la matriz extracelular, participan en el desarrollo de los mecanismos de la respuesta inmune celular y en la migración y activación de leucocitos (Macías, 2006). Posterior a la activación de TLR4 por LPS o HG, como se mencionó antes, la vía de señalización dependiente de MyD88

desemboca en la entrada de NF- κ B al núcleo para favorecer la expresión de moléculas de adhesión (Yang et al., 2018). Las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio son P-Selectina, E-Selectina, ICAM-1 y VCAM-1 (Panés, 1999; Pahwa y Jialil, 2016). Bajo condiciones de HG, el aumento en la expresión de moléculas de adhesión da lugar al reclutamiento y diapédesis de leucocitos dentro del espacio subendotelial (Simionescu, 2007). ICAM-1 se expresa de manera intrínseca en las células del SII y SIA (Macías, 2006), mientras que VCAM-1 es una molécula inducible que se expresa como resultado de su estimulación por citocinas o endotoxinas (Panés, 1999). El incremento de dichas moléculas también se ha observado en el plasma de pacientes con DM1 y DM2 (Baumgartner-Parzer, 1997). En otro estudio, en células endoteliales de arteria coronaria (CAEC) de pacientes con DM, se observó un aumento en la expresión de TLR2 y TLR4 comparado con CAEC de personas sin DM, y al ser estimuladas con LPS hay una sobre expresión de ICAM-1 (Li et al., 2010).

3.1.9. Valproato de Sodio

El VPA es una sal de ácido graso de cadena ramificada (2-propilpentanoato de Sodio) (Figura 10) el cual muestra un amplio espectro de eficacia para el tratamiento de la epilepsia (Ueda y Willmore, 2000).

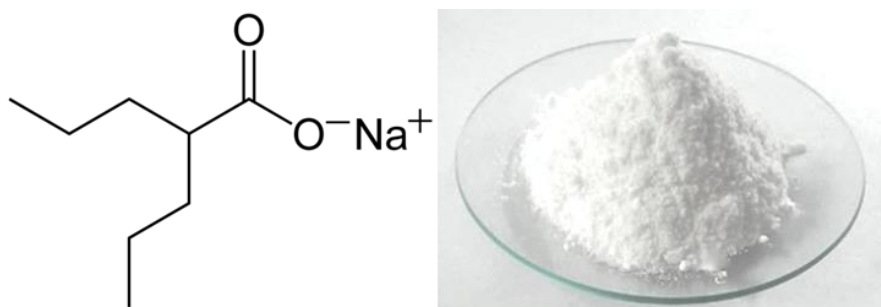


Figura 10 Estructura del Valproato de Sodio (2-propilpentanoato de Sodio) (izquierda) / Apariencia física del VPA (derecha) (Chemos, 2019).

También se presenta como ácido valproico, un ácido carboxílico de bajo peso molecular que fue sintetizado por primera vez en Estados Unidos en el año 1882, por el químico Beverly Burton y fue utilizado como solvente orgánico (Romoli et al.,

2019). El uso clínico del VPA fue descubierto hasta 1962 cuando se utilizó al ácido valproico por ser un vehículo lipofílico, para disolver componentes insolubles en agua durante pruebas preclínicas de medicamentos antiepilépticos y se propuso examinar su actividad anticonvulsiva en solitario y tras ser probado en conejos, ratas y ratones encontraron que por sí mismo tenía efectos anticonvulsivos (Löscher, 1999; Fagundes, 2008). Además de sus aplicaciones anticonvulsivas, en modelos animales, este medicamento exhibe efectos farmacológicos como ansiolítico, antiagresivo, anticonflictivo, antidistónico, antinociceptivo, sedante/hipnótico, inmunoestimulante y acciones antihipertensivas (Löscher, 2002). El VPA está asociado a la actividad anticancerígena, suprimiendo el crecimiento de tumores y metástasis, también induce la diferenciación de tumores *in vitro* e *in vivo*. En humanos, el VPA se ha utilizado en el tratamiento de Alzheimer, ataques de pánico, toxoplasmosis, discinesia, alucinación olfativa idiopática, microbicida, entre otros padecimientos (Fagundes, 2008).

Los cambios no hereditarios provocados por la activación y desactivación de los genes sin alteraciones en la secuencia de ADN son el campo de estudio de la Epigenética, esto suele ser en la interacción entre el ADN y las proteínas que envuelven al ADN para empaquetar el genoma en los cromosomas. La cromatina consta de ADN e histonas a modo de cuentas lo que constituye a los nucleosomas, la unidad estructural básica de la cromatina. La modificación de las histonas es un mecanismo epigenético post-transcripcional, que ocurre a través de enlaces covalentes a grupos funcionales como metilo, acetilo, fosfato y a proteínas como ubiquitina. En el caso particular de la acetilación de histonas, provoca un cambio en la estabilidad de la interacción de las histonas con el DNA y su grado de compactación (en la cromatina), lo que aumenta o disminuye la expresión genética lo que, a su vez, resulta en un cambio en el fenotipo celular sin cambios en la secuencia de ADN (Jouve, 2020).

El VPA es un inhibidor de histona deacetilasa (iHDAC) que puede disminuir la expresión de genes gluconeogénicos (Cho et al., 2018). El VPA induce la inhibición epigenética de las histonadeacetilasas (HDAC) como HDAC1, HDAC2, HDAC3 y

HDAC8, lo que incrementa la acetilación de histonas H2, H3 y H4, que modifican la expresión de genes asociados con la apoptosis, ciclo celular, diferenciación celular y la defensa en contra de tumores celulares. Las HDAC se involucran en la deacetilación de residuos de lisina modificando la carga de los tallos de histona y promoviendo la compactación de la cromatina (deacetilación). Dichos cambios regulan la replicación, transcripción y reparación del ADN (Soria-Castro et al., 2019).

3.1.10. Papeles del VPA en la Inflamación y la Hiperglucemia

Existen varios trabajos que estudian los efectos del VPA en modelos animales. Akindede et al. (2015), donde se observó el efecto hipoglucemiante, antidislipidémico y antioxidante del VPA en ratas con diabetes, inducida por aloxano (Akindede et al., 2015). Rabadiya et al. (2018), evaluaron en ratas con diabetes inducida, por estreptozotocina, el efecto del valproato de Magnesio sobre complicaciones cardiacas asociadas a la DM1, y observaron que no solo se reguló la HG y dislipidemia, sino que se logró reducir significativamente la concentración de biomarcadores cardiacos tal es el caso de la proteína-C reactiva. Por otro lado, se mostró que el VPA atenúa la expresión mutagénica en células de hepatocitos humanos (HepG2), inducida por la HG y que estos genes están relacionados con el metabolismo del colesterol, la replicación del ADN, la cascada del complemento y la cascada de coagulación, aunque el mayor efecto se observó en las vías del complemento y la coagulación (Felisbino et al., 2021). En otro estudio, Suh et al. (2010), observaron que el VPA inhibió la expresión de genes antivirales y de las citocinas IL-10, IL-1 β , TNF- α y IL-6, en células de microglía humana y astrocitos, estimulados con los ligandos de TLR3 y TLR4 (PIC: TLR3 ligand). Kühne et al. (2021) observaron que el VPA, inmerso en nanopartículas de celulosa, es capaz de disminuir la expresión y secreción de TNF- α a través de la vía de señalización de TLR4/ MyD88/ NF- κ B, en macrófagos humanos (Kühne et al., 2021). Aunque cada vez hay más estudios sobre la actividad del VPA y sus efectos moduladores sobre la inflamación inducida por HG, aún se desconocen los mecanismos por los cuales actúa este medicamento. Por lo tanto, en este trabajo se pretende evaluar el efecto

del VPA sobre la expresión de moléculas del SII (TLR4, MyD88 y p65) y moléculas proinflamatorias (ICAM-1 y VCAM-1), en células endoteliales de aorta porcina (PAEC) en condiciones de HG.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La HG se relaciona con el desarrollo de complicaciones vasculares y daños a órganos y tejidos a largo plazo, ya que favorece un estado proinflamatorio crónico generalizado, donde el endotelio es capaz de regular la respuesta inmune y el tono vascular y la trombogénesis. El VPA es un medicamento utilizado en el tratamiento de la epilepsia que, entre sus acciones, regula la modulación de la expresión de genes de proteínas que participan en las vías de inflamación, relacionadas con la HG. Por lo tanto, es importante estudiar el efecto del VPA en la vía de señalización de TLR4/ MyD88/ NF-κB en las células endoteliales, ya que ésta vía participa en la respuesta inmune innata y puede ser activada bajo condiciones de HG.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El VPA tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de moléculas relacionadas con la inflamación (TLR4, MyD88, p65, ICAM-1, VCAM-1) inducida por HG en células endoteliales PAEC?

6. HIPÓTESIS

Si el VPA tiene efecto inhibitorio sobre la expresión de moléculas proinflamatorias (Soria et al., 2019; Kühne et al., 2021), la administración de concentraciones graduales de VPA en células endoteliales de aorta de porcino, resultará en la disminución de los niveles de expresión de las proteínas TLR4, MyD88, NF-κB, ICAM-1 y VCAM-1 relacionadas a la inflamación inducida por HG.

7. OBJETIVOS

7.1.1. General

- Determinar el efecto del VPA sobre la expresión de moléculas proinflamatorias inducida por hiperglucemia en células endoteliales de aorta porcina.

7.1.2 Particulares

- Determinar una curva de concentraciones de VPA con las PAEC mediante las diferentes técnicas.
- Determinar el efecto del VPA sobre la viabilidad de las PAEC mediante el ensayo de MTT.
- Determinar el efecto de VPA sobre la expresión de TLR4, MyD88, NF- κ B (p65), VCAM-1 e ICAM-1 en PAEC mediante citometría de flujo.
- Estudiar el efecto del VPA sobre la expresión de proteína de las moléculas TLR4, MyD88 y p65, por la técnica de Western Blot en PAEC.
- Determinar la expresión de TLR4, MyD88, NF- κ B (p65) mediante inmunofluorescencia y la observación con microscopio Confocal.

8. METODOLOGÍA

8.1.1. Cultivo Celular

La línea de células endoteliales de aorta porcina (PAEC) fueron amablemente proporcionadas por el Dr. A. Sorkin (Universidad de Colorado, Denver, USA) y se cultivaron en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con bicarbonato de sodio, con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibióticos (penicilina, estreptomycin y antimicótico) e incubadas en una atmosfera de Aire-CO₂ 7 %, 95 % humedad, a 37 °C. Su ciclo celular es de 24 horas.

8.1.2. Diseño Experimental

Las PAEC se incubaron con dos condiciones de glucosa: en normoglucemia NG (5 Mm) y en HG (30 mM) y se definieron diferentes concentraciones de VPA 0, 0.1, 0.5, 1 y 10 mM por 24 horas (Figura 11), donde basal se va a referir a las PAEC en cultivadas en condiciones de NG o HG sin tener VPA. Inicialmente, se sembró la cantidad de células necesarias para tener un 25 % de confluencia de acuerdo con el área de la botella o caja de cultivo, dos horas después de la incubación se cambió el medio a HG o NG de acuerdo al diseño experimental. Al día siguiente, se observó una confluencia de 50 %, se cambió el medio y se agregó el VPA y los controles positivos de TNF- α o LPS. Para el término del experimento, la confluencia esperada fue de 90 al 100 %, se despegaron las células con tripsina y se agregaron a tubos eppendorff de 1.5 ml etiquetados previamente.



Figura 11 Diseño experimental.

La viabilidad celular se determinó a través de las técnicas de azul de tripano y de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). La primera técnica se realizó con la tinción con azul de tripano en las células PAEC (sembradas en caja de 24 pozos). Se sembraron 6.5×10^4 / pozo en una caja de 24 pozos y mantenidas bajo las condiciones experimentales. Al término del experimento se observó una confluencia de 95 a 100%, se despegaron con tripsina (1:5) con PBS y se detuvo la reacción con medio de lavado, se centrifugaron las muestras en tubos eppendorf a 1000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y se homogenizó en 1 mL de medio de lavado. Se colocó una alícuota de 15 μ L de suspensión celular (por pozo) en la cámara de Neubouer, se contaron de 21 a 37 células en total por los cuatro cuadrantes, siendo las células muertas aquellas que son teñidas de azul. La viabilidad celular se calculó al dividir las células vivas (las células totales menos las células muertas), entre las células totales para obtener el porcentaje, esta operación se realizó para cada pozo en todas las condiciones experimentales. En la segunda técnica de viabilidad, se detectó la actividad de enzimas mitocondriales en una caja de cultivo de 96 pozos, donde se sembraron 1×10^4 células por pozo. Al día siguiente, se cambió al medio de HG y NG, con las concentraciones de VPA y se incubaron durante 24 horas. Para el ensayo, se agregó 0.2 mg/mL de MTT por pozo y se incubaron durante 4 horas, se retiró el medio y se agregó 100 μ L de isopropanol ácido (0.04 N de HCl) a cada pozo para

disolver los cristales de formazan. La lectura de la absorbancia se realizó con el equipo CYTATION 3 Imaging Reader BioTek, a una longitud de onda de 570 nm.

8.1.3. Evaluación de la expresión de Moléculas de superficie y moléculas intracelulares por citometría de flujo

La expresión de moléculas de superficie celular de inmunidad innata, el TLR4, y de adhesión, ICAM-1 y VCAM-1, se realizó con el citómetro de flujo BD FACSAria™ Fusion y los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) fueron obtenidos mediante el software BD FASDiva versión 8.03. El análisis de los datos fue realizado mediante el software FlowJo versión 10.1, licencia autorizada para el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IMF} = \frac{\text{Media Geométrica}}{\text{No. de Eventos}}$$

Para estos ensayos se sembraron 1×10^5 células PAEC por pozo, (en caja de 6 pozos) en condiciones de HG y NG y las diferentes concentraciones de VPA, durante 18 a 24 horas en las condiciones antes mencionadas (aire-CO₂ 7 %, 95 % humedad, a 37 °C). Al finalizar el ensayo, se observó una confluencia de 95 a 100 %, las células se despegaron con PBS-tripsina (0.05 %-0.53 mM EDTA) y se detuvo la reacción con medio de lavado (DMEM/F12, 5 % SFB, 1x antibiótico). Se centrifugaron las muestras en tubos eppendorf a 1000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y se lavó el botón celular con 500 uL de PBS (1x) dos veces. Se centrifugaron las muestras a 1000 rpm y se decantó el PBS, se fijaron con 15 uL de paraformaldehído a 4 °C durante 15 minutos. Se lavaron las muestras con 800 uL de PBS (0.8 % Albúmina, 0.02 % Azida de Sodio), se decantó y el botón celular se ajustó a 30 uL de solución celular para incubar los anticuerpos: TLR4 (anti-human eBioscience 12-9917-42); anti ICAM-1-FITC (R&D System BBA-20) y VCAM-1-PE (Santa Cruz Biotechnology SC-1310). En tanto que, para determinar la expresión de moléculas intracelulares, las células se despegaron con tripsina (0.05%-0.53 mM EDTA) y se tiñeron esta vez en condiciones de permeabilización utilizando los anticuerpos específicos antiMyD88 (Santa Cruz

Biotechnology SC-11356) y anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology SC-372), Se usaron anticuerpos secundarios específicos marcados con FITC (FITC anti-mouse IgG 1 Cat. 406606 BioLegend USA). Por cada muestra se adquirieron 3000 eventos en el citómetro. Los resultados fueron analizados.

8.1.4. Western Blot

8.1.4.1. Cultivo, Obtención y Preparación de PAEC

La expresión de las proteínas de la vía de señalización de TLR4, MyD88 y la subunidad p65 de NF- κ B se determinó con la técnica de WB. Se sembraron 1×10^6 células PAEC por caja de Petri (diámetro de 5 cm), conforme al diseño experimental (Figura 10), se incubaron durante dos minutos, se cambió el medio y hasta el día siguiente se agregó las dosis de VPA y LPS, como control positivo. Al finalizar la incubación, se obtuvieron las células en tubos ependorff de 1.5 mL, previamente etiquetados, y se sumergieron en nitrógeno líquido para almacenarlas a $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.1.4.2. Lisis celular

La extracción de proteína se realizó con solución de Desoxicolato que contiene: 1 mL de buffer de lisis, 10 ng de Desoxicolato, 4 μL de DMSF y 10 μL de Inhibidor de proteasas (Halt™ Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, 78442). Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se agregó 50 μL de la solución de Desoxicolato y se mezcló con la pipeta, finalmente las muestras se dejaron en agitación durante 1 hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se almacenaron a $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la cuantificación de proteína total.

8.1.4.3. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Se realizó una curva patrón de albúmina (Tabla 1) con 1 mL de reactivo de Bradford (dilución 1:5) a cada tubo. Se preparó un tubo para cada muestra con 1 mL de reactivo de Bradford (1:5) y se agregó 2 μL de muestra a cada tubo respectivamente. Siendo el tubo número 1 el blanco, del 2 al 5 los tubos de la curva y del 6 en adelante

a las muestras y se realizó por duplicado. Se agitaron los tubos en el vortex por 5 segundos y se procedió a la lectura mediante espectrometría (BioPhotometer plus Eppendorf) a una longitud de onda de 595 nm.

Tabla 1 Curva estándar para la determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford

Tubo	Albúmina (1 mg/mL)	Reactivo Bradford (5X)	de Agua desionizada
1	0.0 uL	0.2 mL	0.8 mL
2	2.5 uL	0.2 mL	0.8 mL
3	5 uL	0.2 mL	0.8 mL
4	10 uL	0.2 mL	0.8 mL
5	15 uL	0.2 mL	0.8 mL

8.1.4.4. Electroforesis

Se prepararon geles de acrilamida al 10 y 12 % para realizar la separación proteica mediante la técnica de electroforesis. Se agregó el marcador de peso molecular en el primer pozo del gel, de manera consecutiva se agregó de 20 a 40 ug de proteína mezclada con buffer de carga de cada muestra (anexo 1), previamente calentadas a 100 °C por 5 minutos. Se aplicó un voltaje de 40 mV por 10 minutos y se aumentó a 100 mV durante 2 horas o hasta que las muestras lleguen al final del gel.

8.1.4.5. Transferencia

Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno, utilizando una cámara de transferencia en húmedo con Buffer TBE-10% metanol. Se aplicó un voltaje de 1.0 A, durante 1 hora con 10 minutos. Al finalizar, las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente.

8.1.4.6. Bloqueo de membrana

Las membranas se humedecieron en metanol al 100 %. Se incubaron con una solución de leche 5 % en buffer TBS-tween 1% a 4 °C, durante 1 hora y se lavaron 3 veces durante 10min. En agitación.

8.1.4.7. Incubación con anticuerpos

Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios específicos diluidos en TBS/Twen, para anti-TLR4, (Santa Cruz Biotechnology SC-13593) a 1:2000, anti-MyD88 (Santa Cruz Biotechnology SC-11356) a 1:1000 y anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology SC-372) a 1:1000 y se utilizó β -actina 1:20000, como control de carga. Se incubaron con los anticuerpos primarios a 4 °C durante toda la noche, en agitación. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en TBS/Twen anti-mouse para TLR4 a 1:20000, anti-rabbit para MyD88 y p65 a 1:10000 incubados a 4 °C durante 24 horas en agitación y anti-mouse para β -actina a 1:20000 incubados a 4 °C durante 2 horas en agitación.

8.1.4.8. Revelado de las membranas

La detección de las bandas se realizó dentro del cuarto oscuro mediante el método de quimioluminiscencia utilizando el Kit Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD) en una relación 1:1, exponiendo las películas radiográficas (Agfa) con los sustratos quimioluminiscentes de la membrana, durante 2 minutos. Los valores de la densidad de las bandas se adquirieron con el densitómetro GS-800 y fueron analizadas utilizando el programa ImageJ de uso libre (Aksamitiene et al., 2007).

8.1.5. Inmunofluorescencia para la vía de señalización de TLR4/MyD88/NF- κ B

Se sembraron 2.5×10^4 células PAEC en cubreobjetos de diámetro de un 10 mm cargados con poli-L-lisina, contenido en placas de 24 pozos, con el medio de estímulo (HG) y control (NG) durante 24 horas y se estimularon con TNF- α , como

control positivo para la expresión de P65. En el caso de la detección de las moléculas intracelulares (MyD88 y P65), previamente a la fijación, las células fueron permeabilizadas con PBS-tritón (0.2 %). Posteriormente, las células fueron fijadas con PBS-paraformaldehído (4 %) a 4 °C durante 10 minutos. Después fueron lavadas con PBS y se bloquearon con PBS-albúmina (1 %). Se incubaron con los anticuerpos primarios descritos previamente en dilución 1:100, durante toda la noche a 4° C. Se utilizaron los anticuerpos secundarios (anti-rabbit-PE y anti-mouse-FITC Biolegend) en dilución 1:200 incubados durante una hora a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las células se examinaron mediante microscopia Confocal de fluorescencia con el equipo LSM 700 Zeiss.

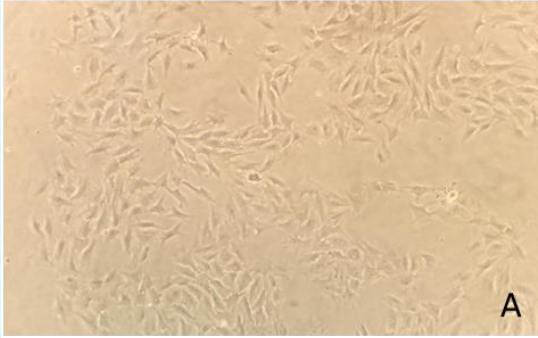
8.1.6. Análisis estadístico

Los experimentos para determinar la expresión de TRL4, MyD88 y NF-κB (p65), y moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, fueron independientes y se repitieron tres veces. La estadística se realizó con el promedio y desviación estándar, con las pruebas de t de Student y ANOVA con el programa SigmaPlot 15.0. Los resultados se muestran en gráficas donde se representa el promedio y la desviación estándar. Se utilizó el valor de $P < 0.05$ para considerarse significativos.

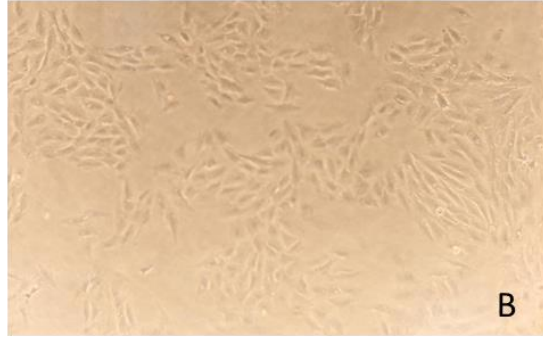
9. RESULTADOS

Las células endoteliales PAEC fueron cultivadas conforme se describió en la metodología. En la Figura 12 se muestran una serie de fotografías tomadas en el microscopio óptico, donde se observa la morfología de las PAEC en las distintas condiciones del cultivo; en NG e HG (A-F y G-L), con las concentraciones de VPA 0.1 mM (B, H), 0.5 mM (C, I), 1 mM (D, J) y 10 mM (E, K), con TNF- α (F, L) como control positivo. En NG sin VPA (Figura 12a) hay una confluencia de 90 al 100 %, su morfología es poliédrica formando un patrón adoquinado y con células alargadas en forma de huso, semejando a fibroblastos, específica para células endoteliales. Las PAEC incubadas con las concentraciones 0.1, 0.5 y 1 mM de VPA (Figura 12B, C y D), y en HG sin VPA y con 0.1 y 0.5 mM de VPA (Figura 12H y I) tienen una morfología adecuada. En NG con 10 mM de VPA (Figura 12E), la confluencia fue de 90 a 100 %, hubo algunas células en forma esferoide y de apariencia brillante, lo que indica se despegaron. No obstante, con HG y 1 y 10 mM de VPA (Figura 12J y K), tuvo mayor número de estas células esferoides brillosas y una disminución de la densidad celular del 30 al 40%. Las células PAEC expuestas a TNF- α (10 ng/ml) en NG e HG (Figura 12F y L), mostraron una confluencia de 60 a 70 % y su morfología fue adecuada.

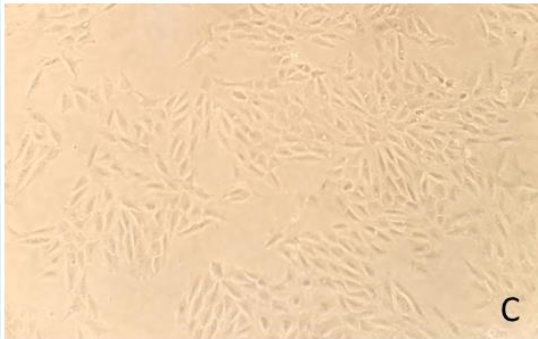
NORMOGLUCEMIA



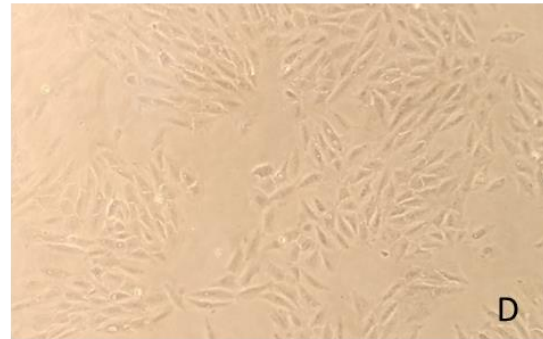
BASAL



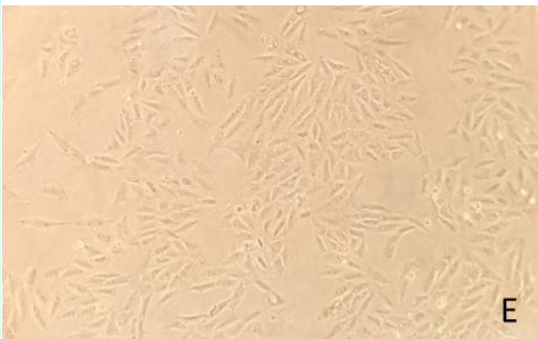
0.1 mM VPA



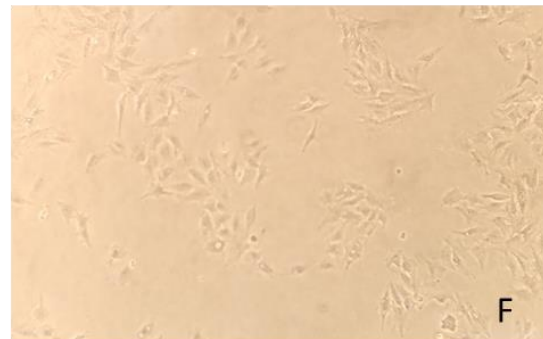
0.5 mM VPA



1 mM VPA



10 mM VPA



10ng/ml TNF- α

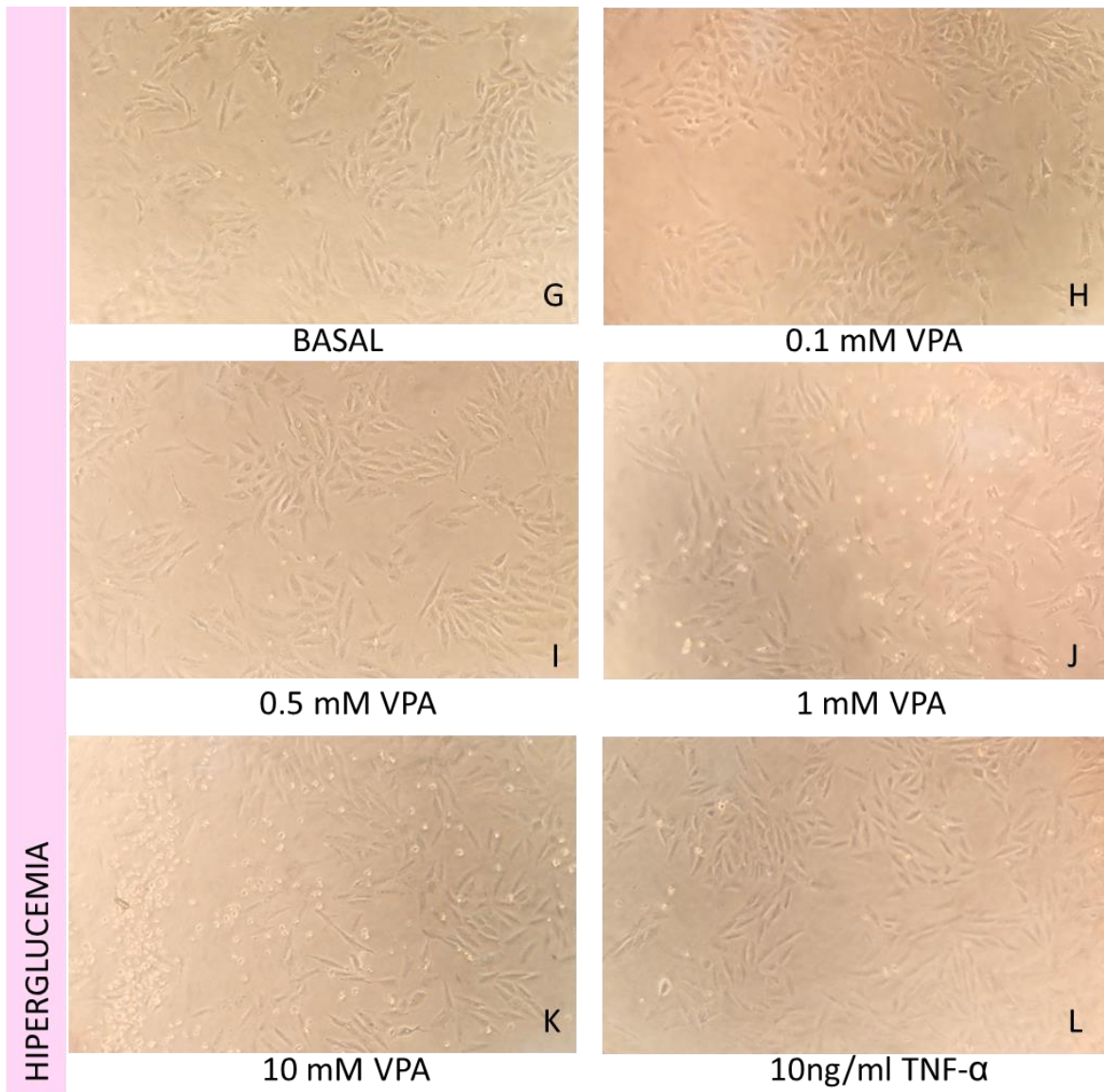


Figura 12 Morfología de PAEC en NG e HG (5 y 30 mM de glucosa respectivamente) durante 48 horas, expuestas a las concentraciones de VPA. Basal e HG (A, G), 0.1 mM (B, H), 0.5 mM (C, I), 1 mM (D, J) y 10 mM (E, K) de VPA y 10 ng/mL de TNF- α (F, L), durante 24 horas.

El azul de tripano es un colorante azoico (azo, del griego a, sin y zoion, vivo: sin vida que hace referencia a que posee un grupo funcional que le da la coloración azul cuando ingresa al interior de las células muertas), por lo tanto, se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar entre células vivas y muertas, ya que las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no se colorean. El ensayo de viabilidad con tinción de azul de tripano se realizó al final de las incubaciones en las condiciones experimentales. En la Figura

13A, se representa el porcentaje de viabilidad de las PAEC expuestas a diferentes concentraciones de VPA, tanto en condiciones de NG como en HG, durante 24 horas de incubación. En las PAEC expuestas a HG basal, la viabilidad celular disminuyó, al ser comparadas con NG, sin llegar a ser significativo. Con las diferentes concentraciones de VPA, tanto en NG como en HG no hubo diferencia significativa. Con 0.1 y 10 mM de VPA, hubo una disminución significativa de la viabilidad al comparar HG respecto a NG. Con la concentración de 0.5 mM de VPA, la disminución de la viabilidad fue significativa respecto a las concentraciones más alta y más baja de VPA (0.1 y 10 mM), en NG. En la Figura 13B, se muestra el efecto del VPA sobre el número de células totales en condiciones de NG. No hubo diferencias significativas al comparar cada una de las concentraciones de VPA respecto al basal. La Figura 13C, representa la cantidad de células totales en condiciones de HG, tratadas con las diferentes concentraciones de VPA. Se observa un aumento de la cantidad de células totales por efecto de la HG, sin embargo, la diferencia no fue significativa; mientras que en las concentraciones 1 y 10 mM de VPA, disminuyó de manera significativa la cantidad de células totales comparado al basal en HG. Se utilizó el TNF- α como control positivo de expresión, y se contabilizó una disminución significativa del número de células totales respecto al basal.

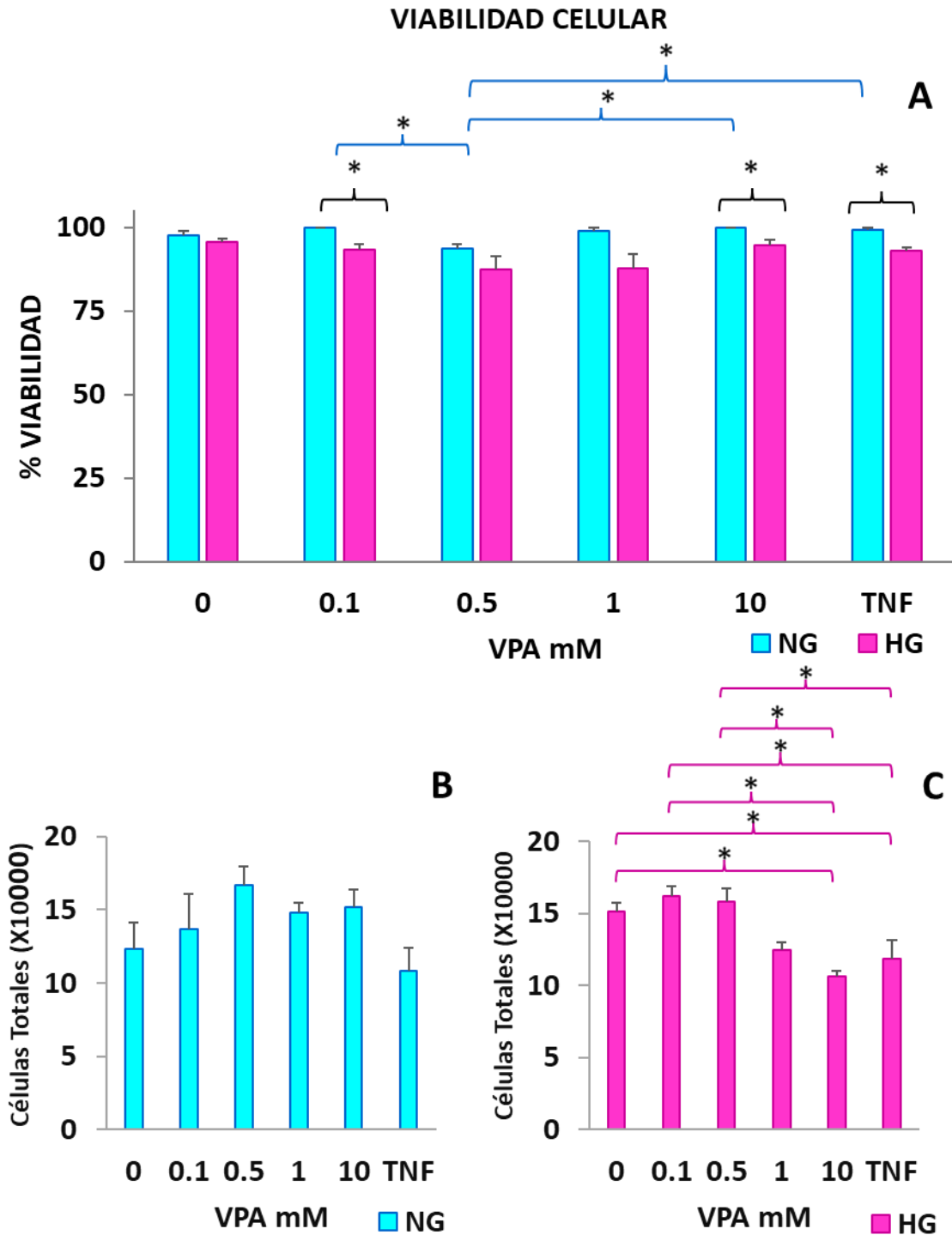


Figura 13 Viabilidad celular con azul de tripano en PAEC en condiciones de NG e HG (5 y 30 mM de glucosa respectivamente) (A), con las concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM). Células totales en NG (B) e HG (C). Las barras representan el promedio y \pm SD. * $P > 0.05$ del basal contra las condiciones experimentales, con *t* de Student.

El ensayo de MTT se utiliza para determinar la viabilidad a partir de evaluar la actividad de las células, debida a la acción de enzimas de tipo deshidrogenasa mitocondrial, las cuales reducen al MTT en sales de formazán, un subproducto que adquiere un color púrpura. En la Figura 14, la gráfica representa la actividad metabólica de las células PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, tanto en NG e HG. Hubo un incremento significativo en la actividad metabólica de 30 % aproximadamente en HG comparado con el basal. Con 0.1 y 1 mM de VPA en NG, disminuyó la actividad respecto a la condición basal.

En las concentraciones de 0.01 y 0.05 mM de VPA en NG, incrementó la actividad de las PAEC respecto a la condición basal. En las concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.5 mM de VPA en HG, hay un aumento significativo de la actividad metabólica de las PAEC. En tanto, no hubo una diferencia significativa con 0.01, 0.05 y 1 mM de VPA en HG respecto a NG.

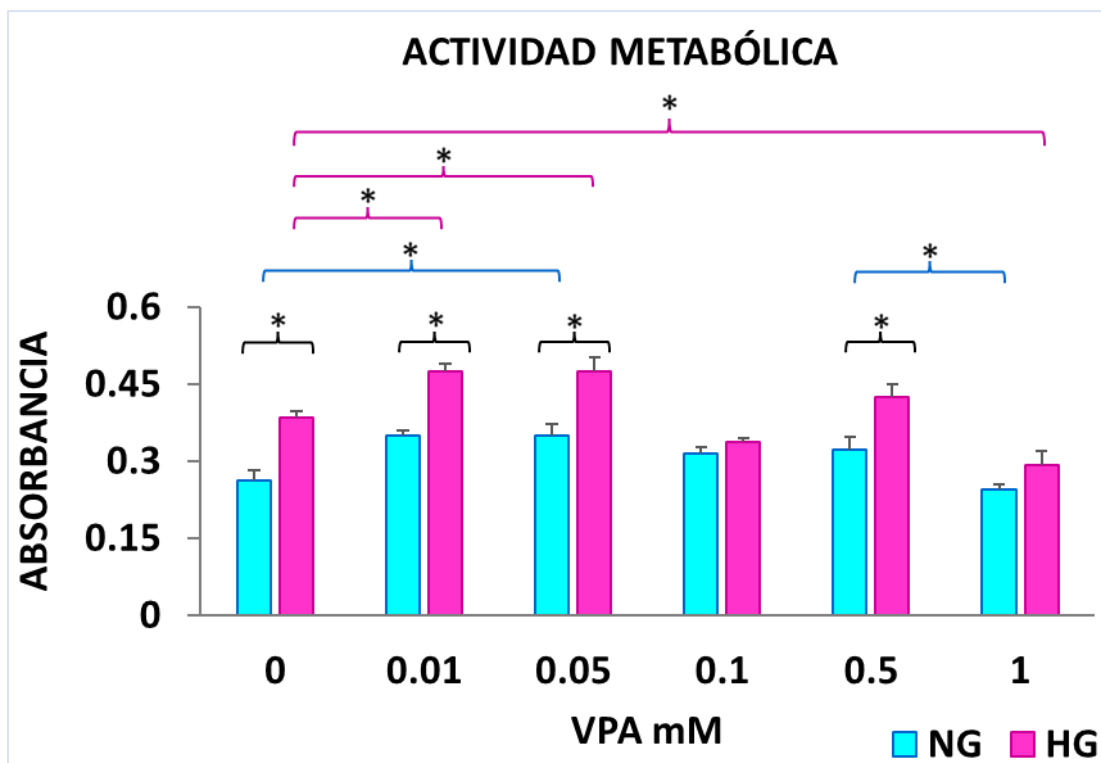


Figura 14 Actividad metabólica con MTT en PAEC en NG e HG (5 y 30 mM de glucosa respectivamente), con las concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) durante 24 horas ($n=3$). Las barras representan el promedio y \pm SD. * $P>0.05$ del basal contra las condiciones experimentales, con t de Student.

La determinación de la expresión de las moléculas TLR4, MyD88 y p65 (NF- κ B), se realizó con las técnicas de CF y Western Blot y las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, sólo con CF. En ambos casos las moléculas fueron detectadas o reconocidas mediante el uso de los anticuerpos específicos, como se indica en la metodología.

En la Figura 15 se observa los gráficos de la expresión TLR4 en las PAEC en NG, HG y con las diferentes concentraciones de VPA, durante 24 horas de incubación. La Figura 15A representa la expresión de TLR4, expresada como el índice de fluorescencia media (IFM). En general, se observa una disminución en la expresión de TLR4 por efecto de la HG, mostrando únicamente diferencia significativa en las concentraciones de 0.1 y 10 mM de VPA. En la Figura 15B, se representan los histogramas del área bajo la curva de los espectros de emisión de las PAEC sin marca y las PAEC marcadas con anti-TLR4/PE en condiciones de NG y de igual manera en la Figura 15C, están los espectros de emisión de las PAEC marcadas, en condiciones de NG e HG. En las figuras 15D y 15E, se muestran los espectros de emisión de TLR4 en condiciones de NG e HG, respectivamente, expuestas a las diferentes concentraciones de VPA. En las figuras 15F y 15G, las gráficas representan la expresión de TLR4 a partir de la proteína total obtenida de las PAEC en condiciones experimentales, expresado en unidades de Intensidad Relativa. En condiciones de NG hay una disminución de la expresión de TLR4 conforme aumenta la concentración de VPA, pero solo se muestra una diferencia significativa con la concentración de 1 mM de VPA, respecto al basal. En la Figura 15G, el VPA disminuye la expresión de TLR4 en condiciones de HG y mantiene una baja expresión respecto a la condición basal, aun cuando se incrementa la concentración de VPA, por lo tanto, el efecto del VPA es independiente de la concentración, sin llegar a ser significativo. En la parte inferior de las figuras 15F y 15G se observa las bandas que corresponden a TLR4, cuya intensidad fue afectada por la HG, y β -actina como control de carga.

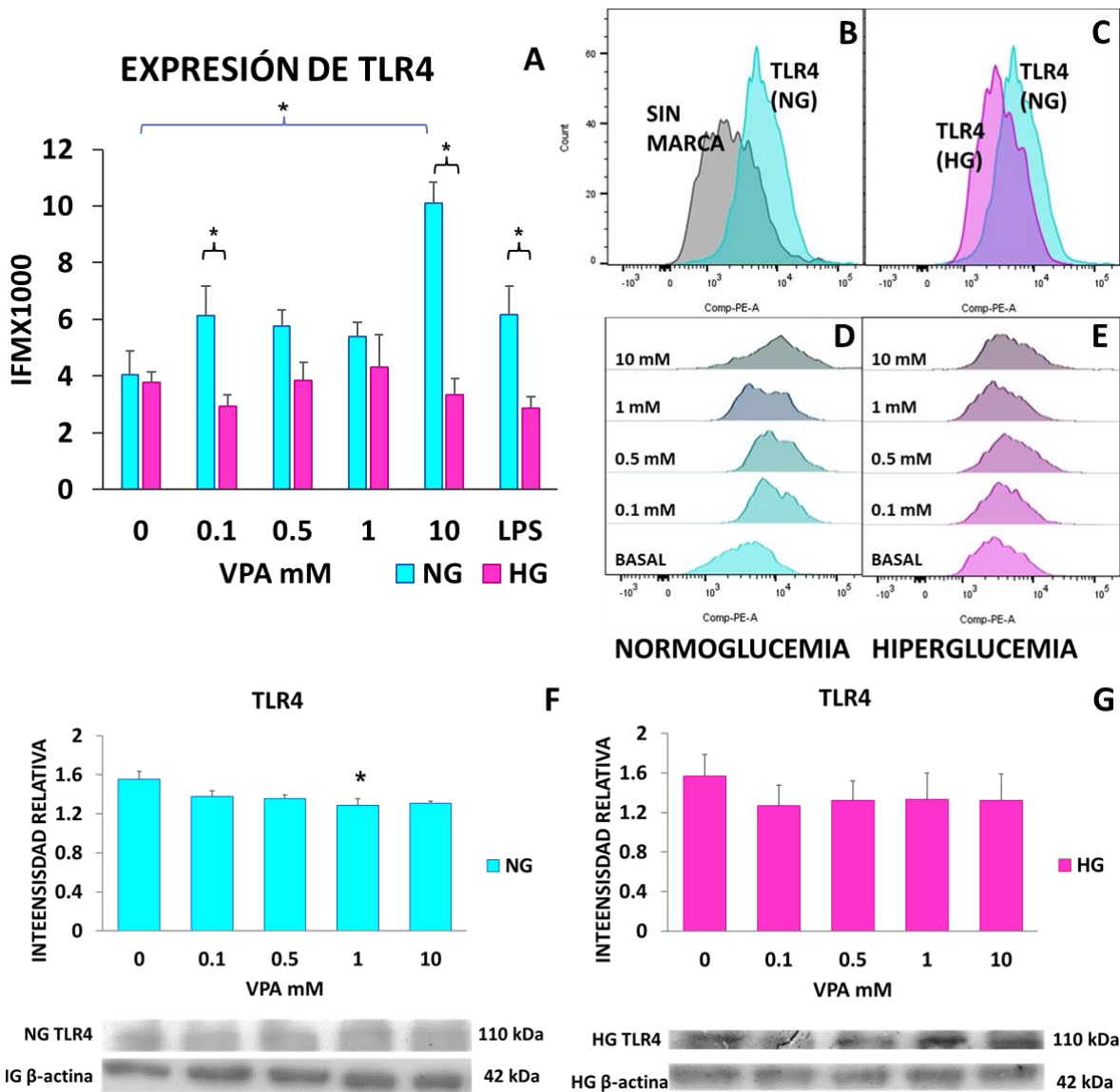


Figura 15. Expresión de TLR4 en PAEC en NG e HG (5 y 30 mM de glucosa respectivamente), con las concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) durante 24 horas ($n=3$). Citometría de Flujo (A), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-TLR4/PE en NG contra PAEC sin marca (B), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-TLR4/PE en NG contra TLR4 en HG (C), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con TLR4 en NG (D), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con TLR4 en HG (E). TLR4 con WB en NG (F) e HG (G), con las diferentes concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM), en la parte inferior se muestran las bandas que corresponden a TLR4 y β -actina como control de carga. Las barras representan el promedio y \pm SD. $*P>0.05$ del basal contra las condiciones experimentales, con t de Student.

En la Figura 16A, la gráfica representa la expresión de MyD88 en valores de IFM. Se observa que la expresión de MyD88 en condiciones basales y con 0.1 de VPA es mayor en NG comparada con HG, aunque la diferencia no es significativa. Sin

embargo, la expresión de MyD88 disminuye con el aumento de la concentración de VPA. En la Figura 16B, se muestran los espectros de emisión de las PAEC sin el anticuerpo y las teñidas con anti-MyD88/FITC en condiciones de NG. Del mismo modo en la Figura 16C, están los espectros de emisión de las PAEC marcadas con anti-MyD88/FITC en condiciones de NG e HG, en condiciones basales. En las figuras 16D y E, se muestran los espectros de emisión de MyD88 en NG e HG y con las diferentes concentraciones de VPA. En las Figuras 16F y G, se estudió la expresión de MyD88, mediante la técnica de WB, a partir de la proteína total de las PAEC en condiciones de NG e HG respectivamente, expresadas en unidades de Intensidad relativa y en la parte inferior de las figuras se observan las bandas que corresponden a MyD88, y β -actina, como control de carga. Se aprecia que la HG aumenta la expresión de MyD88 de manera significativa y se deduce que la expresión de MyD88 es independiente de la concentración de VPA.

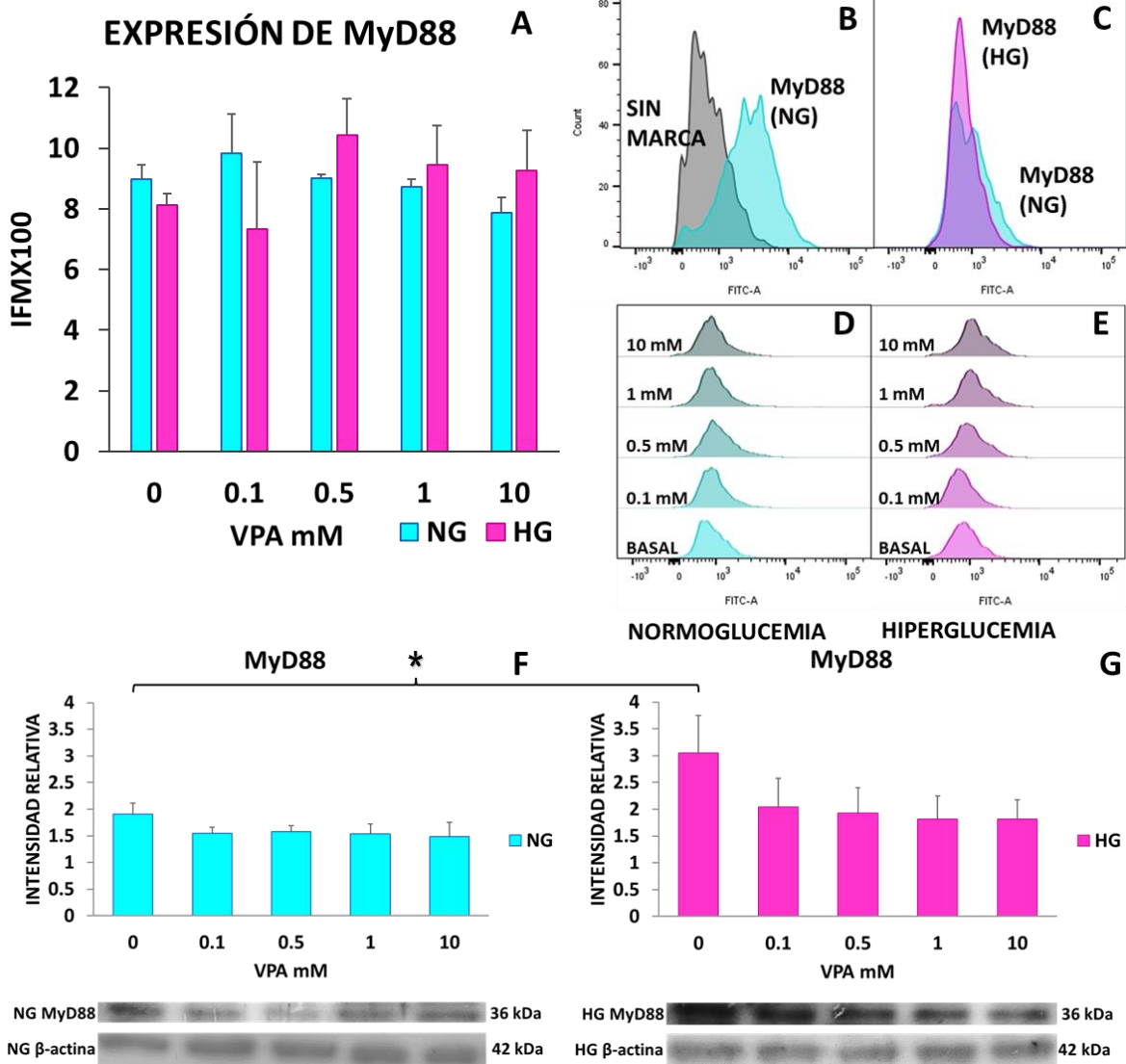


Figura 16 Expresión de MyD88 en PAEC en NG e HG (5 y 30 mM de glucosa respectivamente) con las concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) durante 24 horas ($n=3$). Citometría de Flujo (A), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-MyD88/FITC en NG contra PAEC sin marca (F), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-MyD88/FITC en NG contra MyD88 en HG (C), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con MyD88 en NG (D), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con MyD88 en HG (E). MyD88 con WB, en NG (F) e HG (G), con las diferentes concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM), en la parte inferior se muestran las bandas que corresponden a MyD88 y β -actina como control de carga. Las barras representan el promedio y \pm SD. * $P>0.05$ del basal contra las condiciones experimentales, con t de Student.

La Figura 17A, se muestra la gráfica de la expresión de p65 en unidades de IFM y su efecto con las diferentes concentraciones de VPA, tanto en NG como en HG, durante 24 horas de incubación. La expresión de p65 se observa que la HG

disminuyó la expresión respecto a NG, sin embargo, no es significativo. En HG el VPA aumenta la expresión de p65 en 0.1 mM y conforme aumenta la concentración de VPA (0.5, 1 y 10 mM) se observa que disminuye la expresión de p65, pero sin llegar a ser significativo. Por otro lado, en HG la elevación de la expresión de p65 con las concentraciones de VPA es menor con respecto a NG que no es significativo. El TNF- α fue utilizado como control positivo de la expresión de p65, en condiciones de HG, tuvo un incremento significativo de p65 inducido por TNF- α mientras que con NG se elevó la expresión no fue significativo. En la Figura 17B, se observan los espectros de emisión de las PAEC no marcadas y marcadas con anti-p65/FITC en condiciones de NG. En la Figura 17C, se muestra la gráfica que representa los espectros de emisión de las PAEC marcadas con anti-p65/FITC en condiciones de NG e HG. En las figuras 17D y E, se muestran los espectros de emisión de las PAEC marcadas con p65 en condiciones de NG e HG, respectivamente, con las diferentes concentraciones de VPA. En las figuras 17F y G, se muestran las gráficas que representan la expresión de p65, mediante la técnica de WB, a partir de la proteína total de las PAEC en condiciones de NG e HG, respectivamente, en unidades de Intensidad Relativa. De acuerdo con esta gráfica, la expresión de p65 disminuye de manera significativa por efecto de la HG y el VPA no tuvo ningún efecto sobre dicha expresión, tanto en condiciones de NG como de HG. En la parte inferior de las figuras 17F y G, se observan las bandas que corresponden a p65 y β -actina, como control de carga.

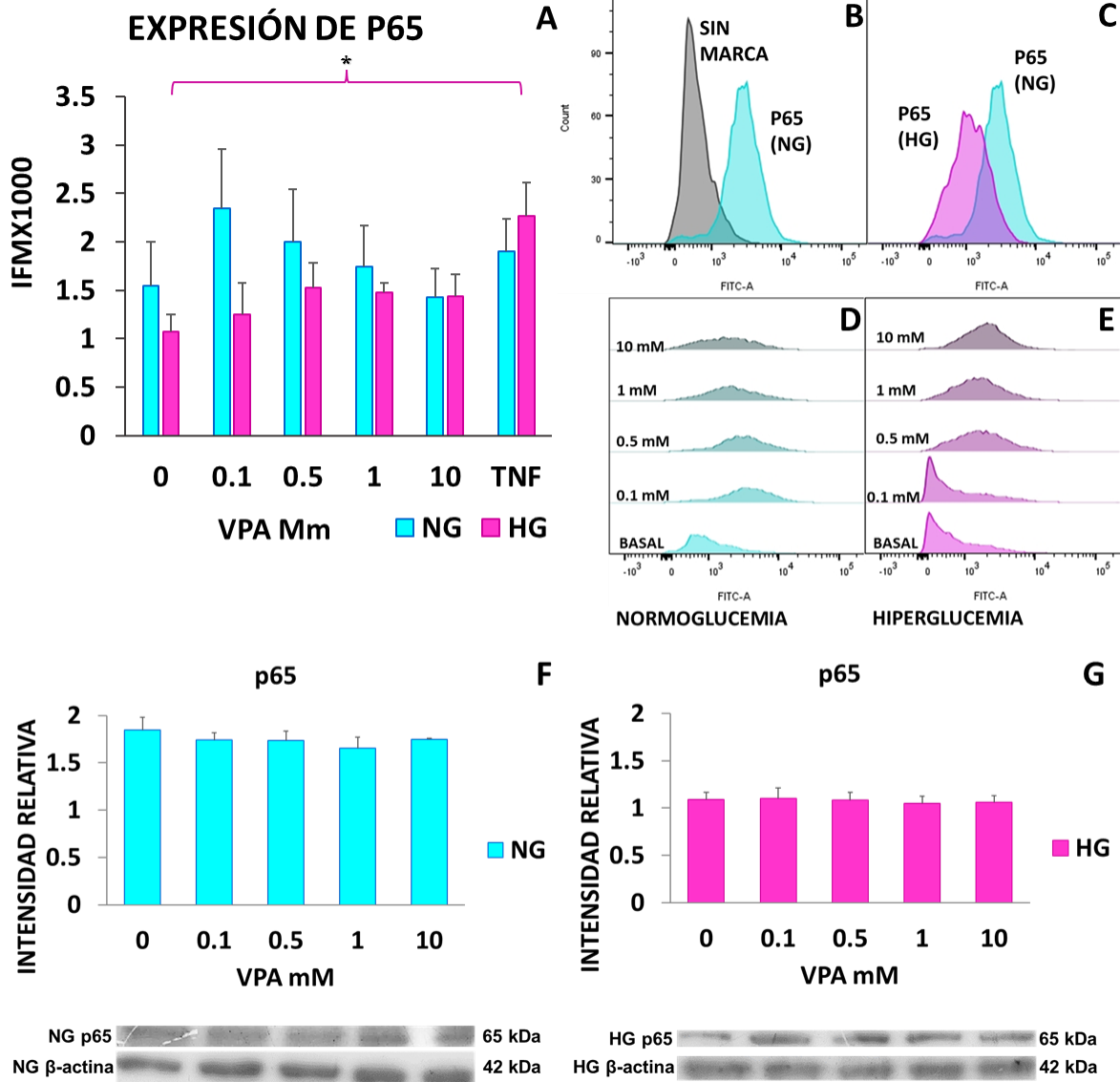


Figura 17 Expresión de p65 con NG e HG (5 y 30 mM de glucosa respectivamente) con las concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) durante 24 horas ($n=3$). Citometría de Flujo (a), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-p65/FITC en NG contra PAEC sin marca (b), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-p65/FITC en NG contra p65 en HG (c), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con p65 en NG (d), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con p65 en HG (e). p65 con WB, en NG (f) e HG (g), con las diferentes concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM), en la parte inferior se muestran las bandas que corresponden a p65 y β -actina como control de carga. Las barras representan el promedio y \pm SD. * $P>0.05$ del control (sin VPA) contra las condiciones experimentales, con t de Student.

En la Figura 18, se muestra la expresión de TLR4 (A y B), MyD88 (C y D) y p65 (E y F). a través de la técnica de tinción de inmunofluorescencia en las PAEC. La

expresión TLR4 en condiciones de NG (Figura 18A) e HG (Figura 18B), al comparar ambas imágenes se puede observar que hay un ligero aumento en la inmunofluorescencia en HG. En las Figuras 18C (NG) y 18D (HG) se observa la expresión de MyD88 que muestra que hay un ligero incremento de MyD88 debido a la HG. En las Figuras 18E (basal) y 18F (TNF- α) se muestra la expresión de p65. En condiciones basales se observa una tinción moderada de p65, la cual se incrementa de manera importante al ser estimuladas las PAEC con TNF- α (control positivo). Cabe mencionar que en la tinción con P65 en HG no observó diferencia al ser comparada con la tinción en condiciones basales (NG) (imagen no mostrada).

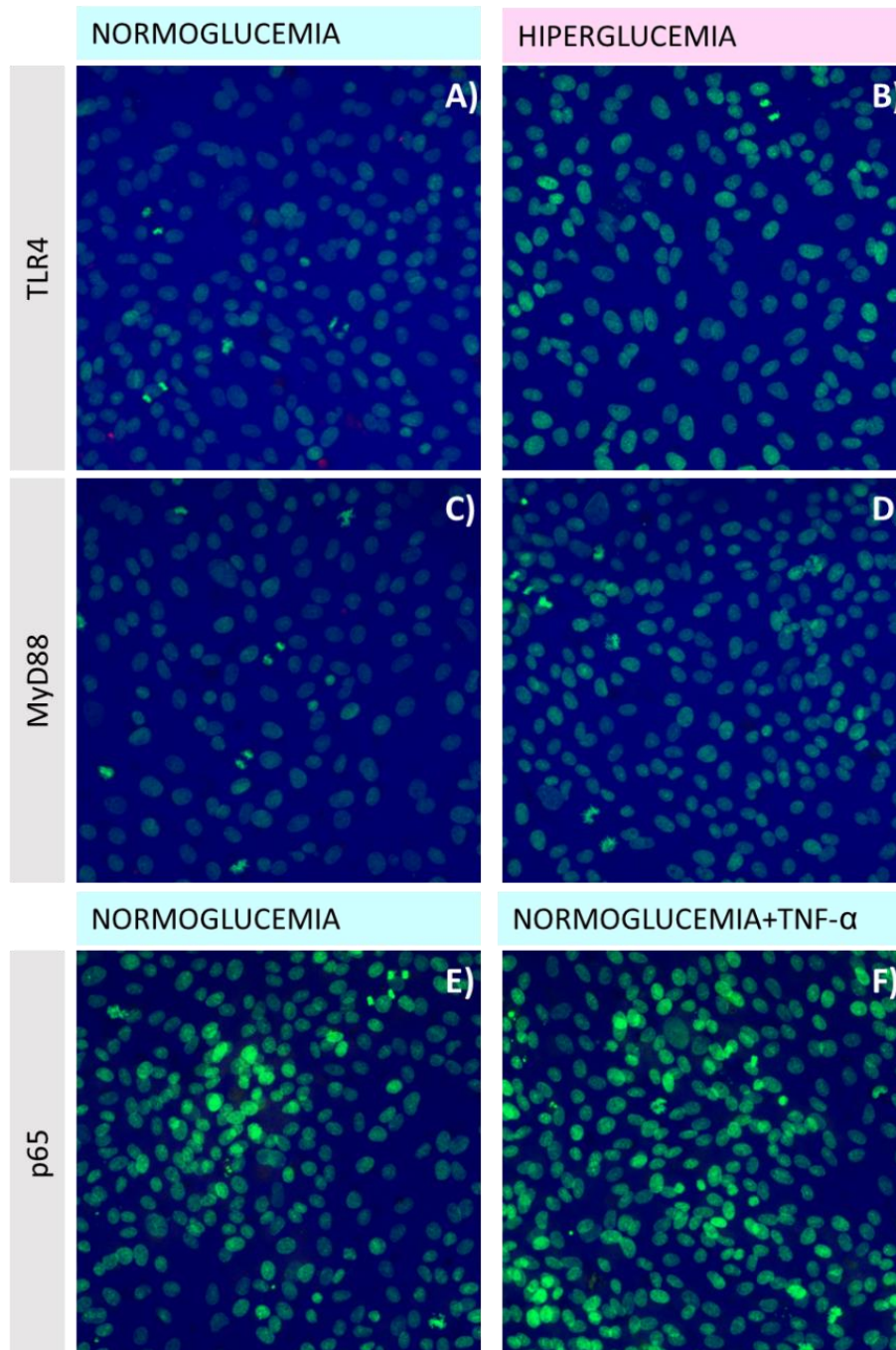


Figura 18 Expresión de TLR4, MyD88 y P65, por inmunofluorescencia. TLR4 en condiciones de NG (A) y en HG (B), MyD88 en condiciones de NG (C) e HG (D), y p65 en condiciones de NG (E) y con TNF- α (F).

En la Figura 19, se representa la expresión de ICAM-1 en las células PAEC incubadas bajo las condiciones experimentales, mediante la técnica de CF. En la Figura 19A, se observa una disminución no significativa de la expresión de ICAM-1 con HG respecto a NG. En condiciones de NG, se observa que, con las

concentraciones bajas de VPA (0.1-1 mM), hay un aumento que no llega a ser significativo, mientras que con 10 mM no hay ningún efecto. En condiciones de HG también hay una elevación solo con 0.1 y 0.5 mM de VPA y, en 1 y 10 mM, no hay efecto. En las Figuras 19B y C se muestran los espectros de emisión de las PAEC sin marca y marcadas con anti-ICAM-1/FITC, en condiciones de NG e HG, respectivamente. De manera similar, en las Figura 19D y E, están los espectros de emisión de las PAEC marcadas con ICAM-1 tanto en condiciones de NG como en HG, respectivamente, expuestas a las diferentes concentraciones de VPA.

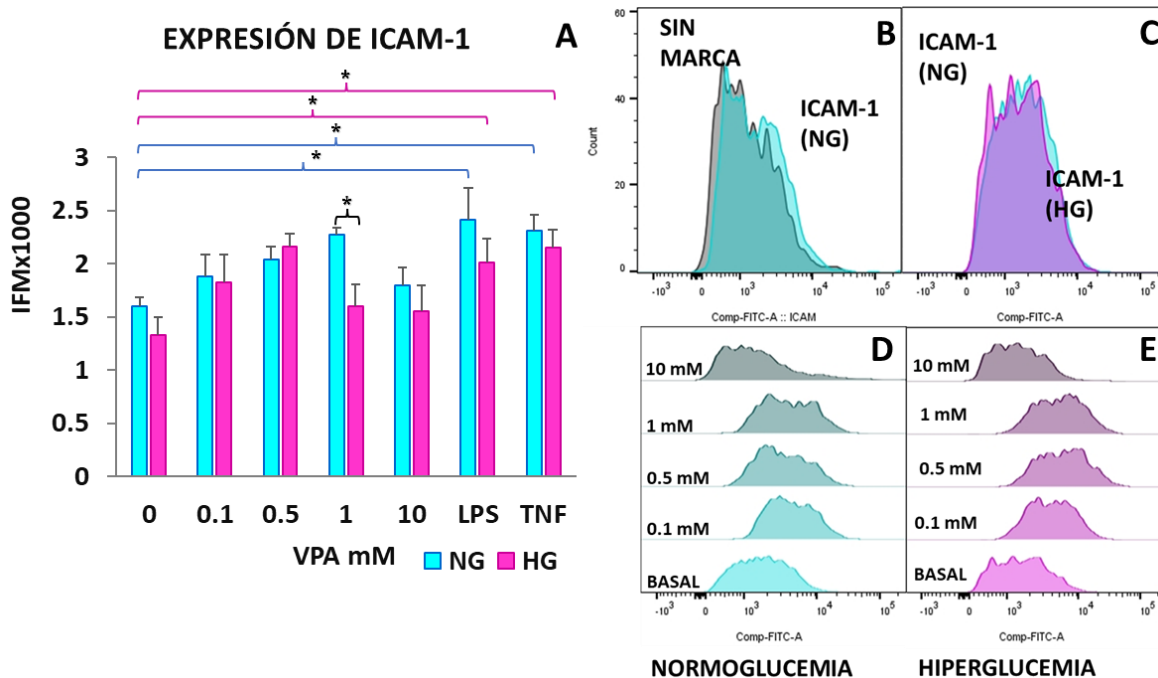


Figura 19 Expresión de ICAM-1 en con las concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) y LPS y TNF- α , como control positivo, durante 24 horas (n=3). CF (A), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-ICAM-1/FITC en NG contra PAEC sin marca (B), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-ICAM-1/FITC en NG contra p65 en HG (C), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con ICAM-1 en NG (D), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con ICAM-1 en HG (E). Las barras representan el promedio y \pm SD. * $P > 0.05$ del control (sin VPA) contra las condiciones experimentales, con t de Student.

En la Figura 20, se muestra la expresión de VCAM-1 en las PAEC, con valores de IFM, en las condiciones del diseño experimental, mediante CF. LPS y TNF- α , son utilizados como controles positivos. En condiciones de NG (Figura 20A), se observa

que la expresión de VCAM-1 aumentó de manera proporcional a las concentraciones bajas de VPA (0.1-1 mM), pero con 10 mM de VPA, se observó un menor efecto incluso con 0.1mM. También, la HG elevó la expresión de VCAM-1 respecto al basal (NG) y, aunque no es estadísticamente significativo, la diferencia sí es importante (34 %). Con el VPA en HG se aprecia un incremento dependiente de las concentraciones bajas de VPA (0.1 y 0.5), no hay efecto con 1mM de VPA y con 10 mM se observa una disminución, sin embargo, no hay diferencia significativa. En la figura 20B y C, se observan los espectros de emisión con las PAEC sin marca y marcadas con anti-VCAM-1/PE en condiciones de NG e HG, respectivamente. En las figuras 20D y E, se muestra el efecto de las diferentes concentraciones de VPA en los espectros de emisión de las PAEC marcadas con VCAM-1, tanto en condiciones de NG como en HG, respectivamente.

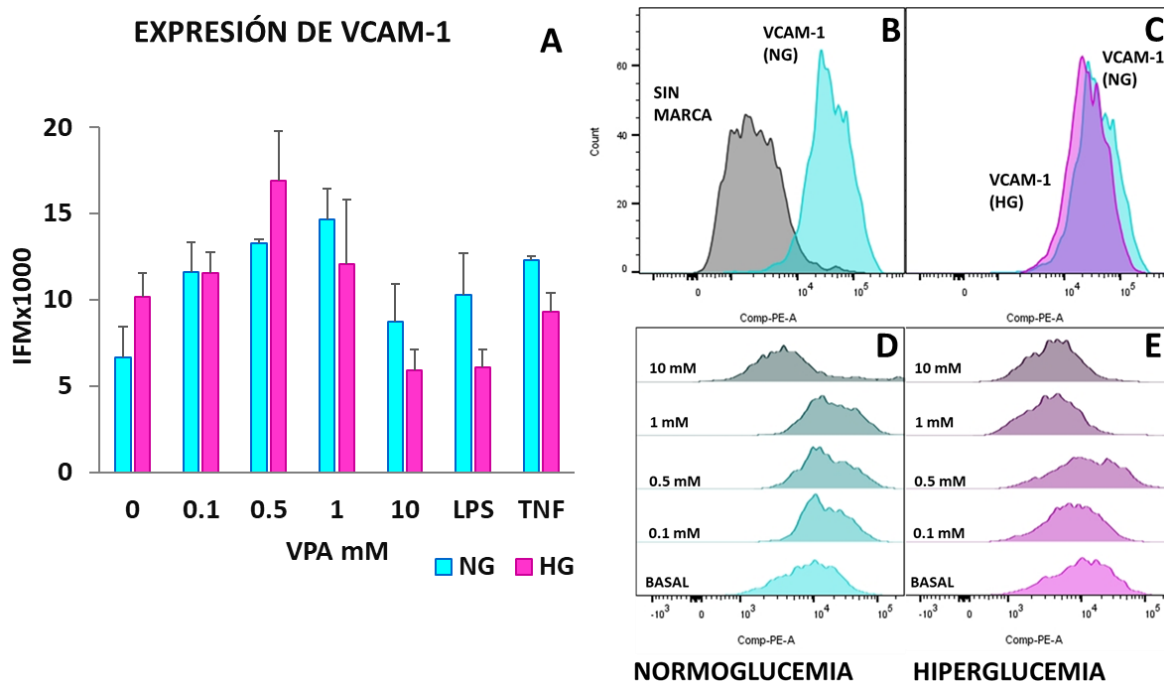


Figura 20 Expresión de VCAM-1 en con las concentraciones de VPA (0.1, 0.5, 1 y 10 mM) y LPS y TNF- α , como control positivo, durante 24 horas (n=3). CF (A), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-VCAM-1/PE en NG contra PAEC sin marca (B), espectro de emisión de PAEC marcadas con anti-VCAM-1/PE en NG contra p65 en HG (C), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con VCAM-1 en NG (D), espectros de emisión de PAEC con las diferentes concentraciones de VPA, marcadas con VCAM-1 en HG (E). Las barras representan el promedio y \pm SD. *P>0.05 del control (sin VPA) contra las condiciones experimentales, con t de Student.

10. DISCUSIÓN

Las células PAEC mostraron una tasa de crecimiento y morfología típica de las células endoteliales en cultivo, de acuerdo a lo ya descrito en la bibliografía (Vallée et al., 2002), ya que mantuvieron con la forma adoquinada de las células endoteliales, poligonal o de guijarro, tanto en las condiciones experimentales de NG e HG, como con las diferentes concentraciones de VPA.

En el ensayo de la actividad metabólica, mediante la técnica de MTT, se observó que la HG indujo un ligero incremento de la misma, comparado en NG (basal). La viabilidad celular se mantuvo por encima del 90 % en las diferentes concentraciones de VPA, excepto en 0.5 y 1 mM de VPA, en HG donde fue menor respecto al basal, no obstante, esta disminución no fue significativa. Por otro lado, la cantidad de células totales se redujo de manera significativa en la condición de 10 mM de VPA con HG, aun cuando la viabilidad fue mayor al 90 %, ya que las PAEC se observaron con más vacuolas, perdieron su forma típica adoquinada, hubo mayor espacio intercelular y había células desprendidas flotando en el medio de cultivo, dichas características podrían estar asociadas a la muerte celular.

La morfología de las células que presentan muerte celular es muy variada, depende del tipo celular y del tipo de muerte que se presente, como apoptosis o necrosis, entre dichas características están: el aumento de la permeabilidad de la membrana celular, la pérdida de contacto con células vecinas, presencia de protuberancias en la membrana plasmática, reducción de tamaño celular, desprendimiento de células adheridas, condensación y posterior fragmentación de la cromatina y, en el citoplasma, se presenta degradación de los organelos (Ziegler y Groscurth, 2004).

La relación entre la disminución del número de células totales y la actividad metabólica, al aumentar la concentración de VPA podría estar relacionado con la muerte celular, como lo que fue observado en el trabajo de Tsoimongyn y cols. (2013) que encontraron que el VPA puede promover la apoptosis e incluso la necrosis de hepatocitos (Iorga y Dara, 2019). Por otro lado, las concentraciones menores a 1mM de VPA no afectaron ni la viabilidad ni el número de células totales,

lo cual es muy parecido a lo que encontraron Michaelis y cols. (2006) en células endoteliales HUVEC que habían sido desprovistas de suero durante 48 horas para inducir muerte celular; ellos observaron que el VPA (1mM) mejoró la viabilidad de los cultivos.

Los TLR's son receptores de inmunidad innata y se ha documentado que la HG induce la expresión de los receptores TLR del 1 al 10 en neutrófilos y monocitos de pacientes con DM1 (Gupta et al., 2016). En el caso de TLR4, se ha observado un incremento en su expresión, en células endoteliales de microvasculatura de retina proveniente de muestras de humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética (Wang et al., 2015). Nuestros resultados de citometría y WB, muestran que la HG no tiene ningún efecto sobre la expresión de TLR4 en las células PAEC. Sin embargo, sí se observó un incremento significativo cuando son estimuladas con LPS, comparado con la condición basal, mediante CF. La detección de la expresión de TLR4 por inmunofluorescencia sí muestra un incremento debido a HG, esto sugiere que la HG sí tuvo un efecto al elevar la expresión de este receptor. Esto genera la duda sobre si la baja respuesta de las PAEC a las altas concentraciones de glucosa, analizada mediante CF, se deba a una baja especificidad del anticuerpo utilizado para la detección o a la baja sensibilidad a la glucosa, ya que las PAEC pueden requerir hasta 10 mM de glucosa para crecer y mantenerse adecuadas durante el cultivo.

Por otro lado, el VPA induce la expresión de TLR4, principalmente con 10 mM, al ser detectado por CF, ya que, al evaluar la expresión de TLR4 mediante WB, se observa que disminuye, pero sin efecto debido a la concentración de VPA. Las concentraciones elevadas de VPA pueden tener efectos adversos inmediatos, pues se ha reportado que la sobredosis de VPA, (niveles en el suero mayores a 110 ug/ml) en pacientes que reciben este medicamento para el tratamiento de la epilepsia, han llegado a la sala de urgencias médicas con síntomas que van desde toxicidad severa, coma, edema cerebral, acidosis metabólica, hepatotoxicidad, pancreatitis, hiperamonemia y trombocitopenia (Lin et al., 2008; Davidson et al., 2011).

Hasta el momento de esta investigación no se encontraron reportes de las implicaciones de la sobredosis con VPA, aun así, no se pueden descartar los efectos a corto y largo plazo en la expresión de los indicadores de inflamación del sistema inmune o cardiovascular como se ha dado el caso con ICAM-1 soluble, que es utilizado como un importante indicador de disfunción endotelial y mayor riesgo cardiovascular en pacientes supervivientes de sobredosis de cocaína (Manini et al., 2021).

MyD88 es una molécula adaptadora relacionada con la vía de señalización de TLR4, se ha reportado que la HG eleva su expresión en células endoteliales de microvasculatura de retina humana (HMVREC) con 5.5, 15 y 25 mM de glucosa durante 24 horas (Rajamani y Jialil, 2014) y en células mesoteliales peritoneales humanas (HPMC) estimuladas con 50 mM de glucosa durante 24 horas (Choi et al., 2017). En nuestro estudio, cuando se detecta la expresión de MyD88 mediante WB, la HG tiene un efecto inductor, lo cual no fue observado mediante CF. Esto podría deberse a varios motivos; uno puede ser la diferencia en las técnicas para preparación de las muestras, ya que, en el caso de CF, las células fueron fijadas con para-formaldehído para conservar su integridad celular, aunado a que las células tuvieron que ser permeabilizadas para marcarlas con los anticuerpos primarios y secundario (AF-488), por tratarse de moléculas intracelulares. Con el WB, esta técnica implicó que las PAEC fueran lisadas para cuantificar la proteína total y someterla a separación por electroforesis. También, existe una diferencia en la sensibilidad de ambas técnicas utilizadas. Una consideración adicional es la tasa de recambio de MyD88, ya que en algunos trabajos se realizó la adquisición de las células desde los 30 minutos hasta las 12 horas, después de la estimulación con VPA, en CF o con WB (Kühne et al., 2021, Jalbarganiin et al., 2014), en tanto que nosotros hicimos las determinaciones entre 18 y 24 horas de incubación.

El VPA inhibió la expresión de MyD88 mediante WB, el cual fue independiente de la concentración. Lo anterior permite pensar que en este modelo hay una relación directa entre la expresión de TLR4 y MyD88. Jalbarganiin et al. (2014) reportaron que, en una línea celular de macrófagos, el VPA no afectó la expresión de MyD88

después de 12 horas, incubando con 2mM de VPA y detectado mediante inmunoprecipitación (Jambalganiin et al., 2014), pero en el trabajo de Kühne et al. (2021) observaron que solo 3mM de VPA en macrófagos humanos disminuyó significativamente la cantidad del ARNm de MyD88.

Al estudiar la expresión de la subunidad p65, del factor NF- κ B, en las PAEC, la HG disminuyó su expresión, cuando se detectó con CF. Sin embargo, se ha reportado un efecto contrario, ya que la HG favorece la expresión de p65 en células endoteliales glomerulares humanas (Wang et al., 2022) y en un modelo de memoria metabólica con células endoteliales de cordón umbilical humano HUVEC (HG4d/NG4d) que p65 aumentó con HG (Yao et al., 2022). Es destacable que, cuando las células PAEC son estimuladas con TNF- α , sí se eleva la expresión de P65, tanto en NG como en HG, por lo que es posible suponer que las PAEC pudieran ser un modelo impreciso para el estudio de las altas concentraciones de glucosa, de tal manera se sugiere como posibilidad el uso de células endoteliales de microvasculatura humana (HMEC), ya que esta línea no requiere de altas concentraciones de glucosa para su mantenimiento.

Considerando que p65 es una molécula que se transloca al núcleo y actúa como factor de transcripción que se une al DNA para regular la expresión de moléculas proinflamatorias, como son las moléculas de adhesión, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. A pesar de que usamos el DAPI como indicador de núcleos, no se pudieron observar diferencias en la expresión de p65 entre núcleo y citoplasma en nuestros ensayos. Sin embargo, si se pudo observar un incremento en la fluorescencia con p65 inducida por TNF- α , usado como control positivo. En este ensayo. Para evaluar la translocación nuclear de p65 se requieren experimentos más específicos, como fraccionamiento de proteína citosólica y nuclear, seguida de la detección de proteína de cada fracción mediante WB, o bien, ensayos más específicos de inmunofluorescencia nuclear.

El VPA no mostró tener efecto en la expresión de p65, estudiado mediante WB, sin embargo, mediante CF, se elevó la expresión conforme aumentó la concentración de VPA hasta 1 mM en NG y 0.5 mM en HG, respecto a la condición basal. En el

trabajo de Kühne et al. (2021) se requirió una concentración de VPA 3mM de 6 a 24 horas para disminuir la expresión de p65 en macrófagos humanos (posterior a una pre-estimulación con LPS de 30 minutos), lo que indica que hay diferencias en la sensibilidad al VPA dependiendo del tipo celular (Kühne et al., 2021). Matalón et al. (2010) mencionan que a partir de la concentración de 2 mM de VPA en plasma sanguíneo, ya se pueden observar efectos tóxicos en humanos, y varios trabajos (Cho et al., 2014; Yamanegi et al., 2015; Kumanishi et al., 2019) han concluido que la concentración terapéutica más adecuada de VPA en varios modelos de cultivo celular es de 1mM.

Varios estudios indican que los niveles altos de glucosa en sangre inducen la activación de las moléculas de la vía de señalización TLR4/MyD88/p65, como en el caso de cultivos primarios de células mesoteliales peritoneales (HMPC) obtenidas de paciente en cirugía abdominal (Choi et al., 2017) o, en monocitos de circulación periféricas, obtenidos de pacientes con DM2 (Dasu et al., 2010). Sin embargo, nosotros observamos que en las PAEC el efecto por la alta concentración de glucosa fue inverso, probablemente debido a que esta línea celular puede requerir hasta 10mM de glucosa para su mantenimiento normal en cultivo. Nosotros logramos mantener la línea en crecimiento normal con 5mM de glucosa para lograr realizar los experimentos con las concentraciones normal y alta que se manejan en humanos. Por otro lado, solo se encontró un estudio donde se evaluó el efecto del VPA (en nanopartículas) en macrófagos humanos y concluyeron que este medicamento es capaz de disminuir la expresión y secreción de TNF- α a través de la vía de señalización de TLR4/MyD88/p65 inducida por LPS, encontrando que podían modificar positivamente la expresión de las quimiocinas CCL4, CCL19, CXCL6, CXCL10, CCR3, CCR7 y de receptor IL23R, CEBPB (Kühne et al., 2021).

Las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 son consideradas marcadores de la respuesta inflamatoria en células endoteliales (Guan et al., 2013), principalmente VCAM-1, ya que es una molécula inducible por la estimulación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , e IL-1 β (Panés, 1999). En el caso de ICAM-1, aunque es una molécula que se expresa de manera constitutiva, también puede ser inducida

por los mismos factores que VCAM-1. La concentración sérica de ICAM-1 también se considera como como indicador de DE, como se observó en un estudio en sueros de pacientes que sobrevivieron a sobredosis de cocaína (Manini et al., 2021). Como la elevación de la glucosa no tuvo ningún efecto sobre la expresión de ICAM-1 en nuestro estudio, y los controles positivos TNF- α y LPS si muestran el incremento, es necesario realizar los ensayos combinando TNF- α o LPS con HG, debido a la baja sensibilidad a la glucosa por las PAEC, ya que aunque se realizaron pruebas con tres marcas diferentes de anticuerpos contra ICAM-1 y se utilizó el anticuerpo que brindó la mejor respuesta, la diferencia entre las células marcadas y no marcadas fue muy baja, cuando se detectó su expresión por citometría. Sin embargo, en el trabajo de Ruszkowska-Ciastek et al., (2015) encontraron que pacientes con DM2 sin un buen control de glucosa, la expresión de ICAM-1 fue menor comparada con los pacientes que si tenían un buen control de glucosa, lo que permite hacer una comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde la expresión de ICAM-1 en las PAEC es más alta en NG. Aunado a lo anterior, Li et al. (2010) obtuvieron células endoteliales de arteria coronaria (CAECs) de pacientes donadores con DM1 y de personas sanas y observaron que las CAECs provenientes de los pacientes mantenían una elevada expresión de ICAM-1 en respuesta a una estimulación de TLR2 y TLR4, en comparación con las CAECs de personas sin DM1 (Li et al., 2010).

Por otro lado, el VPA incrementó la expresión de ICAM-1 de manera dual con las concentraciones de 0.1 hasta 1 mM, pero con 10 mM no se observó ningún efecto, aun en HG. Li et al. (2015) proponen que el VPA (5 mM) actúa como inhibidor de iHDAC e inhibe la expresión de ICAM-1 a través de la vía de NF- κ B, basado en sus observaciones en cortes del lecho vascular de riñón en un modelo de hemorragia en ratón (Li et al., 2015), mientras que Chang et al. (2021) evaluaron el efecto del VPA (0.5-8 mM) en la secreción de ICAM-1 en células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical modificadas (EA.hy926 cells) y observaron que al aumentar la concentración de VPA también aumentó la secreción de ICAM-1 soluble (tiempo de incubación no mostrado) (Chang et al., 2022). Estos resultados sugieren que el efecto del VPA puede ser duales: inhibir o estimular la expresión de ICAM-1,

dependiendo del nivel de VPA y el tipo de célula o tejido. En general, se puede observar que la expresión de ICAM-1 puede ser modificada con VPA de forma independiente de la concentración y del aumento de glucosa.

La HG indujo la expresión de VCAM en las células PAEC lo que se reflejó en un aumento del 30 % respecto a NG y pudo ser disminuida con las concentraciones bajas de VPA (0.1, 0.5 y 1 mM). Lo anterior permite suponer que el VPA tiene un mejor efecto regulando los niveles de VCAM-1 que ICAM-1, lo cual podría ser beneficioso ya que el aumento en la circulación de VCAM-1 puede ser considerada como más dañino, para la función del sistema cardiovascular. Song et al. (2015) utilizaron VCAM-1 como marcador de DE e inflamación en células endoteliales de aorta de bovino (BAEC), estimuladas simultáneamente con 25 mM de glucosa y 10 ng/ml de TNF- α durante 24 horas. En tanto que, Haubner (2007) en células endoteliales de aorta provenientes de baipás (HSVEC) (incubadas con 30 mM de glucosa durante 72 horas) (Haubner et al., 2007) y Gustavsson (2010) en cortes de vasos sanguíneos de retina de ratón (con diabetes inducida con estreptozotocina) (Gustavsson et al., 2010), observaron que la HG puede elevar la expresión de VCAM-1. De igual forma, en muestras de plasma obtenidas de pacientes con DM1, Ruzkowska-Ciastek et al. (2015) observaron que la expresión de VCAM-1 fue mayor respecto a un grupo control con personas sin DM1. El único estudio encontrado en la bibliografía, respecto al efecto del VPA sobre la expresión de VCAM-1 fue el de Li et al. (2015) donde proponen que el VPA (5 mM) actúa como iHDAC ya que disminuye la expresión de VCAM-1 a través de la vía de NF- κ B, en cortes del lecho vascular en riñón en un modelo de hemorragia en ratón. Por otro lado, también evaluaron el efecto de VPA en células endoteliales de vena de cordón umbilical de humano (HUVEC) estimuladas con TNF- α en ausencia o presencia de VPA por 4 horas y observaron un aumento significativo de la expresión de ICAM-1.

11. CONCLUSIONES

- I. La morfología de las células se conservó en NG con VPA, pero con altas concentraciones de VPA e HG, hay un deterioro de la morfología y una disminución en la cantidad de células totales.
- II. No hubo diferencia en la expresión de TLR4 en ambas condiciones NG e HG. En HG con VPA hay una disminución de la expresión de TLR4, cabe resaltar que con la concentración de 10 mM de VPA en NG, hubo una sobreexpresión de TLR4 (Figura 21a).
- III. La HG provocó un aumento de la expresión de MyD88 respecto a NG (Figura 21b) y el VPA no tuvo efecto sobre la expresión de MyD88.
- IV. La expresión de p65 disminuyó con HG respecto a NG, por otro lado, las concentraciones inferiores a 1 mM de VPA estimularon la expresión de esta molécula y, a partir de esa concentración, disminuye su expresión.
- V. En el caso de ICAM-1, la expresión en HG es menor respecto a NG y el efecto del VPA estimula o inhibe su expresión dependiendo de la concentración de una baja (0.1 a 5 mM) o alta (1 a 10 mM) concentración de VPA. Con VCAM-1, se elevó la expresión de VCAM-1 en HG respecto a NG (Figura 21b), similar que con ICAM-1, la concentración más baja incrementó la expresión de VCAM-1 y con el aumento en la concentración de VPA, disminuyó su expresión.
- VI. En general, la baja concentración VPA puede inducir la expresión de TLR4, p65, ICAM-1 y VCAM-1, y con una alta concentración se elevó la expresión de éstas mismas moléculas (Figura 21c), a excepción de TLR4 con 10 mM en NG donde hubo un drástico incremento de su expresión (Figura 21a). La concentración recomendada para reducir la expresión de las moléculas inflamatorias es de 1 mM de VPA.

Perspectivas

Los resultados de nuestro trabajo indican que es necesario realizar más ensayos utilizando otro anticuerpo que pueda ser más específico, aunque en el mercado no hay muchos sobre anticuerpos para la especie porcina. También se considera necesario realizar la corroboración de estos resultados mediante ensayos de PCR reversa para determinar la expresión del mRNA.

Modelo propuesto de la vía de señalización de TLR4 modulado por Hiperglucemia y VPA

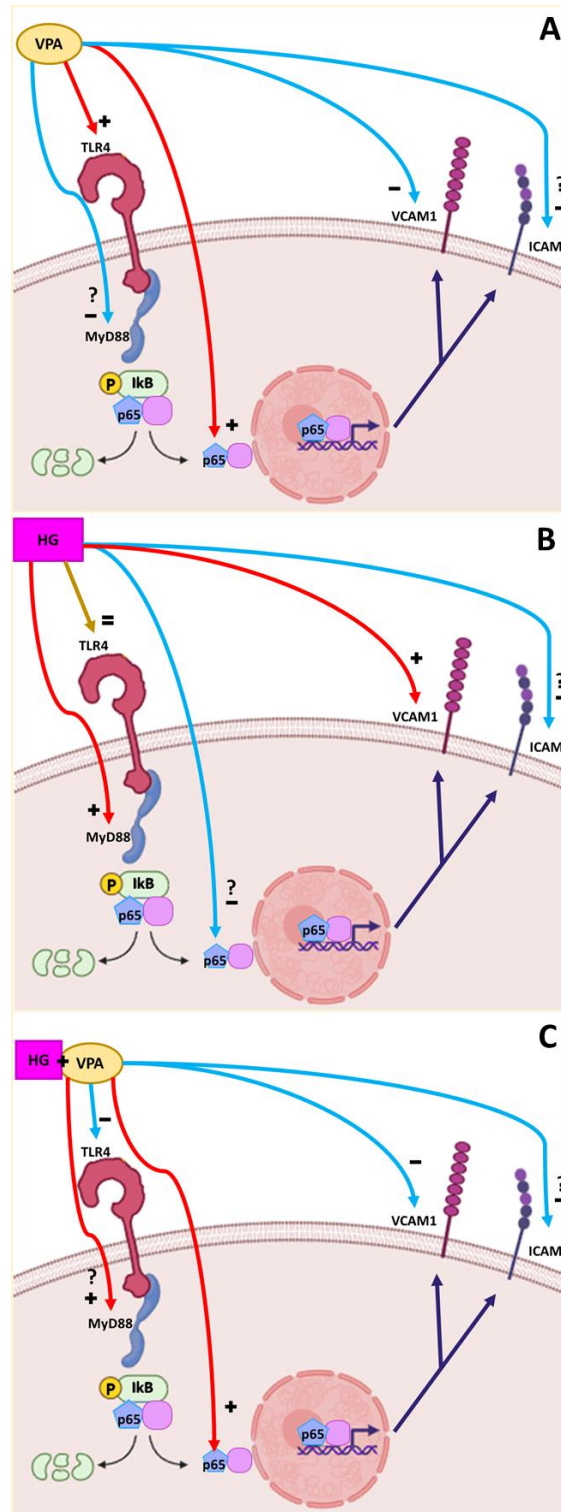


Figura 21 Efecto del VPA en la expresión de TLR4, MyD88, p65, ICAM-1 y VCAM-1, en las células PAEC en condiciones de HG (A), NG (B) e HG con VPA (B).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akindede, A. J., Otugour, E., Singh, D., Ota, D., & Benebo, A. S. (2015). Hypoglycemic, antilipidemic and antioxidant effects of valproic acid in alloxan-induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 762, 174-183. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.044>
- Aksamitiene, E., Hoek, J. B., Kholodenko, B., & Kiyatkin, A. (2007). Multistrip Western blotting to increase quantitative data output. *Electrophoresis*, 28(18), 3163-3173. doi: <https://doi.org/10.1002/elps.200700002>
- Alexanderson, G., Rosas, O., González, A., Estévez, J., & Orozco, A. (2003). Disfunción endotelial e hipertension arterial. *Medicina Interna de México*, 19(4), 221-242. doi: https://doi.org/10.1007/5584_2016_90
- American Diabetes Association Professional Practice Committee (2022). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes care*, 45(Suppl 1), S17–S38. doi: <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
- Antonelli, M., & Kushner, I. (2017). It's time to redefine inflammation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(5), 1787-1791. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.201601326R>
- Baumgartner-Parzer, S. M. (1997). Glycemia and regulation of endothelial adhesion molecules. *29(12)*, 636-638. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2007-979116>
- Berbudi, A., Rahmadika, N., Tiahiadi, A. I., & Rusiami, R. (2020). Type 2 diabetes and its impact on the Immune System. *Current diabetes reviews*, 17(1), 442-449. doi: <https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838>
- Chang, M. C., Wang, T. M., Chein, H. H., Pan, Y. H., Tsai, Y. L., Jeng, P. Y., . . . Jeng, J. H. (2022). Effect of butyrate a bacterial by-product on the viability and ICAM-1 expression/production of human vascular endothelial cells: ROLE in

infectious pulpal/periapical diseases. *International endodontic journal*, 55(1), 38-53. doi: <https://doi.org/10.1111/iej.13614>

Chemos. (21 de octubre de 2019). Ficha de Datos de Seguridad Sodium Valproate. Recuperado el 29 de enero de 2024, de Chemos: https://www.chemos.de/import/data/msds/ES_es/1069-66-5-A0227896-ES-es.pdf

Cho, D. H., Park, J. H., Joo Lee, E., Jong Won, K., Lee, S. H., Kim, Y. H., . . . Han, S. H. (2014). Valproic acid increases NO production via the SH-PTP1-CDK5-eNOS-Ser(116) signaling cascade in endothelial cells and mice . *Free radical biology & medicine*, 76, 96-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.043>

Cho, H. M., Seok, Y. M., Lee, H. A., Song, M., & Kim, I. (2018). Repression of Transcriptional Activity of Forkhead Box O1 by Histone Deacetylase Inhibitors Ameliorates Hyperglycemia in Type 2 Diabetic Rats. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3539. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19113539>

Choi, S. Y., Ryu, H. M., Choi, J. H., Kim, C. D., Kim, Y. L., & Park, S. H. (2017). The role of Toll-like receptor 4 in high-glucose-induced inflammatory and fibrosis markers in human peritoneal mesothelial cells. *International urology and nephrology*, 49(1), 171-181. doi: <https://doi.org/10.1007/s11255-016-1430-9>

Clyne, A. M. (2021). Endothelial response to glucose: dysfunction, metabolism, and transport. *Biochemical Society transactions*, 49(1), 313-325. doi: <https://doi.org/10.1042/BST20200611>

Dasu, M. R., Devaraj, S., Park, S., & Jialil, I. (2010). Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetes subjects. *Diabetes care*, 33(4), 861-868. doi: <https://doi.org/10.2337/dc09-1799>

Davidson, A. S., Milan , A. M., & Roberts, N. B. (2011). The consequences of valproate overdose. *Clinical chemistry*, 57(9), 1233-1237. doi: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.151225>

- Deandfield, J., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115(10), 1285-1295. doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859>
- Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *105*(2), 141-150. doi: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>
- Fagundes, S. B. (2008). Ácido Valpróico: revisão. *Revista Neurociências*, 16(2), 130–136. doi: <https://doi.org/10.34024/rnc.2008.v16.8650>
- Federation, I. D. (2021). *Diabetes Atlas* (10th ed. ed.). Brussels, Belgium. Obtenido de <https://www.diabetesatlas.org>
- Felisbino, M. B., Ziemann, M., Khurana, I., Okabe, J., Al-Hasani, K., Maxwell, S., . . . El-Osta, A. (2021). Valproic acid influences the expression of genes implicated with hyperglycemia-induced complement and coagulation pathways. *Scientific reports*, 11(1), 2163. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81794-4>
- Guan, Q., Wang, X., Gao, L., Chen, J., Liu, Y., Yu, C., . . . Zhao, J. (2013). Hydrogen sulfide supresses high glucose-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 62(3), 278-285. doi: <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31829875ef>
- Gupta, S., Maratha, A., Siednienko, J., Natarajan, A., Gajanayake, T., Hoiashi, S., & Miggin, S. (2016). Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications. *Scientific receptors*, 7(1), 7623. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07230-8>
- Gustavsson , C., Agardh, C. D., Zettergvit, A. V., Nilsson, J., Agardh, E., & Gomez, M. F. (2010). Vascular cellular adhesion molecular-1 (VCAM-1) expression in mice retinal vesserls is affected by both hyperglycemia and hyperlipidemia. *5*(9), e12699. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012699>

- Haubner, F., Lehle, K., Münzel, D., Schmid, C., Birnbaum, D. E., & Preuner, J. G. (2007). Hyperglycemia increases the levels of vascular cellular adhesion molecule-1 and monocyte-chemoattractant-protein-1 in the diabetic endothelial cell. *Biochemical and biophysical research communications*, 360(3), 560-565. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.044>
- Hirase, T., & Node, K. (2007). Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 302(3), 2012. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00325.2011>
- INEGI. (12 de febrero de 2021). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Obtenido de https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_Diabetes2021.pdf
- Iorga, A., & Dara, L. (2019). Cell death in drug-induced liver injury. *Advances in pharmacology*, 85, 31-74. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.01.006>
- iStock. (9 de marzo de 2017). Arteria elástica humana saludable. Recuperado el 29 de enero de 2024, de iStock: <https://www.istockphoto.com/es/vector/arteria-el%C3%A1stica-humana-saludable-gm650222860-118194807>
- Jambalganiin, U., Tsoimongyn, B., Koide, N., Odkhuu, E., Naiki, Y., Komatsu, T., . . . Yokochi, T. (2014). A novel mechanism for inhibition of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production by valproic acid. *International immunopharmacology*, 20(1), 181-187. doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.032>
- Jouve, N. (2020). La epigenética: sus mecanismos y significado en la regulación génica. *Cuadernos de Bioética*, 31(103), 405-419. doi: 10.30444/CB.79
- Konukoglu, D., & Uzun, H. (2017). Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*, 956, 511-540. doi: https://doi.org/10.1007/5584_2016_90

- Kühne, M., Kretzer, C., Lindemann, H., Godmann, M., Heinze, T., Werz, O., & Heinzl, T. (2021). Biocompatible valproic acid-couplenanoparticles attenuate lipopolisacaryde-induce inflammation. *International journal of pharmaceutics*, 601, 120567. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120567>
- Kumanishi, S., Yamanegi, K., Nishiura, H., Fujihara, Y., Kobayashi, K., Nakasho, K., . . . Yoshiva, S. (2019). Epigenetic modulators hydralazine and sodium valproate act synergistically in VEGF-mediated anti-angiogenesis and VEGF interference in human osteosarcoma and vascular endothelial cells. *International journal of oncology*, 55(1), 167-178. doi: <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4811>
- Lasker, R. D. (1993). The Diabetes Control and Complications Trial - Implications for Policy and Practice. *New England Journal of Medicine*, 329(14), 1035-1036. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291410>
- Leifer, C. A., & Medvedev, A. E. (2016). Molecular mechanisms of regulations of Toll-like receptor signaling. *Journal of leucocyte biology*, 100(5), 927-941. doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.2MR0316-117RR>
- Li, J., Jin, C., Cleveland, J. C., Ao, L., Xu, D., Fullerton, D. A., & Meng, X. (2010). Enhanced inflammatory responses to toll-like receptor 2/4 stimulation in type diabetic coronary artery endothelial cells: the effect of insulin. *Cardiovascular diabetology*, 9, 90. doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2840-9-90>
- Li, R., Aslan, A., Yan, R., Jongman, R. M., Moser, J., Zwiers, P. J., van Meurs, M. (2015). Histone DEacetylase Inhibition and IκB Kinase/Nuclear Factor κB Blockade Ameliorate Microvascular Proinflammatory Responses Associated With Hemorrhagic Shock/Resuscitation in Mice. *Critical care medicine*, 43(12), e567-e580. doi: <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001203>
- Lin, W., Tsao, J. H., & Tsai, S. J. (2008). Delayed thrombocytopenia after valproic acid overdose. *General hospital psychiatry*, 30(5), 489-490. doi: <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsy.2008.03.002>

- Lizarzaburu, J. C. (2013). Síndrome Metabólico: concepto y aplicación práctica. *Anales de la Facultad de Medicina*, 74(4), 315-329. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832013000400009&lng=es&tlng=es.
- López, M. E., Sosa, M. A., & Labrousse, N. (2007). Síndrome Metabólico. *Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina*, 174, 12-15. Recuperado el 29 de enero de 2024 de https://med.unne.edu.ar/revistas/revista174/3_174.pdf
- Löscher, W. (1999). The discovery of valproate. In: Löscher, W. (eds) *Valproate. Milestones in Drug Therapy*. Birkhäuser, Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8759-5_1
- Löscher, W. (2002). Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS*, 16(10), 669-694. doi: <https://doi.org/10.2165/00023210-200216100-00003>
- Luc, K., Schramm-Luc, A., Guzik, T. J., & Mikolajczyk, T. P. (2019). Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *Journal of Physiol Pharmacology*, 70(6), 809-824. doi: <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>
- Macias, C. (2006). Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 22(2), 1-11. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000200003&lng=es&tlng=es.
- Manini, A. F., Gibson, C. L., Miller, M. L., Richardson, L. D., Vargas-Torres, C. C., Vedanthan, R., & Hurd, Y. L. (2021). Biomarkers of endothelial dysfunction in cocaine overdose and overdose-related cardiovascular events. *Addiction biology*, 26(2), e12901. doi: <https://doi.org/10.1111/adb.12901>
- Matalon, S., Palmer, B. E., Nold, M. F., Furlan, A., Kassu, A., Fossati, G., . . . Dinarello, C. (1999). The histone deacetylase inhibitor ITF2357 decreases surface CXCR4 and CCR5 expression on CD4(+) T-cells and monocytes and is superior to valproic acid for latent HIV-1 expression in vitro. *Journal of*

acquired immune deficiency syndromes , 54(1), 1-9. doi: <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181d3dca3>

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 40(6), 819-829. doi: <https://doi.org/10.1038/nature06246>

Michaelis, M., Suhan, T., Michaelis, U. R., Beek, K., Rorhweiler, F., Tausch, L., . . . Cinatl, J. J. (2006). Valproic acid induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 activations and inhibits apoptosis in endothelial cells. *Cell death and differentiation*, 13(3), 446-453. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401759>

Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffman, A. (2016). Signaling via the NF- κ B system . Wiley interdisciplinary reviews. *Systems biology and medicine*, 8(3), 227-241. doi: <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>

Moreno, C., & Sánchez, A. (2003). Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Revista Médica Universitaria Navarra*, 47(3), 29-33. Obtenido de <https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/35412/1/Rev%20Med%20Univ%20Navarra%202003%20ArticuloRevision3%5B1%5D.pdf>

Muniandy, S., Qvist, R., Yan, G. O., Bee, C. J., Chu, Y. K., & Rayappan, A. V. (2009). The oxidative stress of hyperglycemia and the inflammation process in endothelial cells . *The journal of medical investigation: JMI*, 56(1-2), 6-10. doi: <https://doi.org/10.2152/jmi.56.6>

Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2008). *Inmunología de Janeway*. México: McGrawHill.

Napetschnig, J., & Wu, H. (2013). Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annual review of biophysics*, 42, 443-468. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130338>

Nimma, S., Gu, W., Maruta, N., Li, Y., Pan, M., Saikot, F. K., . . . Kobe, B. (2021). Structural Evolution onf TIR-Domain Signalosomes. *frontiers in Immunology*,

12, 784484. Obtenido de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.784484/full>

Ohnishi, H., Tochio, H., Orii, K. E., Kimura, T., Hiroaki, H., Kondo, N., & Shirakawa, M. (2009). Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), 10260-10265. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0812956106>

Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D., & Unakalamba, C. B. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4, 46-57. doi: <https://doi.org/10.5897/jpap2013.0001>

Pahwa, R., & Jialil, I. (2016). Hyperglycemia Induces Toll-Like Receptors Activity Through Increased Oxidative Stress. *Metabolic syndrome and related disorders*, 14(5), 239-241. doi: <https://doi.org/10.1089/met.2016.29006.pah>

Panés, J. (1999). Moléculas de adhesión: su papel en la fisiopatología en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterol Hepatol*, 22, 514-524. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-moleculas-adhesion-su-papel-fisiopatologia-8166>

Rabadiya, S., Bhadada, S., Dubhrejya, A., Vaishnay, D., & Patel, B. (2018). Magnesium valproate ameliorates type 1 diabetes and cardiomyopathy in diabetic rats through estrogen receptors. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 97, 919-927. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.137>

Rajamani, U., & Jialil, I. (2014). Hyperglycemia Induces Toll-Like Receptor-2 and -4 Expression and Activity in Human Microvascular Retinal Endothelial Cells: Implications for Diabetes Retinopathy. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 15. doi: <https://doi.org/10.1155/2020/5071954>

- Rask-Madsen, C., & King, G. L. (2013). Vascular Complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell metabolism*, 17(1), 20-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.012>
- Roden, M. (2016). Diabetes mellitus - Definition, Klassifikation und Diagnose. *Wien Klin Wochenschr*, 128, S37-S40. doi: <https://doi.org/10.1007/s00508-015-0931-3>
- Romoli, M., Mazzocchetti, P., D'Alonzo, R., Siliquini, S., Rinaldi, V. E., Verroti, A., . . . Costa, C. (2019). Valproic Acid and Epilepsy From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Current neuropharmacology*, 17(10), 926-946. doi: <https://doi.org/10.2174/1570159X17666181227165722>
- Rudich, A., Tirosh, A., Potashnik, R., Hemi, R., Kanety, H., & Bashan, N. (1998). Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 47(10), 1562-1569. doi: <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.10.1562>
- Ruszkowska-Ciastek, B., Sokup, A., Wernik, T., Ruprecht, Z., Góralczyk, B., Góralczyk, K., . . . Rość, D. (2015). Effect of uncontrolled hyperglycemia on levels of adhesion molecules in patients with diabetes mellitus type 2. *Journal of Zhejiang University Science*, 16(5), 355-361. doi: <https://doi.org/10.1631/jzus.B1400218>
- Simionescu, M. (2007). Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. 27(2), 266-274. doi: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000253884.13901.e4>
- Singh, A., Boden, G., & Rao, A. K. (2015). Tissue factor and Toll-like Receptor (TLR) 4 hyperglycemia-hyperinsulinaemia. Effects in healthy subjects, and type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Thrombosis and haemostasis*, 113(4), 750-758. doi: <https://doi.org/10.1160/TH14-10-0884>
- Song, K. H., Park, J. H., Jo, I., Park, J. Y., Seo, J., Kim, S. A., & Cho, D. H. (2016). Telmisartan attenuates hyperglycemia-exacerbated VCAM-1 expression monocytes adhesion in TNFalpha-stimulated endothelial cells by inhibiting

IKKbeta expression. *Vascular pharmacology*, 78, 43-52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.10.001>

Soria, R., Schcolnik, A., Rodríguez, G., Campillo, M., Puebla, N., Estrada, S., Chávez, A. (2019). Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells. *Journal of Immunology Research*, 24. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/9678098>

Statista. (2021). Ranking de los países con mayor número de adultos con diabetes a nivel mundial en 2021. Recuperado el 29 de enero de 2024, de Statista: <https://es.statista.com/estadisticas/636099/paises-con-mayor-numero-de-adultos-con-diabetes-a-nivel-mundial/>

Sturtzel, C. (2017). Endothelial Cells. *Advances in experimental medicina and biology*, 1003, 71-91. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-57613-8_4

Suh, H. S., Choi, S., Khattar, P., Choi, N., & Lee, S. C. (2010). Histone deacetylase inhibitors suppress the expression of inflammatory and innate immune response genes in human microglia and astrocytes. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of Society on NeuroImmune Pharmacology*, 5(4), 521-532. doi: <https://doi.org/10.1007/s11481-010-9192-0>

Taha, I. M., Abdu Allah, A. M., & Abd El Gayed, E. M. (2018). Expression of toll-like receptor 4 and its connections with type 2 diabetes mellitus. *Cellular and molecular biology (Noise le Grand, France)*, 64(13), 15-20. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30403590/>

Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in immunology*, 16(1), 3-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

- Treples, T., Zeiher, A. M., & Fichtlschrer, S. (2006). The endothelium and inflammation. *Endothelium: journal of endothelial cell research*, 13(6), 423-429. doi: <https://doi.org/10.1080/10623320601061862>
- Tsan, M. F., & Gao, B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of leucocyte biology*, 76(3), 514-519. doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.0304127>
- Tsolmogyn, B., Koide, N., Odkhuu, E., Hague, A., Naiki, Y., Komatsu, T., Yokochi, T. (2013). Lipopolysaccharide prevents valproic acid-induced apoptosis via activation of nuclear factor kappa B and inhibition of p53 activation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(2), 100-105. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.04.011>
- Ueda, Y., & Willmore, L. J. (2000). Molecular regulation of glutamate and GABA transporter proteins by valproic acid in rat hippocampus during epileptogenesis. *Experimental brain research*, 133(3), 334-339. doi: <https://doi.org/10.1007/s002210000443>
- Vadillo, E., & Pelayo, R. (2012). Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *Revista de Investigación Clínica*, 64(5), 461-476. doi: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2012/nn125g.pdf>
- Vallée, I., Tait, S., & Powell, P. P. (2002). African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. *Journal of virology*, 75(21), 10372-10382. doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.21.10372-10382.2001>
- van der Oever, I. A., Raterman, H. G., Nurmohamed, M. T., & Simsek, S. (2010). Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Mediators of Inflammation*, 2010, 792393. doi: <https://doi.org/10.1155/2010/792393>
- Wang, F., Hou, W., Li, X., Lu, L., Huang, T., Zhu, M., & Miao, C. (2022). SETD8 cooperates with MZF1 to participate in hyperglycemia-induced endothelial inflammation via elevation of WNT5A levels in diabetic nephropathy. *Cellular & molecular biology letters*, 27(1), 30. doi: <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00328-6>

- Wang, L., Wang, J., Fang, J., Zhou, H., Liu, X., & Su, S. B. (2015). High glucose induces and activates Toll-like receptor 4 in endothelial cells of diabetic retinopathy. *Diabetology & metabolic syndrome*, 7(89), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1186/s13098-015-0086-4>
- Wang, X., Antony, V., Wang, Y., Wu, G., & Liang, G. (2020). Pattern recognitions receptor-mediated inflammation in diabetic vascular complications. *Medical research reviews*, 40(6), 2466-2485. doi: <https://doi.org/10.1002/med.21711>
- Yamanegi, K., Kawabe, M., Futani, H., Nishiura, H., Yamada, N., Kato-Kogoe, N., Nakasho, K. (2015). Sodium valproate a histone deacetylase inhibitor, modulates the vascular endothelial growth inhibitor-mediated cell death in human osteosarcoma and vascular endothelial cells. *International journal of oncology*, 46(5), 1994-2002. doi: <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2924>
- Yamato, E. (2018). High dose of histone deacetylase inhibitors affects insulin secretory mechanism of pancreatic beta cell line. *Endocrine Regulations*, 51(1), 21-26. doi: <https://doi.org/10.2478/enr-2018-0004>
- Yang, W. S., Kim, J. J., Lee, M. J., Lee, E. K., & Park, S. K. (2018). ADAM17-Mediated Ectodomain Shedding of Toll-Like Receptor 4 as a Negative Feedback Regulation in Lipopolysaccharide-Activated Aortic Endothelial Cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 45(5), 1851-1862. doi: <https://doi.org/10.1159/000487876>
- Yao, Y., Song, Q., Hu, C., Da, X., Yu, Y., He, Z., Wang, Q. K. (2022). Endothelial cell metabolic memory causes cardiovascular dysfunction in diabetes. *Cardiovascular research*, 118(1), 196-211. doi: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab013>
- Zhou, Y., Liu, J., Jiang, C., Chen, J., Feng, X., Chen, W., . . . Zhang, W. (2021). A traditional herbal formula, Deng-Shi-Qing-Mai-Tang, regulates TLR4/NF-κB signaling pathway to reduce inflammatory response in PM2.5-induced lung

injury. Phytomedicine, 91, 153665. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153665>

Ziegler, U., & Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society, 12(2), 124-128. doi:
<https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>

13. ANEXO

13.1. Proteína de Carga

Experimento 1

ml/50mg	Buffer de carga
13,8	4,6
12,8	4,3
14,0	4,7
12,4	4,1
12,0	4,0
24,9	8,3
10,9	3,6
12,1	4,0
12,3	4,1
13,4	4,5
11,3	3,8
11,4	3,8

Experimento 2

ml/50mg	Buffer de carga
16,5	5,5
16,4	5,5
29,5	9,8
22,9	7,6
23,0	7,7
19,5	6,5
17,7	5,9
16,2	5,4

15,8	5,3
18,0	6,0
17,6	5,9
17,0	5,7

Experimento 3

ml/50mg	Buffer de carga
22,5	7,5
25,9	8,6
22,9	7,6
18,9	6,3
19,0	6,3
30,8	10,3
15,5	5,2
17,8	5,9
12,7	4,2
14,4	4,8
15,9	5,3
15,0	5,0

13.1.2. Películas de Western Blot

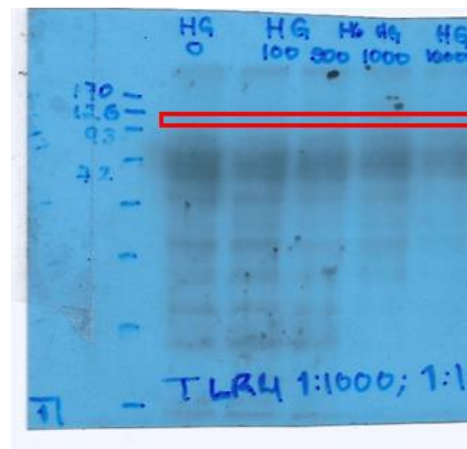
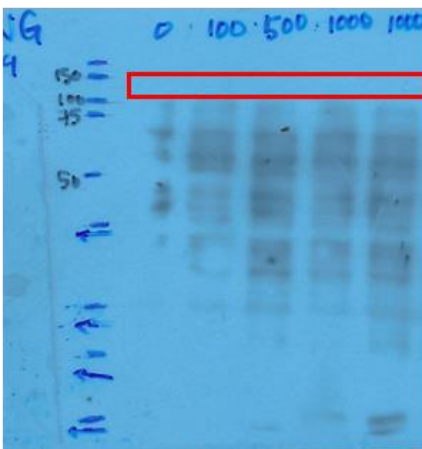
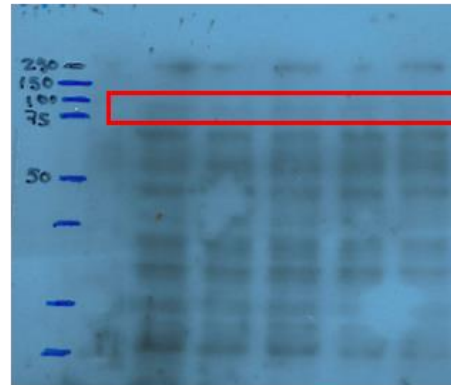
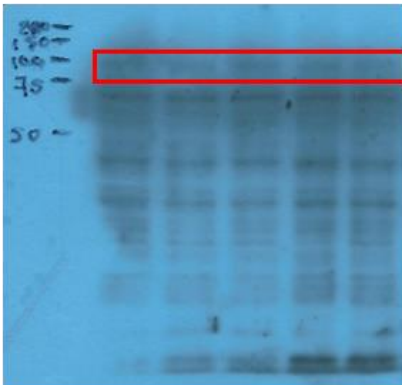
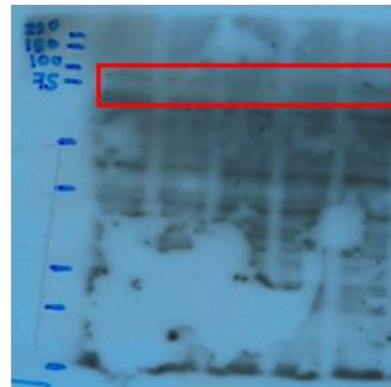
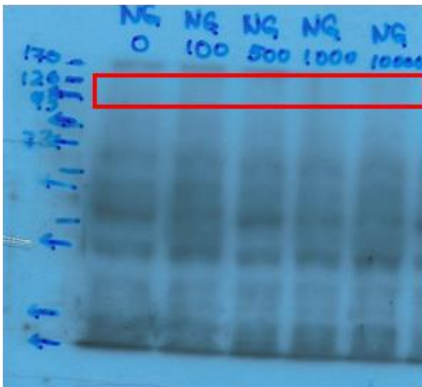
TLR4

Anticuerpo primario: anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology SC-13593) dilución 1:2000 en TBS/Twen.

Anticuerpo secundario: anti-mouse 1:20000

NG		VPA mM		
0	0.1	0.5	1	10

HG		VPA Mm		
0	0.1	0.5	1	10



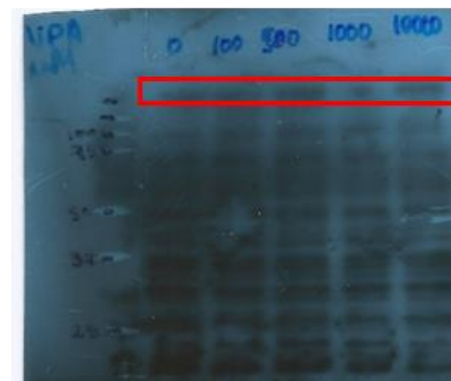
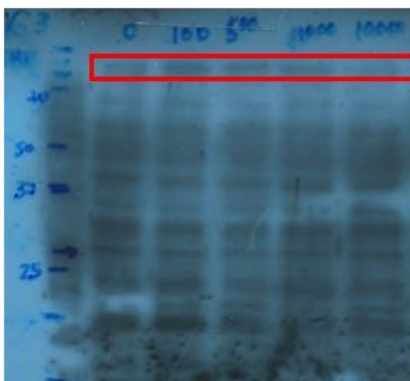
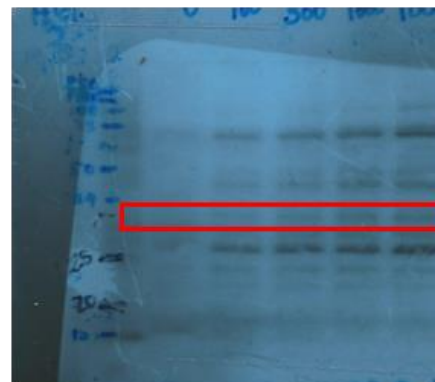
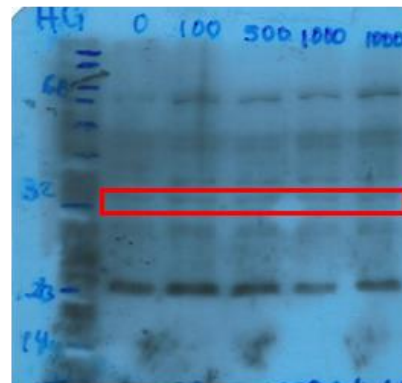
MyD88

Anticuerpo primario: anti-MyD88 (Santa Cruz Biotechnology SC-11356) dilución 1:1000 en TBS/Twen.

Anticuerpo secundario: anti-rabbit 1:10000

NG		VPA mM		
0	0.1	0.5	1	10

HG		VPA Mm		
0	0.1	0.5	1	10



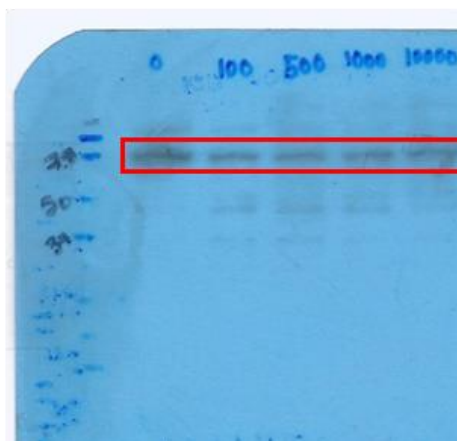
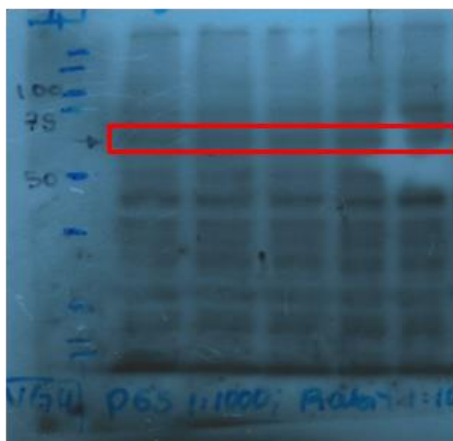
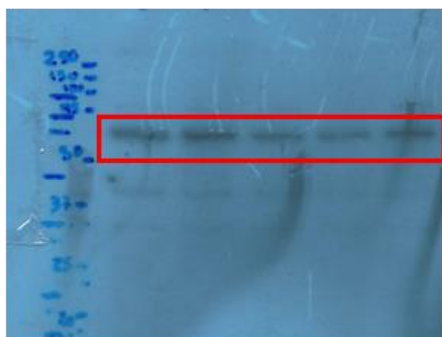
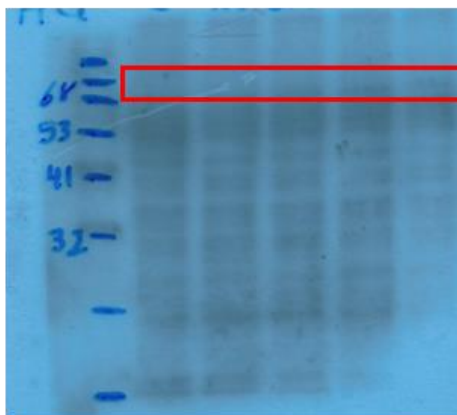
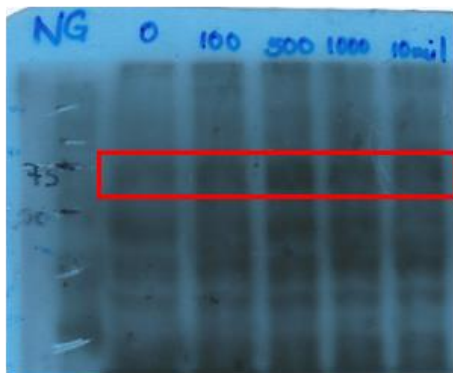
p65

Anticuerpo primario: anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology SC-372) dilución 1:1000 en TBS/Twen.

Anticuerpo secundario: anti-rabbit 1:10000

NG		VPA mM		
0	0.1	0.5	1	10

HG		VPA Mm		
0	0.1	0.5	1	10



β -Actina

Anticuerpo primario: anti- β -Actina (Santa Cruz Biotechnology) dilución 1:2000 en TBS/Twen.

Anticuerpo secundario: anti-mouse 1:20000

NG		VPA mM		
0	0.1	0.5	1	10

HG		VPA Mm		
0	0.1	0.5	1	10

