

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

Asociación de FoxO3a con el daño a ADN en Fibrosis Pulmonar Idiopática y Neumonitis por Hipersensibilidad

ASESORES:

Interno: Dra. Julia Pérez Ramos.



Externo: Dra. Iliana Herrera Fuentes.



ALUMNA:

Zamora Marín Libni Fernanda

2183067532

Lugar de realización: Laboratorio de Biopatología Pulmonar,
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
"Ismael Cosío Villegas"

Fecha de inicio: 23 de enero de 2023

Fecha de término: 24 de julio de 2023

Ciudad de México, a 31 de marzo de 2024

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	5
<i>FoxO3a</i>	5
<i>Estructura de FoxO3a</i>	5
<i>Funciones de FoxO3a</i>	7
<i>Regulación de FoxO3a</i>	12
<i>Gen p21</i>	13
<i>Gen p53</i>	15
<i>Gen GADD45A</i>	20
<i>Enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID)</i>	21
<i>Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)</i>	22
<i>Fibrosis Pulmonar Idiopática y FoxO3a</i>	25
<i>Neumonitis por Hipersensibilidad (NH)</i>	26
<i>Patogénesis de la Neumonitis por Hipersensibilidad</i>	27
<i>Inmunopatogénesis de la Neumonitis por Hipersensibilidad</i>	29
<i>Daño a ADN con H₂O₂</i>	30
OBJETIVOS	32
<i>General</i>	32
<i>Específicos</i>	33
HIPÓTESIS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
<i>Obtención y cultivo de fibroblastos</i>	33
<i>Extracción de ARN</i>	34
<i>Preparación de lisado de células</i>	34
<i>Extracto núcleo/citoplasma</i>	35
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	35
<i>Western Blot</i>	37
<i>Ensayo Cometa</i>	40
RESULTADOS	42
<i>RT-qPCR</i>	42

<i>Ensayo Cometa</i>	45
<i>Western Blot</i>	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIÓN	57
REFERENCIAS	59
APÉNDICES	65

INTRODUCCIÓN

FoxO3a es un miembro de familia de genes forkhead box “cabeza de tenedor” (FOX) que participan en la regulación de la transcripción, así como en una variedad de procesos celulares que incluyen: apoptosis, proliferación, progresión del ciclo celular, daño en el ADN y tumorigénesis. Por otro lado, responde a diversos tipos de estrés celular, como radiación UV y estrés oxidativo. Su función está regulada por una red compleja de procesos que incluyen la represión postranscripcional de microARN, modificaciones postraduccionales e interacciones proteína-proteína.

FoxO3a no solo funciona a nivel de ciclo celular, sino que está activado en respuesta al estrés celular, este efecto se ha observado en distintos modelos celulares y se ha descubierto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están relacionadas con la activación de FoxO3a para proteger a las células de un entorno que induce estrés. (Liu *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 2011).

El factor de transcripción FoxO3a también está involucrado en diversas patologías, donde se encuentran las enfermedades pulmonares como la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) caracterizada por la presencia de fibroblastos y miofibroblastos hiperproliferativos que favorecen al aumento de depósito de matriz extracelular (MEC), lo que distorsiona la arquitectura pulmonar normal y provoca la pérdida de la función respiratoria (Al-Tamari *et al.*, 2018) y la Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) que es un síndrome pulmonar complejo mediado por el sistema inmunológico, causado por la inhalación de una amplia variedad de antígenos a los que el individuo ha sido sensibilizado previamente (Spagnolo *et al.*, 2015).

La toxicidad oxidativa es un desafío frecuente para la homeostasis celular que puede desencadenarse por una variedad de factores endógenos y ambientales, las especies reactivas de oxígeno dañan las macromoléculas celulares, incluido el ADN.

La evidencia sugiere que el estrés oxidativo crónico puede inducir vías protectoras que reducen la genotoxicidad. Comprender la lesión oxidante del ADN y su reparación es fundamental para comprender la fisiopatología de una amplia gama de trastornos humanos (Van Houten *et al.*, 2018; Tafurt Cardona & Marin Morales, 2014).

Es por ello, que en la presente investigación se evaluó el papel de FoxO3a en el daño al ADN inducido por una fuente exógena de estrés oxidativo celular ($650 \mu\text{M}$ H_2O_2) en fibroblastos de FPI, NH y líneas control; a nivel gen mediante RT-qPCR donde se evaluó la expresión de FoxO3a, p21 y p53, a nivel proteína de p21, p53, FoxO3a, Ac-FoxO3a y GADD45a mediante Western Blot y finalmente se analizó el daño al ADN por medio de la técnica del Ensayo Cometa.

MARCO TEÓRICO

FoxO3a

FoxO3a es un miembro de familia de genes forkhead box “cabeza de tenedor” (FOX) que participan en la regulación de la transcripción, así como en una variedad de procesos celulares, que incluyen: apoptosis, proliferación, progresión del ciclo celular, daño en el ADN y tumorigénesis.

Así mismo, responde a diversos tipos de estrés celular, como: radiación UV y estrés oxidativo.

Sin embargo, la función de FoxO3a está regulada por una red compleja de procesos que incluyen la represión postranscripcional de microARN, modificaciones postraduccionales e interacciones proteína-proteína. (Liu *et al.*, 2018)

Actualmente, se han encontrado más de 2000 miembros de la familia FOX que se expresan en una variedad de especies, desde la levadura hasta el ser humano. Las proteínas FOX regulan un amplio espectro de procesos biológicos implicados en la homeostasis y el desarrollo normal. (Liu *et al.*, 2018)

Estructura de FoxO3a

El factor de transcripción FoxO3a tiene un tamaño de aproximadamente 71 kDa y su estructura se conserva en diferentes especies (Liu *et al.*, 2018).

Presenta cinco dominios (ver figura 1):

- Un dominio de unión a ADN de hélice-giro-hélice (FKH) responsable de la interacción directa entre FoxO3a y el ADN, el cual modula la interacción con el receptor de estrógeno α (ER α) y p53.
- Dos secuencias de localización nuclear (NLS), necesarias para la translocación de FoxO3a del citoplasma al núcleo y también la liberación de FoxO3a desde el núcleo.
- Una secuencia de exportación nuclear (NES).
- Un dominio de transactivación C-terminal (TA) vital para la transactivación de los genes diana de FoxO3a.

Los dominios de FoxO3a contienen sitios de modificaciones postraduccionales como (ver figura 1):

- ❖ Fosforilación de serina/treonina por Akt (proteína quinasa B).
- ❖ SGK (proteína quinasa inducida por suero y glucocorticoides).

- ❖ MST1 y IKK β (cinasa Ik β).
- ❖ Residuos acetilados por CBP (proteína de unión al elemento sensible al AMP cíclico (CREB)).

Tecnologías recientes han revelado que la estructura primaria de FoxO3a contiene residuos altamente conservados de la hélice H3, siendo el principal elemento de reconocimiento del ADN que se une a un surco principal, que comprende la mayoría de las bases directas específicas. De igual manera, se ha demostrado que las proteínas FOXO reconocen dos secuencias consenso 5'-GTAAA(T/C)AA-3', conocida como el elemento de unión a miembros de la familia Daf-16 y 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3' (IRE) conocida como secuencia sensible a la insulina. La estructura cristalina reveló que la hélice de reconocimiento H3 se acoplaba perpendicularmente al surco principal, haciendo amplios contactos con el ADN. (Nho & Hergert, 2014).

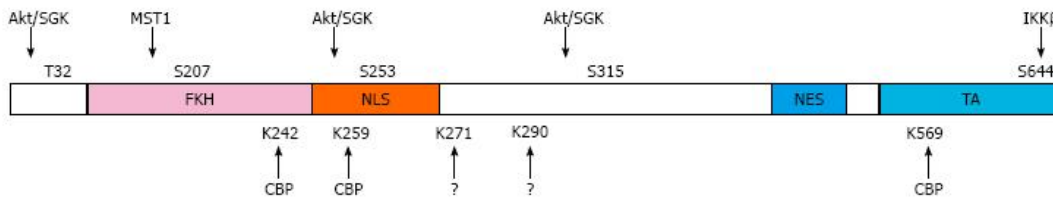


Figura 1. Estructura de FoxO3a con dominios y sitios de modificaciones postraduccionales (Nho & Hergert, 2014).

Aunque el dominio de unión al ADN de cabeza de horquilla con aproximadamente 100 residuos de aminoácidos está muy conservado, los otros dominios son muy divergentes en las proteínas FOX. Por lo tanto, tienen especificidades de unión y efectos celulares muy diferentes. De acuerdo con los dominios adicionales y la conservación de la secuencia, la familia FOX se agrupa en varias subfamilias como: FOXM, FOXK, FOXA y FOXO.

El sistema de mamíferos consta de cuatro miembros: FOXO1, FOXO3a, FOXO4 y FOXO6, que se sabe están regulados por la vía de señalización de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K)-PKB (Liu *et al.*, 2018).

Funciones de FoxO3a

FoxO3a es un factor de transcripción central que media múltiples procesos fisiológicos y patológicos (ver figura 2), al inducir la transcripción de genes diana implicados en la apoptosis, proliferación, progresión del ciclo celular, supervivencia y el daño del ADN. También responde a varios tipos de estrés celular como radiación UV y el estrés oxidativo.

Además, FoxO3a está fuertemente asociado con la longevidad humana. De igual manera, participa en la regulación del proceso de autofagia en músculos y células cancerosas.

Las múltiples funciones de FoxO3a indican que la desregulación de la expresión y/o actividad de FoxO3a puede conducir a diversas enfermedades, particularmente cáncer (Liu *et al.*, 2018).

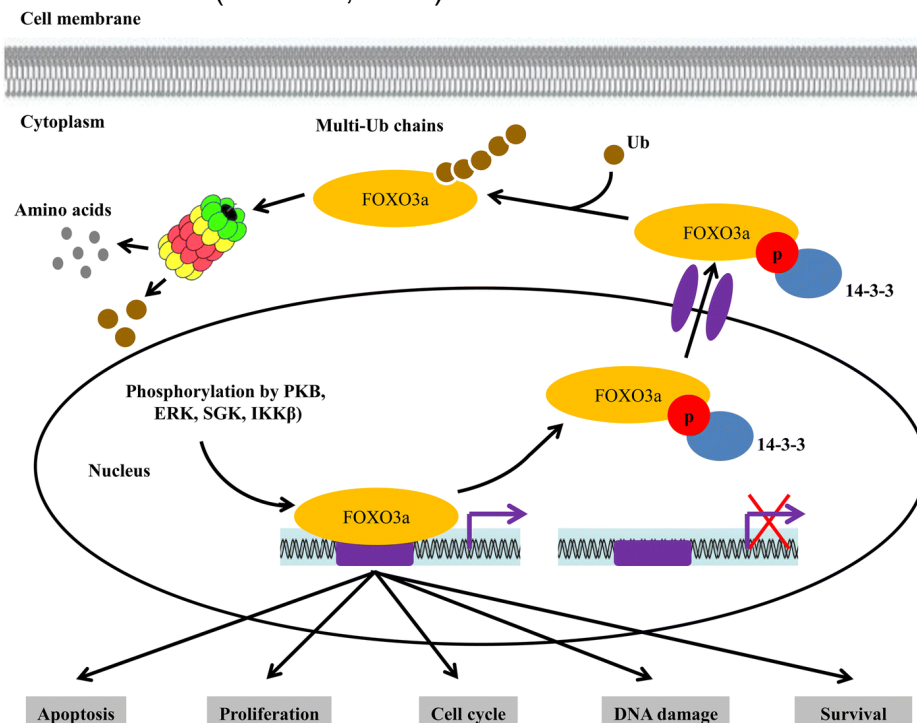


Figura 2. Funciones y regulación de FoxO3a. La forma no fosforilada de FoxO3a ubicada en el núcleo, media activamente en múltiples procesos celulares, incluida la apoptosis celular, proliferación, ciclo celular, supervivencia y daño del ADN al inducir la transcripción de sus genes diana que dependen de los estímulos anteriores.

La señalización del factor de crecimiento inducida por la activación de proteínas quinasas como PKB, ERK, SGK, IKKβ, determina la actividad de fosforilación de FoxO3a (en forma activa). FoxO3a fosforilado, se une a la proteína 14-3-3, lo que en consecuencia conduce a la exportación nuclear de FoxO3a. En el citoplasma, FoxO3a se ubiquitina y se degrada de manera dependiente del proteosoma (Liu *et al.*, 2018).

Proliferación celular y apoptosis

La supresión de la progresión del ciclo celular y la promoción de la apoptosis, son los dos procesos celulares más importantes regulados por FoxO, ya que la activación de FoxO3a aumenta el ciclo celular en las proteínas inhibidoras p21 y p27, las cuales posteriormente suprimen la transición del ciclo celular G1 a S. Aunque p27 está regulado transcripcionalmente por FoxO3a a través del eje dependiente de PI3K/Akt, se ha demostrado que también está regulado a través de la vía dependiente de FoxO3a/NF- κ B/c-Myc (Nho & Hergert, 2014).

Algunos genes diana que activa FoxO3a los cuales promueven la apoptosis celular son: Bim, TRAIL, PUMA, el ligando Fas (FasL), Noxa, p21 y p27. FoxO3a se une directamente a la región promotora de Bim, causando la apoptosis de células neuronales (Nowak *et al.*, 2007).

Resistencia al estrés

FoxO3a no solo funciona a nivel de ciclo celular, sino que está activado en respuesta al estrés celular en condiciones desfavorables.

FoxO3a participa en la protección contra el estrés oxidativo al inducir la expresión de proteínas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD).

Este efecto de FoxO3a se ha observado en distintos modelos celulares y se ha descubierto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están relacionadas con la activación de FoxO3a para proteger a las células de un entorno que induce estrés. (Liu *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 2011).

McCormick y colaboradores (2011) mencionan que en *Caenorhabditis elegans*, el factor de transcripción homólogo de la familia FOXO (DAF-16) regula hasta 230 genes involucrados en la respuesta al estrés (McCormick *et al.*, 2011).

Por otro lado, Hori y colaboradores (2013) agregan que las ROS desreguladas inducen apoptosis y están asociadas a múltiples enfermedades del envejecimiento. La Sirtuina 1 (SIRT1) disminuye los niveles de ROS y promueve la supervivencia celular en condiciones de estrés oxidativo. FoxO3a y otros miembros de la familia FoxO aumentan los niveles de SOD y protegen las células del estrés oxidativo de una manera dependiente de SIRT1 (Hori *et al.*, 2013).

Con base en un estudio de Brunet y colaboradores (2004), se demostró que SIRT1 y FoxO3a forman un complejo en las células en respuesta al estrés oxidativo, SIRT1 aumenta la capacidad de FoxO3a para inducir la detención del ciclo celular y la resistencia al estrés oxidativo, sin embargo; inhibió la función de FoxO3a para inducir muerte celular. Estos resultados mostraron que la desacetilación de FoxO3a por SIRT1 en respuesta a ROS puede ser un importante mecanismo de autodefensa para desintoxicar moléculas reactivas

dañinas, lo que sugiere además que SIRT1 está relacionado con la protección de las células de un entorno que induce estrés al alejar la respuesta dependiente de FoxO de la apoptosis y hacia la resistencia al estrés (Brunet *et al.*, 2004).

Daño al ADN

El factor de transcripción FoxO3a desempeña un papel fundamental en la respuesta celular mediante la regulación de la expresión de genes esenciales para la detección, mediación, señalización y reparación del daño al ADN, así como para el control de la senescencia, el ciclo celular y la apoptosis (De Moraes *et al.*, 2016).

En las células eucariotas, el mantenimiento de la estabilidad genómica depende de la acción coordinada de una red de procesos celulares, incluida la replicación y reparación del ADN, la progresión del ciclo celular, entre otros. Las quinasas ATM y ATR son las enzimas principales que participan en la vía de señalización de respuesta al daño del ADN (DDR), donde se detectan y señalan problemas en el ADN, se detiene la progresión del ciclo celular y se activan mecanismos apropiados de reparación del ADN, o bien, se eliminan las células con genomas irreparables (Maréchal & Zou, 2013) (ver figura 3).

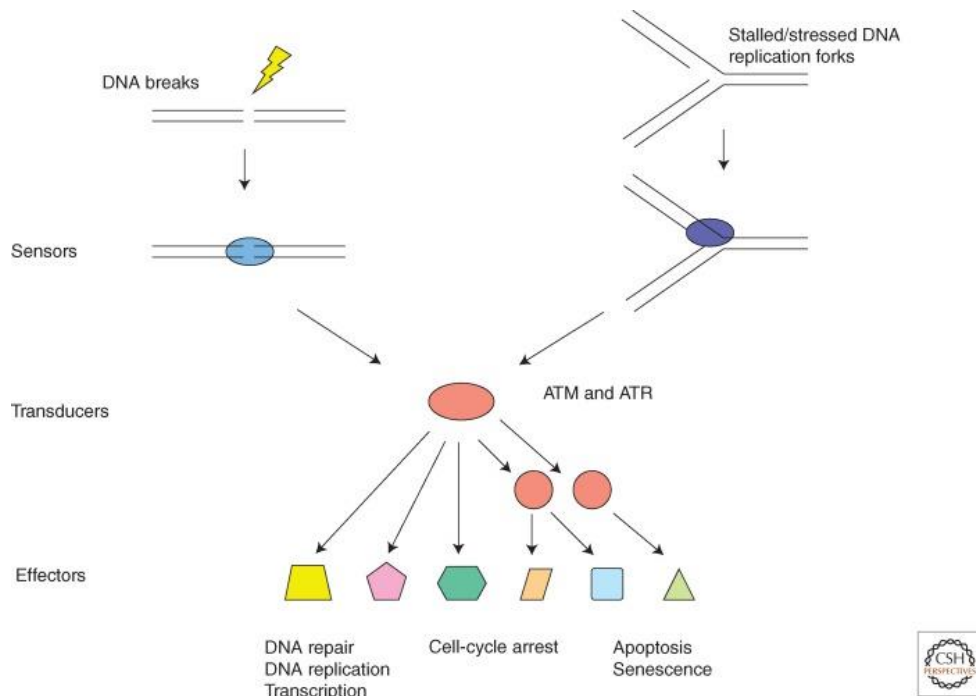


Figura 3. Vía de señalización en respuesta al daño del ADN (DDR). Los sensores de esta vía son proteínas que reconocen estructuras dañadas del ADN y el estrés de replicación.

Los transductores son quinasas (incluidas ATM y ATR). Los efectores son sustratos de ATM, ATR y sus quinasas posteriores, estos efectores están involucrados en diversos procesos celulares que son importantes para el mantenimiento de la estabilidad genómica de los organismos (Maréchal & Zou, 2013).

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa a la proteína quinasa Akt controla la vida útil del organismo en invertebrados y la supervivencia y proliferación celular en mamíferos al inhibir la actividad de los miembros de la familia de factores de transcripción FOXO. Se ha demostrado que FoxO3a de mamíferos también funciona en el punto de control G2 a M en el ciclo celular y desencadena la reparación del ADN dañado causado por el estrés oxidativo. Cuando la célula se encuentra bajo condiciones de estrés moderadas, FoxO3a puede promover la reparación del ADN, por otro lado, cuando hay niveles más altos de estrés, FoxO3a puede inducir muerte celular por apoptosis.

Mediante análisis de matriz genética, se descubrió que FoxO3a modula la expresión de varios genes que regulan la respuesta celular al estrés en el punto de control G2-M.

En condiciones de daño en el ADN, el ciclo celular se detiene en uno de los dos puntos de control críticos: fase G1-S o G2-M, antes y después de la replicación del ADN, lo que permite a las células reparar su ADN.

La sobreexpresión de FoxO3a induce una potente detención de G1. Es posible que el retraso en la progresión a través de la fase G2 inducida por la activación de FoxO3a permita la reparación del ADN dañado antes de continuar a la fase M.

Para determinar la actividad de FoxO3a en respuesta al daño en el ADN, Tran y colaboradores (2002), evaluaron la capacidad de FoxO3a para reactivar un gen informador dañado por rayos ultravioleta (UV), utilizando un plásmido de luciferasa de citomegalovirus (CMV) dañado y uno control. Se demostró que la expresión de FoxO3a promovió la reactivación del indicador de luciferasa CMV dañado, la activación del gen fue significativamente mayor comparada con la activación del gen cuando FoxO3a está ausente. Además, un mutante de FoxO3a que tiene una delección en el dominio de unión al ADN de FoxO3a (TM Δ DB) fue menos eficaz para inducir la reparación del promotor de CMV, lo que indica que FoxO3a induce la reparación del ADN uniéndose al ADN, posiblemente a sitios dentro de los promotores de genes implicados en el proceso de reparación del ADN (Tran *et al.*, 2002).

Otros estudios sugieren que FoxO3a activa p53 para iniciar un programa pro-apoptótico en respuesta al daño del ADN.

Asimismo, desempeña un papel en el mantenimiento de la estabilidad del genoma en respuesta a la rotura de la doble cadena de ADN (DSB) inducida por bleomicina, ya que actúa para restringir las vías de reparación de DSB:

recombinación homóloga (HR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ), posiblemente suprimiendo la reparación mutagénica después de que se detecta una DSB, pero antes de que se elija la vía de reparación, este hallazgo es consistente con evidencia previa que sugiere que FoxO3a media la respuesta al estrés.

FoxO3a está regulado positivamente en respuesta a agentes clastogénicos, actúa como regulador del mantenimiento del genoma al suprimir mutaciones, es decir, reordenamientos del genoma, esto al acelerar potencialmente la eliminación de focos de daño en el ADN. FoxO3a participa en la reparación del ADN en respuesta al daño genómico.

En conjunto, estos estudios proporcionan evidencia sobre que FoxO3a desempeña un papel en la promoción de la homeostasis tisular en respuesta al estrés, ofreciendo una posible explicación de su papel en la extensión de la vida. (Chung *et al.*, 2012; Charitou & Burgering, 2013; White *et al.*, 2020).

FoxO3a también se relaciona con la vía del daño en ADN mediada por la ataxia-telangiectasia (ATM), inducida por el estrés ambiental al que las células están expuestas, el cual provoca roturas del ADN. Por medio de esta vía se controlan los puntos de control del ciclo celular inducidos por el daño y la reparación del ADN. En este contexto, Tsai y colaboradores en el 2008 reportaron que FoxO3a interactúa con ATM para promover la fosforilación de ATM en el residuo Ser1981 lo que provoca que sus mediadores posteriores formaran focos nucleares en respuesta al daño del ADN. La inactivación de FoxO3a en las células, anula la formación de focos ATM-pS1981 y fosfohistona H2AX después de un daño presente en el ADN. El aumento de FoxO3a en las células promueve la señalización regulada por ATM, los puntos de control del ciclo celular intrafase S o G2-M y la reparación del ADN dañado, mientras que las células que carecen del factor de transcripción FoxO3a, no desencadenan el mecanismo de reparación del ADN ante el daño causado. Esto sucede porque el dominio carboxi-terminal de FoxO3a se une al dominio FAT de ATM, contribuyendo así a la activación de ATM. Estos resultados sugieren que la ATM puede estar regulada directamente por FoxO3a en respuesta al daño del ADN (Tsai *et al.*, 2008).

Regulación de FoxO3a

Los factores de transcripción FoxO están regulados por una amplia gama de estímulos externos, incluida la insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), nutrientes, citoquinas y estrés oxidativo. Estos estímulos ambientales controlan la actividad de FoxO alterando una intrincada combinación de modificaciones postraduccionales (ver figura 4), como la fosforilación, acetilación, ubiquitinación y metilación, que a su vez regulan la localización subcelular, los niveles de proteínas, las propiedades de unión al ADN y la actividad transcripcional (Daitoku *et al.*, 2011).

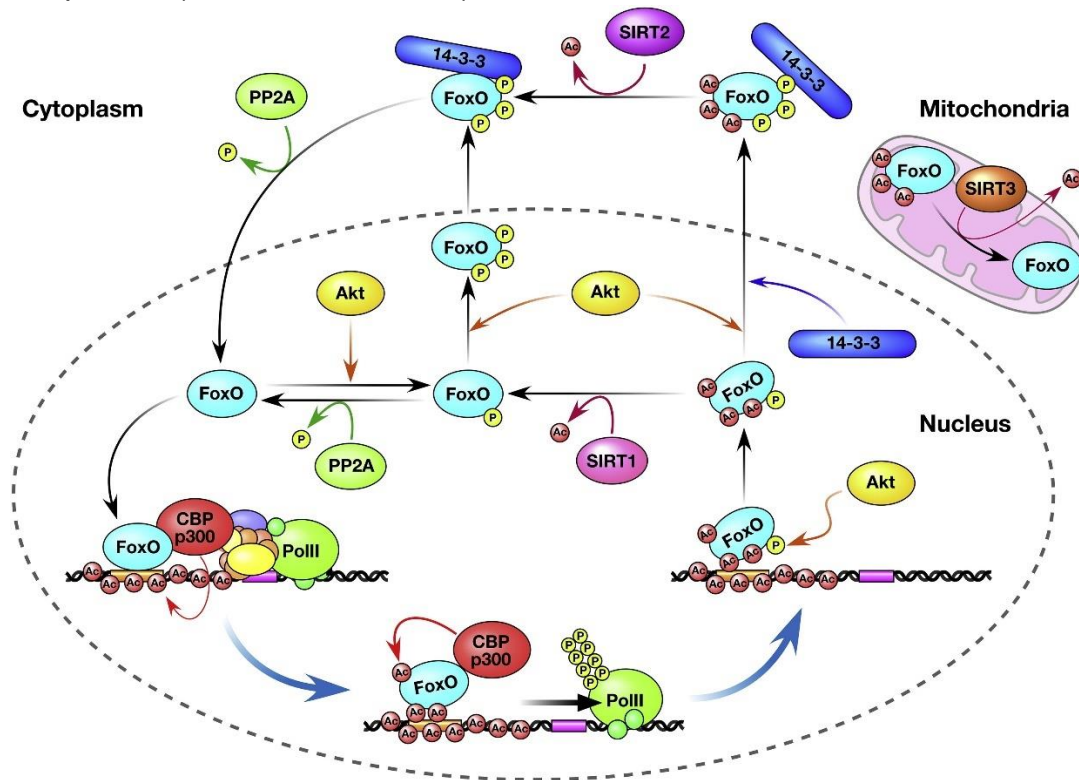


Figura 4. Modelo esquemático para la regulación de factores de transcripción FoxO mediante fosforilación y acetilación reversible. Los factores FoxO viajan entre el citoplasma y el núcleo. Se ha demostrado que PP2A es una fosfatasa FoxO1. En el núcleo, FoxO reconoce y se une al promotor del gen diana. CBP/p300 se recluta en FoxO unido al ADN y estimula la transcripción mediante la acetilación de histonas nucleosomales, mientras que la acetilación posterior de FoxO mediada por CBP/300 altera su unión al ADN. En consecuencia, Akt podría fosforilar eficientemente al FoxO acetilado y luego el FoxO fosforilado interactúa con las proteínas 14-3-3 en el núcleo, lo que a su vez da como resultado la retención citoplasmática de FoxO. Mientras tanto, los factores FoxO también podrían ser desacetilados por SIRT2 y SIRT3 en el citoplasma y mitocondria, respectivamente (Daitoku *et al.*, 2011).

La fosforilación postraduccional de FoxO3a regula la translocación de FoxO3a desde el núcleo al citosol, lo que resulta en la represión de la transcripción de genes asociados con la protección contra el estrés oxidativo, reparación del ADN y la anti-apoptosis (Fluteau *et al.*, 2015).

Los factores de transcripción FoxO son candidatos prometedores para actuar como vínculos moleculares entre la longevidad y la supresión de tumores. Estos factores son sustratos importantes de la proteína quinasa Akt. En presencia de insulina y factores de crecimiento, las proteínas FoxO se relocalizan desde el núcleo al citoplasma y se degradan mediante la vía ubiquitina-proteosoma. En ausencia de factores de crecimiento, las proteínas FoxO se trasladan al núcleo y regulan positivamente una serie de genes diana, promoviendo así la detención del ciclo celular, la resistencia al estrés o la apoptosis. Los estímulos de estrés también desencadenan la relocalización de los factores FoxO en el núcleo, permitiendo así una respuesta adaptativa a los estímulos de estrés (Greer & Brunet, 2005).

FoxO3a participa en la expresión de una gran variedad de genes involucrados en distintos procesos celulares como el daño a ADN, apoptosis, autofagia, detención del ciclo celular, estrés oxidativo, metabolismo, entre otros. Para fines de esta investigación, se analizaron los genes involucrados en el daño al ADN, tales como: gen p21, gen p53 y gen GADD45a.

Gen p21

El inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (CDKN1A o p21 Waf1/Cip1) desempeña un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, (en particular después de un daño genotóxico) ya que regula el ciclo celular a través de su efecto negativo sobre varias CDKs, lo que conlleva a la inhibición de las transiciones de G1-S y G2-M (Ticli *et al.*, 2022).

Además, p21 participa en la vía de señalización p53-p21-RB (ver figura 8) transportando varios sitios de fosforilación como sustratos para la ciclina D-CDK4/6, E-CDK2, A-CDK2 y B-CDK1, logrando así un estado de fosforilación de la proteína del retinoblastoma (RB). El estado hipofosforilado de RB puede cambiarse a hiperfosforilación mediante la actividad quinasa de los complejos ciclina-CDK, estas quinasas pueden ser inhibidas por p21, logrando que RB se una a los dímeros del factor de transcripción E2F, estimulando la formación del

complejo RB-E2F. Estos complejos reprimen la transcripción de numerosos genes del ciclo celular, algunos necesarios para la transición G1-S. (Engeland, 2022).

Cabe señalar que el circuito regulador entre p21, RB, E2F y p53 está entrelazado de una manera bastante compleja, como lo ejemplifica la observación de que la triple eliminación de E2f1, E2f2 y E2f3 en células de ratón provoca un aumento en los niveles de proteína p21 que provoca la detención del ciclo celular en las transiciones G1-S y G2-M (Engeland, 2022).

El gen p21 se localiza en el citoplasma y el núcleo, aunque también puede estar presente en otros organelos como la mitocondria, citoesqueleto, espacio extracelular, membrana plasmática, lisosoma, endosoma, retículo endoplasmático peroxisoma y aparato de Golgi. (GeneCards, s.f.) (ver figura 5).

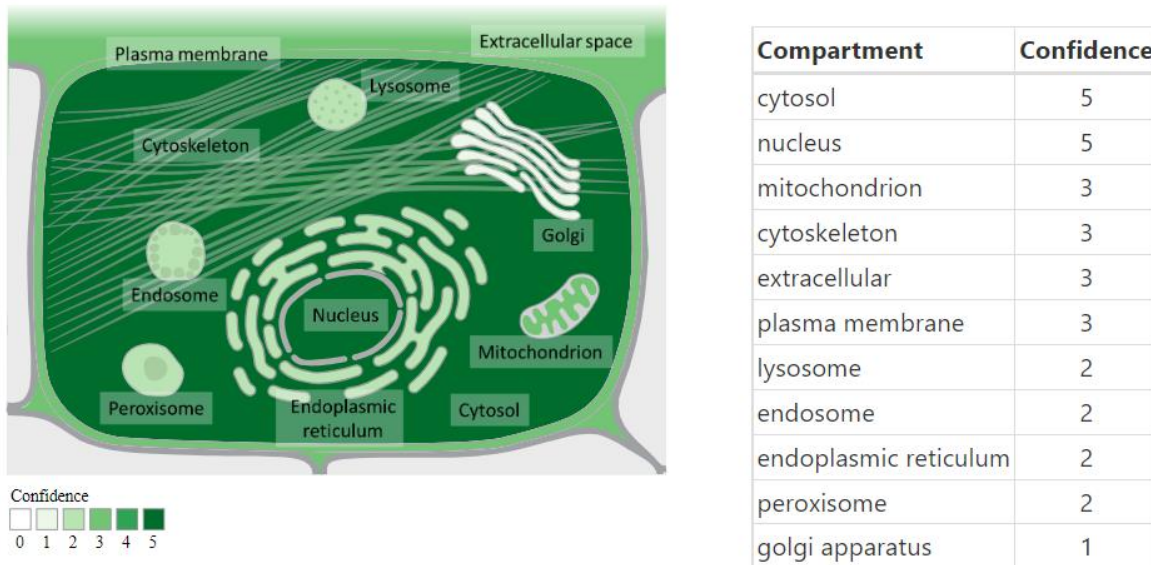


Figura 5. Localización subcelular del gen p21^{Waf1/Cip1} (CDKN1A), se muestra una escala donde 0 indica un nivel bajo y 5 un nivel alto de la proteína p21 en los distintos organelos (GeneCards, s.f.).

Con relación al daño en el ADN, puede estar involucrado en la inhibición de la proliferación celular mediada por p53 en respuesta al daño del ADN. Se une e inhibe la actividad de la quinasa dependiente de ciclina, previniendo la fosforilación de sustratos críticos de la quinasa dependiente de ciclina y bloqueando la progresión del ciclo celular con la detención de G2 (Mansilla *et al.*, 2020).

Un estudio reportado por Chung y colaboradores en 2012 menciona que en las primeras etapas del daño del ADN con niveles bajos de DSB, es posible que solo se active una fracción menor de p53 que sea suficiente para impulsar la transcripción del gen p21, lo que resulta en la detención del ciclo celular (Chung *et al.*, 2012).

Gen p53

También conocida como proteína supresora de tumores (TP53)

Este gen codifica una proteína supresora de tumores que contiene dominios de activación transcripcional, unión al ADN y oligomerización. La proteína codificada se activa en respuesta al daño en el ADN o estrés celular, posteriormente, cambia su conformación debido a modificaciones postraduccionales como fosforilación (por ATM, ATR, Chk1 y MAPK), acetilación o sumoilación, regulando la expresión de genes diana, induciendo así la detención del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN o cambios en el metabolismo.

La proteína p53 se encuentra principalmente en forma de tetrámero y los residuos 323 al 353 son esenciales para su ensamblaje, a su vez, se han atribuido otras dos funciones biológicas: señales de localización nuclear (SLN) y sitio de unión y reconocimiento del daño en el ADN. Las modificaciones postraduccionales sobre este dominio permiten potenciar la especificidad de la unión al ADN (Silva *et al.*, s.f.; Zhan, 2005; Patiño *et al.*, 2004).

La localización subcelular de p53 radica en el citoplasma, núcleo y mitocondria, de igual manera puede encontrarse en el retículo endoplasmático, lisosoma, endosoma, espacio extracelular, membrana plasmática, aparato de Golgi y en el peroxisoma. (GeneCards, s.f.) (ver figura 6).

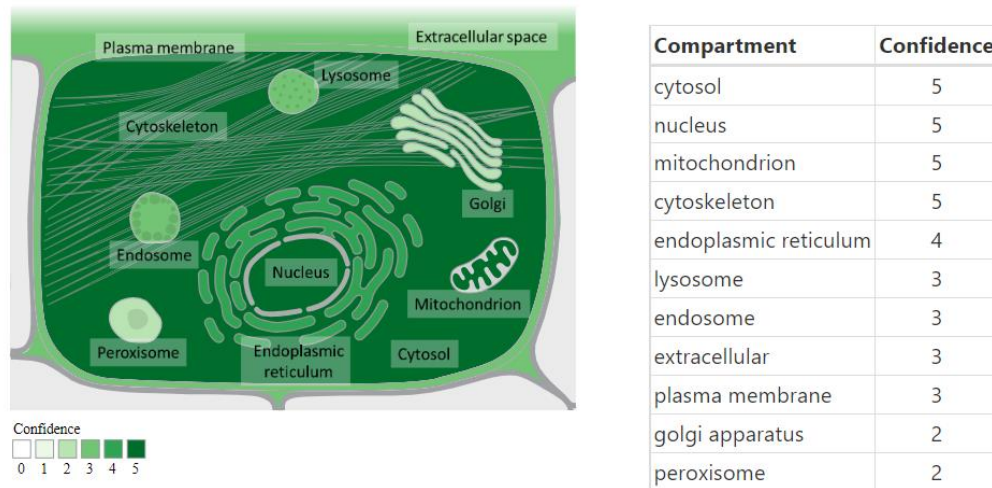


Figura 6. Localización subcelular del gen TP53, se muestra una escala donde 0 indica un nivel bajo y 5 un nivel alto de la proteína p53 en los distintos organelos (GeneCards, s.f.).

La proteína p53 regula la expresión de una amplia variedad de genes implicados en la apoptosis, la detención del crecimiento o la senescencia en respuesta al estrés genotóxico o celular, como puede verse en la figura 7. (SinoBiological s.f.).

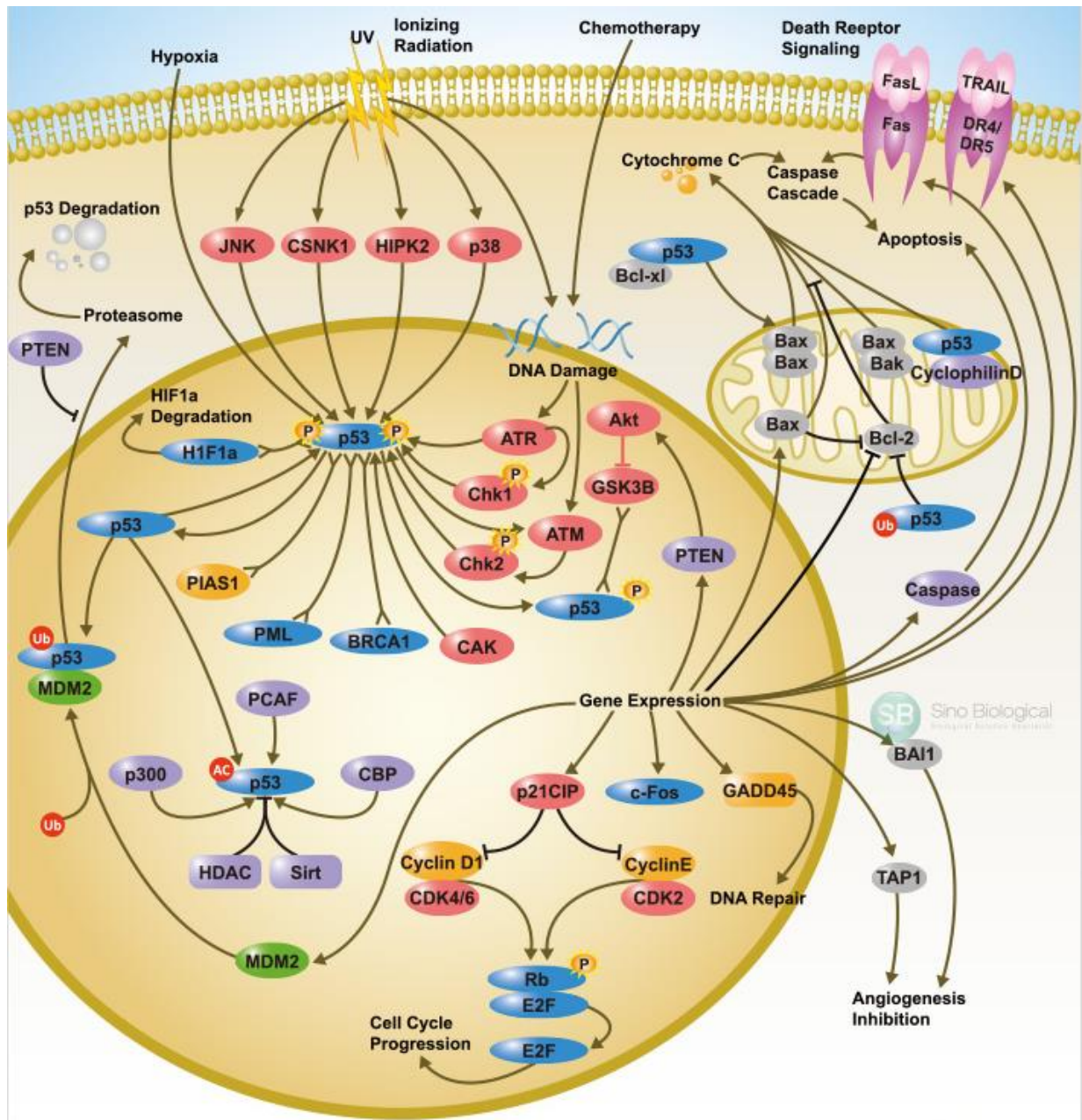


Figura 7. Vía de señalización p53. Los niveles de proteína p53 están regulados negativamente por las ubiquitina ligasas E3, incluida MDM2. Las ligasas E3 promueven la ubiquitinación y luego la degradación de p53 dependiente del proteosoma. Los niveles de proteína p53 se estabilizan en respuesta a estímulos de estrés (nuclear, metabólico y oncogénico) y el daño del ADN. De igual manera, p53 puede promover la apoptosis mediante interacciones con proteínas de la familia Bcl-2 en el citoplasma (SinoBiological s.f.).

En la reparación del ADN resulta importante la actividad transactivadora de p53 sobre los genes GADD45A y p21/WAF1/CIP1/CDKN1A. En condiciones *in vitro* la proteína GADD45A se une al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para inducir la reparación de la lesión. Por otra parte, cuando la proteína p21 se une a PCNA impide su interacción con la ADN polimerasa δ , inhibiendo así la replicación. En consecuencia, un equilibrio entre estas dos proteínas controla de manera eficiente dos mecanismos biológicos esenciales: reparación y replicación de ADN (Patiño *et al.*, 2004).

Otra proteína importante que al igual que p53 funciona como supresor tumoral, es la proteína del retinoblastoma (RB), ambas proteínas desempeñan funciones centrales en la regulación del ciclo celular. RB forma complejos con la familia E2F de factores de transcripción y regula negativamente numerosos genes. Su represión transcripcional por parte del complejo RB-E2F se libera mediante la fosforilación de RB, lo que lleva a la expresión de los reguladores del ciclo celular. La liberación de la represión se puede prevenir mediante el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p21/WAF1/CIP1/CDKN1A, gen que se activa transcripcionalmente por p53. En conjunto, estos elementos constituyen la vía de señalización p53-p21-RB. Tras la activación de p53 (mediante infección viral o inducción de daño en el ADN) la expresión de p21 aumenta y los niveles altos de esta proteína dan como resultado la formación del complejo RB-E2F. Las concentraciones elevadas de p53 producen una mayor actividad transcripcional que desencadena la detención del ciclo celular y la apoptosis (Engeland, 2022).

Existe una gran superposición entre la vía de señalización p53-p21-RB y p53-p21-DREAM. La represión transcripcional indirecta por p53 es el resultado de ambas vías de señalización. A diferencia del RB-E2F, DREAM (represor transcripcional) también puede regular negativamente genes a través de los sitios de unión del factor de transcripción denominada como región de homología de genes del ciclo celular (CHR). Esto da como resultado un conjunto de genes controlados por la señalización p53-p21-DREAM independiente de RB-E2F. Debido a que RB puede no unirse a E2F o al ADN, permite que DREAM se una mediante el enlace RB-SKP2-p27-ciclina A/E-CDK2-p130-DREAM (Engeland, 2022).

El mecanismo de señalización p53-p21-RB contribuye significativamente a la regulación del ciclo celular y la supresión de tumores (Engeland, 2022) (ver figura 8).

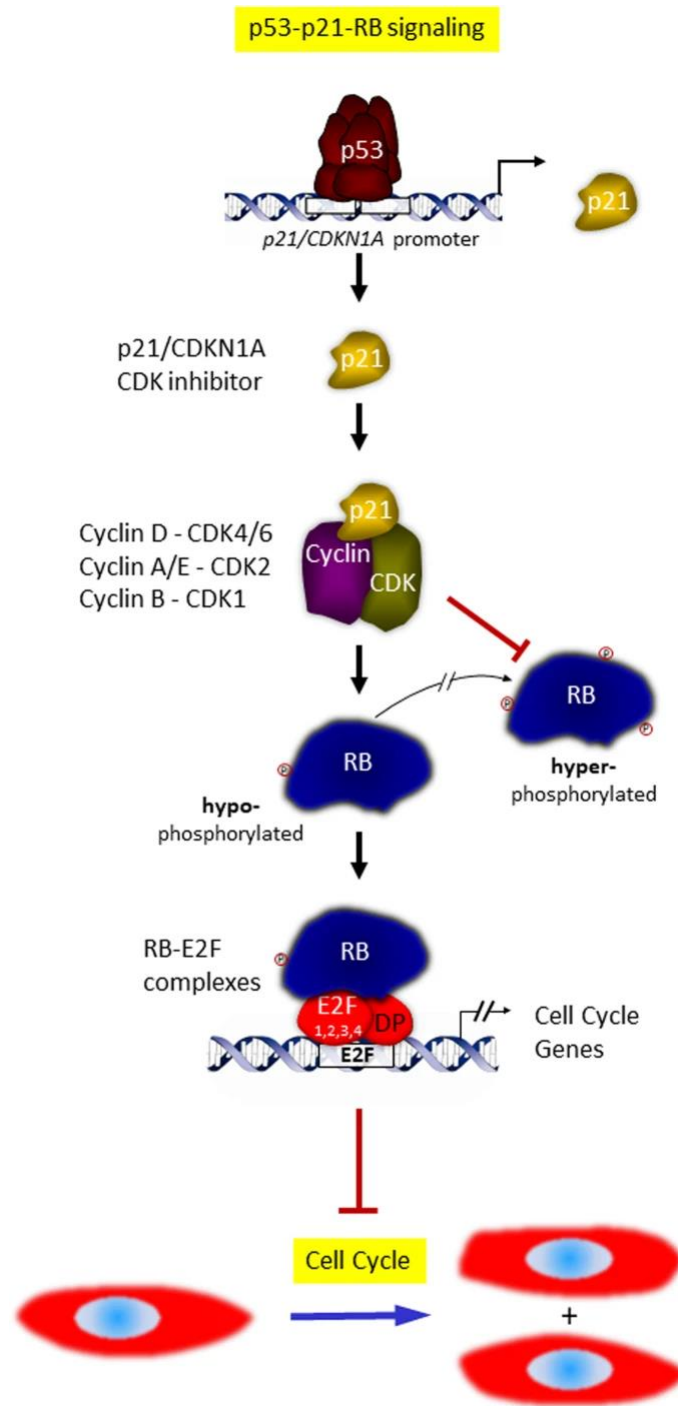


Figura 8. Mecanismo de señalización p53-p21-RB. Tras la activación de p53, este se une a elementos del promotor *p21/CDKN1A* y activa su transcripción. Después, la proteína p21 inhibe la actividad de varios complejos ciclina-CDK, esto da como resultado la hipofosforilación de RB, que fomenta la formación del complejo RB-E2F y su unión a los sitios E2F en los promotores diana. Muchos genes diana se regulan negativamente como consecuencia de este mecanismo de represión transcripcional indirecta dependiente de p53. Como la mayoría de los genes reprimidos están implicados en la progresión del ciclo celular, su regulación negativa provoca la detención del ciclo celular (Engeland, 2022).

El daño al ADN como resultado del estrés ambiental es reconocido por proteínas que desencadenan mecanismos de reparación o, si la reparación no tiene éxito, inician la apoptosis. La proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) se activa mediante roturas en la doble cadena del ADN y regula la apoptosis a través de p53. El factor de transcripción FoxO3a y p53 comparten varias similitudes en sus funciones y regulaciones, no solo interactúan entre sí, sino que también regulan la actividad o la estabilidad de cada uno. Por ejemplo, la activación de p53 puede suprimir la actividad transcripcional de FoxO3a a través de la quinasa 1 inducible por suero/glucocorticoides (SGK1) o inducir la degradación de FoxO3a a través de MDM2. Bajo estrés oxidativo, p53 puede inhibir la actividad transcripcional de FoxO3a. Asimismo, se ha demostrado que FoxO3a activado puede estabilizar a p53 y así promover la apoptosis dependiente de p53.

Se ha descubierto que FoxO3a es necesario para la regulación de la expresión normal de ATM para mantener la homeostasis de las células madre hematopoyéticas. FoxO3a puede estar implicado en la regulación de la vía de señalización apoptótica de p53 mediada por ATM en las últimas etapas del daño en el ADN.

Chung y colaboradores (2012) señalan que FoxO3a es esencial para la apoptosis inducida por daño en el ADN, donde requiere de las isoformas ATM, Chk2 y p53 fosforilada para desencadenar esta respuesta. La camptotecina (CPT), un inhibidor de la topoisomerasa-1, puede inducir daño en el ADN y activar la vía apoptótica ATM-Chk2 en células cancerosas. De igual manera, puede inducir sustancialmente la expresión de FoxO3a y promover la activación de ATM y p53 en el núcleo al mismo tiempo.

En estas condiciones, FoxO3a también puede desempeñar un papel en la regulación de la retención de la cromatina de p53 fosforilada. Lo que sugiere un vínculo esencial entre FoxO3a y el programa apoptótico mediado por ATM-Chk2-p53 después del daño presente en el ADN (Chung *et al.*, 2012).

FoxO3a y p53 comparten diversas similitudes, tales como la capacidad de inducir la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y la apoptosis, además, genes como GADD45A, WIP1, p21 y PA26 que se inducen en respuesta a FoxO3a, están regulados por p53, lo que conllevaría a FoxO3a y p53 funcionar en conjunto bajo ciertas condiciones como el estrés oxidativo o la respuesta al daño en el ADN (Greer & Brunet, 2005).

Gen GADD45A

Conocido también como proteína de detención del crecimiento y daño del ADN, desempeña un papel regulador crucial en diversas funciones celulares, como la reparación del ADN, la regulación y la senescencia del ciclo celular y la respuesta al estrés genotóxico (Arab *et al.*, 2019; Y. Wang *et al.*, 2022).

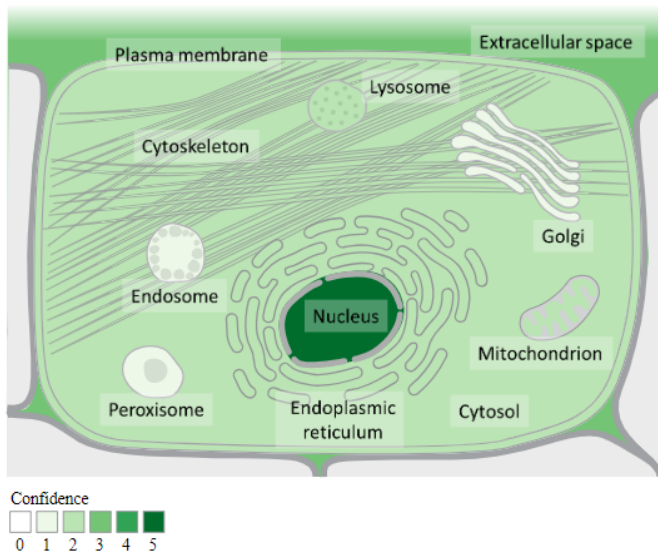
La maquinaria de señalización que regula la inducción de GADD45A por estrés genotóxico involucra vías tanto dependientes como independientes de p53; este último puede emplear señales relacionadas con BRCA1 o mediadas por MAP quinasa. GADD45A interactúa con múltiples proteínas celulares importantes, incluida la proteína quinasa CDC2, el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), la proteína WAF1/CIP1, la histona y MTK/MEKK4, un activador ascendente de la vía JNK/SAPK (Zhan, 2005).

En las células T, funciona como regulador de p38 MAPK al inhibir la fosforilación y actividad de p88 (por similitud). Podría afectar la interacción de PCNA con algunos complejos CDK (proteína quinasa de división celular); también estimula la reparación por escisión del ADN *in vitro* e inhibe la entrada de células en la fase S.

El gen GADD45A puede presentar modificaciones postraduccionales, tales como la ubiquitinación en el residuo Lys29.

De igual manera, participa en la detención del crecimiento y transcripción inducible por daño al ADN, involucrada en la detención de G2 inducida por UV y metanilsulfonato de metilo (MMS), proteína de estrés sensible a p53 que activa MEKK4, interactuando con las cuatro histonas centrales, mediando el punto de control G2-M, regulado a la baja por expresión de ciclina B1 y CDC25C, inactivando (factor promotor de fase M) MPF a través de la interacción con CDC2 pero no con ciclina B1, gen diana c-Myc regulado negativamente, modificando la accesibilidad del ADN en la cromatina dañada (GeneCards, s.f.).

En cuanto a su localización subcelular, GADD45A predomina en el núcleo, aunque también está presente en el espacio extracelular, lisosoma, citosol, retículo endoplasmático, mitocondria, citoesqueleto, membrana plasmática, aparato de Golgi, endosoma y peroxisoma (GeneCards, s.f.) (ver figura 9).



Compartment	Confidence
nucleus	5
extracellular	3
lysosome	2
cytosol	2
endoplasmic reticulum	2
mitochondrion	2
cytoskeleton	2
plasma membrane	2
golgi apparatus	1
endosome	1
peroxisome	1

Figura 9. Localización subcelular del gen GADD45A, se muestra una escala donde 0 indica un nivel bajo y 5 un nivel alto de la proteína GADD45A en los distintos organelos (GeneCards, s.f.).

GADD45A es una proteína ácida de 18 kDa codificada por un gen inducible tras daño en el ADN y que interacciona con otras proteínas que intervienen en la reparación del ADN, el control del ciclo celular o la apoptosis (José, 2009).

Se sabe que FoxO3a aumenta la expresión de un grupo de genes que forman parte en la respuesta celular al estrés, entre los cuales se encuentra GADD45A, quien media los efectos de FoxO3a sobre la progresión de la fase G2-M del ciclo celular, así como la reparación del ADN. Los tres miembros de la familia GADD45: GADD45 α , GADD45 β y GADD45 γ , se expresan en respuesta a estímulos de estrés que inducen daño al ADN.

La transcripción de GADD45A está mediada por la unión directa de FoxO3a a su promotor. (Tran *et al.*, 2002).

Enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID)

Las enfermedades intersticiales difusas del pulmón (EPID) constituyen un grupo heterogéneo de afecciones que tienen en común ciertas manifestaciones clínicas, radiológicas y funcionales, en donde las principales alteraciones anatomopatológicas afectan a estructuras alveolo-intersticiales, vías respiratorias y vasculatura pulmonar (Ancochea Bermúdez & De Miguel Díez, 2008).

Las EPID se pueden clasificar en tres grupos en relación con su etiología (ver figura 10):

1) Neumonías intersticiales idiopáticas
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) ❖ Neumonía Intersticial Aguda (NIA) ❖ Neumonía Intersticial No Específica (NINE) ❖ Bronquiolitis respiratoria con enfermedad pulmonar intersticial (BR/EPID) ❖ Neumonía Intersticial Descamativa (NID) ❖ Neumonía Organizada Criptogenética (NOC) ❖ Neumonía Intersticial Linfocítica (NIL)
2) De causa conocida o asociadas a entidades bien definidas
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Asociadas a enfermedades del colágeno ❖ Producidas por polvos inorgánicos (neumoconiosis) ❖ Producidas por fármacos y radioterapia ❖ Causadas por polvos orgánicos (Alveolitis Alérgicas Extrínsecas o Neumonitis por Hipersensibilidad) (AAE-NH) ❖ Asociadas a enfermedades hereditarias
3) Primarias asociadas a otros procesos no bien definidos
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sarcoidosis ❖ Proteínosis alveolar ❖ Microlitiasis alveolar ❖ Linfangioleiomiomatosis (LAM) ❖ Eosinofilia pulmonares ❖ Histiocitosis X (enfermedad de células de Langerhans) ❖ Amiloidosis ❖ Otras entidades

Figura 10. Clasificación de las EPID (Ancochea Bermúdez & De Miguel Díez, 2008).

Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

La fibrosis pulmonar idiopática se define como una forma específica de neumonía intersticial fibrosante progresiva crónica de causa desconocida, que se produce principalmente en los adultos mayores, limitada a los pulmones, es irreversible y se asocia con el patrón histopatológico y/o radiológico de la neumonía intersticial usual (NIU) (Venero-Cáceres *et al.*, 2020).

La FPI se caracteriza por la presencia de fibroblastos y miofibroblastos hiperproliferativos y un aumento del depósito de matriz extracelular (MEC), lo que distorsiona la arquitectura pulmonar normal y provoca la pérdida de la función respiratoria (Al-Tamari *et al.*, 2018).

Esta enfermedad, es el resultado de varios procesos que causan cicatrices en los pulmones, las cuales impiden el intercambio de O₂ y CO₂ entre los alvéolos y

vasos sanguíneos pulmonares, lo que provoca que los pacientes con esta afección presenten síntomas como dificultad para respirar, tos seca, necesidad de oxígeno suplementario y, eventualmente, insuficiencia respiratoria. (Shenderov *et al.*, 2021)

En cuanto a su epidemiología, Lederer y Martínez (2018) reportan que la incidencia de la FPI ha aumentado con el tiempo, siendo mayor en Europa y América del Norte (3 a 9 casos por 100,000 personas al año) y menor en América del Sur y Asia Oriental (menos de 4 casos por 100,000 personas al año). A su vez, las tasas crecientes de ingresos hospitalarios y muertes por FPI también sugieren una carga de enfermedad cada vez mayor.

Se han reportado algunos factores que intervienen en el desarrollo de la FPI, entre los cuales se encuentran: tabaquismo, factores genéticos, exposiciones ambientales, infecciones virales crónicas y comorbilidades.

Existen estudios que sugieren que el envejecimiento y la senescencia, a través de interacciones con factores ambientales, pueden contribuir a la patogénesis de la FPI mediante diversos mecanismos, causando daño al epitelio pulmonar y aumentando la resistencia de los miofibroblastos a la apoptosis, lo que eventualmente resulta en la acumulación de matriz extracelular y fibrosis pulmonar.

Los síndromes relacionados con telómeros cortos representan síndromes de envejecimiento prematuro y a menudo se asocian con fibrosis pulmonar (Luppi *et al.*, 2021).

A continuación, se presentan los mecanismos propuestos que contribuyen a la patogénesis de la FPI, de acuerdo con Richeldi y colaboradores (2017) (ver figura 11).

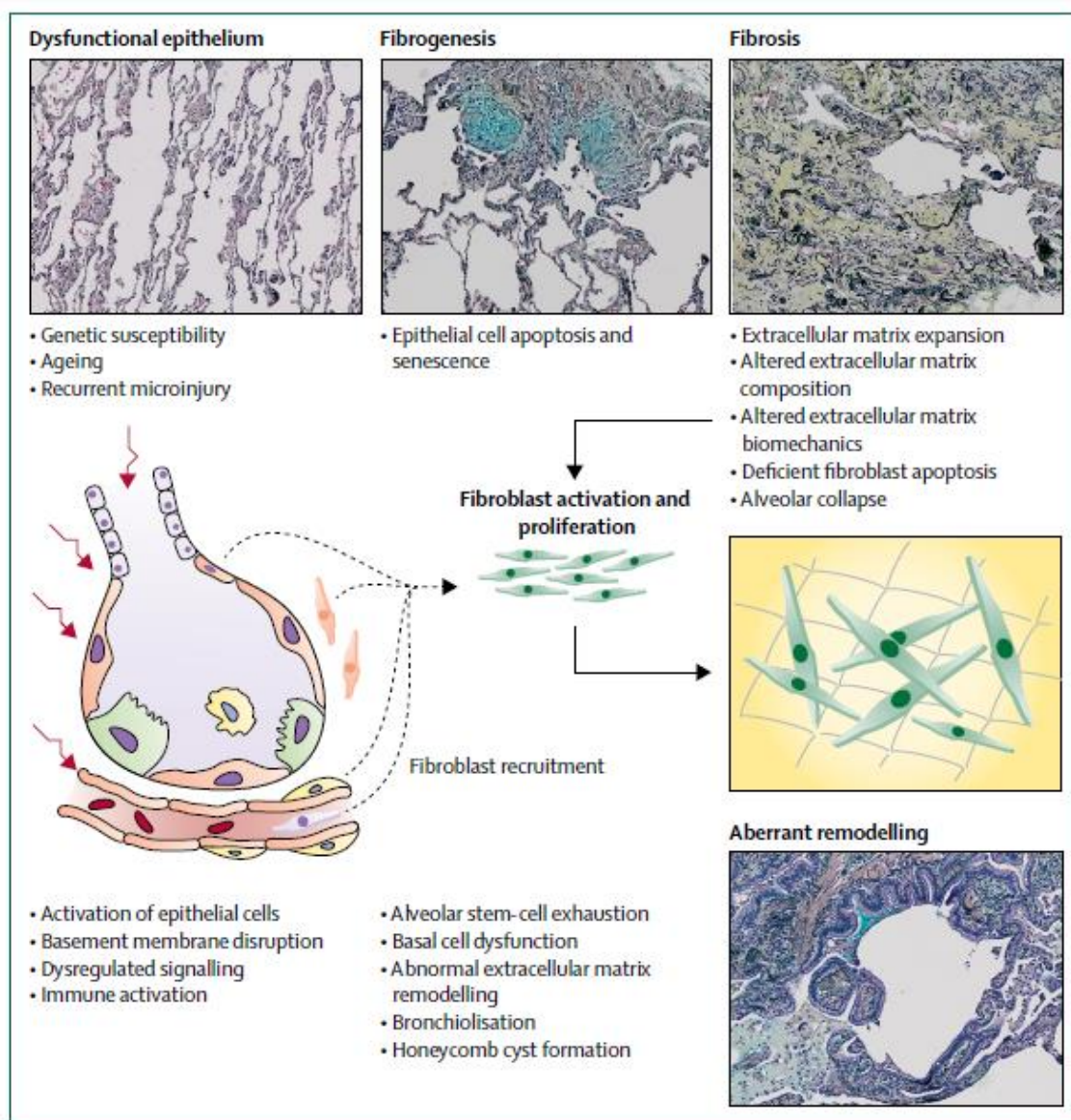


Figura 11. Mecanismos propuestos que contribuyen a la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática.

Las microlesiones repetitivas del epitelio alveolar envejecido activan las células epiteliales alveolares para secretar múltiples factores de crecimiento fibrogénicos, citoquinas y coagulantes. Esta secreción conduce al reclutamiento y activación de miofibroblastos de múltiples fuentes, incluida la proliferación de células mesenquimales residentes, pericitos del intersticio pulmonar, fibrocitos circulantes, transición mesenquimatosa epitelial y transición mesenquimatosa endotelial.

Estos miofibroblastos depositan matriz extracelular aumentada y alterada, con rigidez biomecánica alterada, lo que contribuye aún más a la activación de los miofibroblastos en un circuito de retroalimentación positiva. La reparación desregulada de este parénquima pulmonar lesionado con activación anormal de las vías de desarrollo y bronquiolización del pulmón ocurre en paralelo (Richeldi *et al.*, 2017).

Fibrosis Pulmonar Idiopática y FoxO3a

La expresión baja de FoxO3a participa en la reducción de la actividad autofágica mediante la supresión transcripcional de LC3B (marcador autofagosómico), en fibroblastos de FPI. Esto sugiere que la baja actividad autofágica por la alteración de FoxO3a puede contribuir a la progresión de la FPI.

Una de las moléculas cruciales que otorga este fenotipo de fibroblastos de FPI a matrices ricas de colágeno es Akt. La hiperactivación de Akt debido a un PTEN (gen supresor de tumores) inapropiadamente bajo es responsable de mantener un fenotipo de fibroblastos de FPI altamente viable en respuesta a matrices ricas en colágeno.

Existen estudios donde se demuestra que FoxO3a (vinculado con la regulación de la autofagia), se atenúa cuando los fibroblastos de la FPI se unen a matrices de colágeno, protegiéndolos de la muerte celular inducida por la matriz de colágeno como resultado de la activación de Akt (Im *et al.*, 2015).

A su vez, Nho y colaboradores (2011), demostraron que los fibroblastos de la FPI presentan altos niveles de FoxO3a inactivo en comparación con fibroblastos de control no fibróticos, debido a su alta actividad Akt.

Durante la reparación de tejidos, los fibroblastos pulmonares normales detectan la matriz de colágeno tipo I a través de las integrinas y la inducción de vías de señalización clave mediadas por integrinas suprimen la proliferación de fibroblastos, limitando así su respuesta. Los estudios demuestran que cuando los fibroblastos pulmonares normales se unen al colágeno polimerizado a través de una integrina, aumenta la actividad de la fosfatasa y del homólogo de tensina (PTEN), inhibiendo la función de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)-Akt, activando a FoxO3a y suprimiendo la proliferación de fibroblastos.

Por el contrario, los fibroblastos de la FPI tienen una baja actividad de PTEN, lo que genera una actividad de PI3K-Akt inapropiadamente alta en el colágeno, provocando que Akt fosforile el residuo Ser253 de FoxO3a y lo inactive, facilitando la proliferación de fibroblastos.

Asimismo, la sobreexpresión de FoxO3a en fibroblastos de FPI, aumentan los niveles de p27 (inhibidor del ciclo celular) y suprime la capacidad de la FPI (Nho *et al.*, 2011).

Neumonitis por Hipersensibilidad (NH)

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) también conocida como Alveolitis Alérgica Extrínseca (AAE) es un síndrome pulmonar complejo mediado por el sistema inmunológico, causado por la inhalación de una amplia variedad de antígenos a los que el individuo ha sido sensibilizado previamente (Spagnolo *et al.*, 2015).

Se puede presentar de dos formas: NH aguda, predominantemente inflamatoria (NH no fibrótica) y NH crónica o fibrótica (Barnes *et al.*, 2021).

Se han identificado distintos antígenos como desencadenantes de la NH, aunque los antígenos hallados a través de las tareas agrícolas, la manipulación de aves y la contaminación del agua determinan cerca del 75% de los casos (Lee, 2022).

Estos agentes etiológicos se pueden clasificar en tres categorías: microorganismos (bacterias, hongos y amebas), proteínas animales y compuestos químicos de bajo peso molecular (como isocianatos y anhídridos ácidos). Entre los microorganismos, los actinomicetos termofílicos son los responsables del cuadro prototipo de la enfermedad, conocido como pulmón del granjero.

La enfermedad afecta a los bronquiolos terminales, los alvéolos y el intersticio, se caracteriza por una neumonía intersticial celular y granulomatosa bronquiocéntrica. (Cebollero *et al.*, 2005; Costabel *et al.*, 2020).

La NH es una enfermedad inflamatoria crónica causada por antígenos inhalados que inducen el desarrollo de una respuesta inflamatoria linfocitaria en las vías aéreas periféricas e intersticio circundante. Sin embargo, no todos los antígenos inhalados tienen capacidad para desencadenar la enfermedad. Aquellos que inducen NH tienen algunas características que los diferencian de los capaces de inducir otras enfermedades (como el asma), tales como su tamaño, solubilidad, naturaleza particulada y su capacidad de producir además de la respuesta inmunológica, una respuesta inflamatoria inespecífica. (Cebollero *et al.*, 2005).

La coexistencia de factores promotores genéticos o ambientales conduce al desarrollo de una reacción inmune exagerada que resulta en una marcada inflamación pulmonar. La generación de la inflamación granulomatosa requiere, entre otras, la expresión de citoquinas Th1, incluyendo TNF- α , IL-12 e IFN- γ . La exposición persistente al antígeno y la sensibilización se asocian con el complejo antígeno-anticuerpo, activación de macrófagos, reclutamiento de células mononucleares y respuesta predominante mediada por células Th1; la exposición continua provoca cambios críticos en el pulmón, que terminan en fibrosis (Nogueira *et al.*, 2019).

Patogénesis de la Neumonitis por Hipersensibilidad

La exposición a antígenos en un individuo con predisposición genética y ciertas exposiciones ambientales como virus, pesticidas o contaminación del aire, principalmente exposición a partículas $<2.5 \mu\text{m}$ de diámetro, pueden conducir al desarrollo de una reacción inmune exagerada, que puede provocar una inflamación pulmonar aguda, caracterizada por el reclutamiento de neutrófilos, así como de células T y células B (ver figura 12, inciso a). Esta reacción inmune puede volverse crónica (ver figura 12, inciso b), lo que lleva a la activación de miofibroblastos y al depósito de matriz extracelular (ECM). En algunos individuos, en presencia de factores progresivos (como el envejecimiento, una mayor exposición a los antígenos o predisposición genética), se producen cambios patogénicos críticos que resultan en la expansión y activación de las poblaciones de células de fibroblastos y miofibroblastos, así como en la acumulación exagerada de ECM y la destrucción de la arquitectura pulmonar (ver figura 12, inciso c) (Costabel *et al.*, 2020).

Varios mecanismos contribuyen a la infiltración intersticial e intraalveolar de las células inmunitarias, incluido el aumento de la proliferación local de células T, la capacidad inhibitoria anormal de las células madre mesenquimales, la disminución de la actividad de las células T reguladoras (T_{reg}) y la resistencia a la apoptosis, lo que se atribuye a un aumento en la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-XL. Además, un programa complejo para el reclutamiento y localización de células que implica la regulación positiva de múltiples quimiocinas, como CCL5, CCL4, CXCL9 y CXCL10, contribuye a la infiltración de células inmunes intersticiales e intraalveolares, esta secuencia de eventos conduce al granuloma. Es probable que la formación este regulada por mecanismos asociados a TH1, que inducen principalmente la diferenciación funcional y la supervivencia de macrófagos y células dendríticas (Costabel *et al.*, 2020).

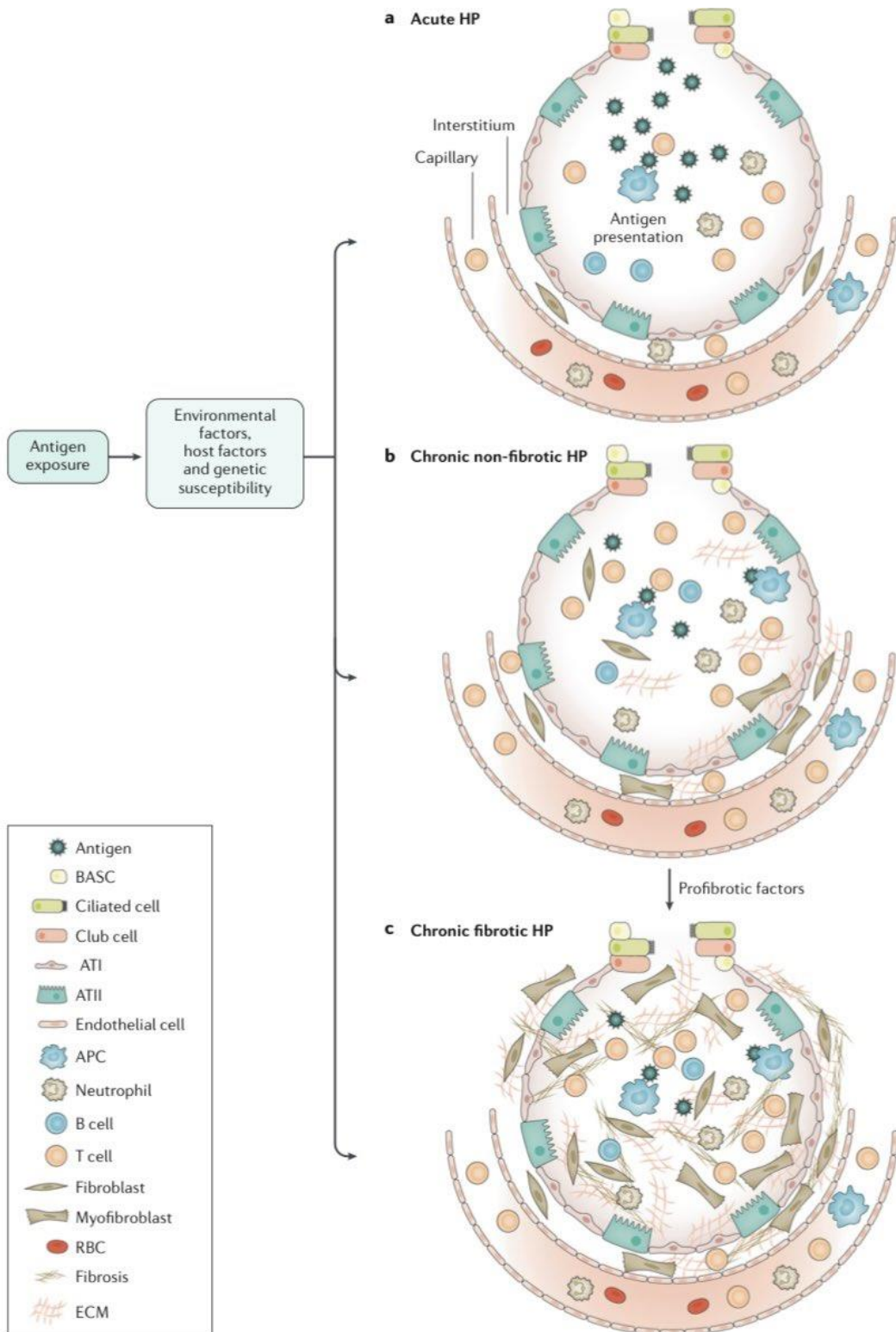


Figura 12. Patogénesis de la Neumonitis por Hipersensibilidad. Simbología: APC, célula presentadora de antígeno; ATI, célula epitelial alveolar tipo I; ATII, célula epitelial alveolar tipo II; BASC, células madre bronquialveolares; HP, neumonitis por hipersensibilidad; RBC, glóbulo rojo; ECM, matriz extracelular (Costabel *et al.*, 2020).

Immunopatogénesis de la Neumonitis por Hipersensibilidad

Las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos alveolares) ubicadas cerca de la superficie epitelial alveolar, se activan por la presencia del antígeno y, en aquellos con NH, inducen la diferenciación de células T en una variedad de subconjuntos efectores, principalmente células T auxiliares 1 (TH1), en un proceso impulsado por la expresión de IL-12, TNF e IFN- γ (Costabel *et al.*, 2020).

Las respuestas inmunitarias a los antígenos de la NH implican inmunidad adaptativa e innata e incluyen células T y células B (Costabel *et al.*, 2020) (ver figura 13).

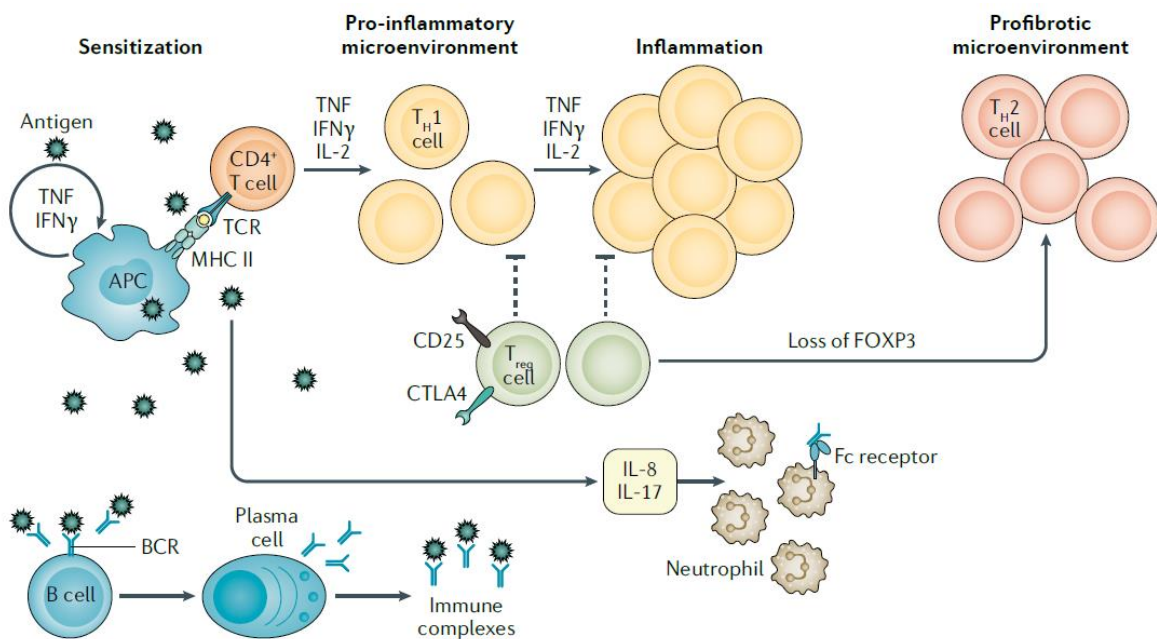


Figura 13. Inmunopatología en NH. Después de la inhalación, el antígeno es fagocitado y degradado por células presentadoras de antígeno (APC), como macrófagos y células dendríticas, posteriormente, es acoplado a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II (MHC II). Después, el antígeno es reconocido por las células T CD4⁺ a través del receptor de células (TCR). La diferenciación de las células T auxiliares (TH1) de las células T CD4⁺ se inicia mediante la expresión del factor de transcripción T-bet y citocinas como TNF, IFN- γ e IL-2 que impulsan la proliferación y diferenciación de estas células. La progresión de la sensibilización a NH requiere inicialmente la acumulación de células CD4⁺ y TH1 en el pulmón, creando un ambiente proinflamatorio. El IFN- γ y el TNF promueven la acumulación, activación y agregación de macrófagos, lo que resulta en el desarrollo de inflamación granulomatosa. Por otro lado, se altera la actividad supresora de las células reguladoras (T_{reg}), lo que facilita la amplificación de la respuesta inflamatoria. La disminución de la expresión de FOXP3 reduce la función supresora de las células T_{reg}, y alguna evidencia indica que las células T_{reg} que expresan una disminución de FOXP3 se convierten preferentemente en efectoras

de tipo TH2 (que expresan GATA3 y STAT6), incluso en un entorno que favorece a las células TH1. Durante la NH crónica, un cambio de un entorno TH1 a TH2 podría contribuir a la respuesta profibrótica. También se produce una respuesta de las células B contra los antígenos, lo que lleva a la producción de anticuerpos específicos y la formación de complejos inmunes. Es probable que la IL-17 sea producida por algunas subpoblaciones de células CD4⁺ y la IL-8 sea secretada principalmente por macrófagos alveolares. Ambas citocinas son potentes quimioatrayentes para el reclutamiento y activación de neutrófilos. Los neutrófilos expresan receptores para la región constante de las inmunoglobulinas IgG (FcγR), favoreciendo el reclutamiento de estas células al sitio de la inflamación y la interacción con complejos inmunes antígeno-anticuerpo, proceso involucrado principalmente durante la NH aguda. Simbología: BCR, receptor de células B (Costabel *et al.*, 2020).

Daño a ADN con H₂O₂

La toxicidad oxidativa es un desafío frecuente para la homeostasis celular que puede desencadenarse por una variedad de factores endógenos y ambientales. El daño molecular por oxidantes afecta la viabilidad celular y se asocia con el desarrollo de distintas enfermedades. Por lo que las vías que regulan la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) son cruciales para mitigar la toxicidad de las ROS. De hecho, han evolucionado mecanismos altamente específicos que forman la base de los sistemas de señalización de ROS y captación de oxidantes (Lushchak & Gospodaryov, 2012; D'Autréaux & Toledano, 2007).

Las especies reactivas de oxígeno dañan las macromoléculas celulares, incluido el ADN. Las células tienen una sólida vía de reparación por escisión de bases (BER) que desempeña un papel central en la reparación de los daños oxidativos del ADN tanto nuclear como mitocondrial. En esta vía, la base alterada es retirada del ADN por enzimas llamadas glicosilasas, que reconocen y remueven la escisión de bases con daños específicos. En células de mamíferos existen 11 diferentes tipos de glicosilasas que presentan características y modos de acción diferentes, las cuales rompen el enlace glicosídico que une la base con el azúcar, originando un sitio AP. Después de ser retirada la base por la acción de la glicosilasa específica, el sitio AP es reconocido por una AP-endonucleasa de la clase II, una enzima capaz de eliminar el resto del nucleótido ya sea por eliminación βeta o por hidrólisis produciendo un corte; posteriormente, una exonucleasa degrada el corte y deja un espacio en la cadena que es reparado por la ADN polimerasa y finalmente sellado por la ligasa, que restaura la integridad de la molécula. La evidencia sugiere que el estrés oxidativo crónico puede inducir vías protectoras que reducen la genotoxicidad. Comprender la lesión oxidante del ADN y su reparación es fundamental para comprender la fisiopatología de una amplia gama

de trastornos humanos (Van Houten *et al.*, 2018; Tafurt Cardona & Marin Morales, 2014).

Los efectos de la producción excesiva de ROS, o la insuficiencia de las defensas antioxidantes para neutralizarlos, se conocen como “estrés oxidativo”. Estas modificaciones pueden contribuir a la disfunción celular y, con el tiempo, al desarrollo de patologías complejas. Las especies reactivas de oxígeno pueden causar daños en el ADN, lo que se asocia con disfunción fisiológica progresiva, enfermedades e incluso mortalidad. La respuesta celular a la exposición aguda (dosis alta única) o crónica (dosis bajas/moderadas repetidas) a los agentes oxidantes es diferente. La exposición aguda desencadena una serie de mecanismos de defensa antioxidantes intracelulares que contrarrestan el daño causado; si estos no son suficientes, las células morirán por apoptosis o necrosis. Sin embargo, si las células sobreviven, la exposición también da como resultado una regulación positiva de muchas defensas antioxidantes. Por lo tanto, en las células expuestas crónicamente a un estrés subletal, se produce una serie de respuestas adaptativas que pueden prevenir o reducir el daño y la muerte a través de la activación de vías celulares y moleculares que mejoran la capacidad de la célula o del organismo para soportar un estrés más severo (Santa-González *et al.*, 2016).

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) desempeña múltiples funciones en las células. En bajas concentraciones, es un metabolito esencial del oxígeno y sirve como mensajero en las vías de señalización celular que son necesarias para el crecimiento, desarrollo y estado físico de los organismos vivos. Las células de mamíferos producen esta molécula para mediar diversas respuestas fisiológicas como la proliferación, diferenciación y migración celular. Esto ha llevado a implicaciones de la señalización celular “redox” en la regulación de procesos normales y la progresión de enfermedades como la angiogénesis, envejecimiento y cáncer. El H_2O_2 es una fuente endógena (aunque también puede ser exógena) de estrés oxidativo celular y es el inductor de la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) que se emplea con mayor frecuencia en estudios *in vitro*. (Rhee, 2006; Wang *et al.*, 2013; Van Houten *et al.*, 2018).

Aunque el H_2O_2 en sí tiene una baja reactividad hacia los constituyentes celulares, es de gran importancia fisiológica porque su naturaleza sin carga y relativamente no reactiva le permite difundirse a sitios en toda la célula, donde es capaz de formar ROS potentes en presencia de trazas de iones metálicos. En condiciones fisiológicas, las células pueden protegerse mediante enzimas degradantes de H_2O_2 que incluyen: glutatión, peroxidasa, catalasa y peroxirredoxinas. La existencia y conservación evolutiva de estos sistemas de defensa demuestra la importancia de la toxicidad del H_2O_2 . Sin embargo, en condiciones patológicas, incluido el estrés oxidativo agudo, estas defensas celulares pueden verse abrumadas, por ejemplo, por niveles elevados de H_2O_2 . Por lo tanto, el estudio de los mecanismos que subyacen a las respuestas adaptativas al daño oxidativo

inducido por H₂O₂ debería proporcionar comprensión sobre la promoción y progresión de los trastornos relacionados con ROS, así como sobre cómo proteger las células y tejidos del daño oxidativo (Rhee, 2006).

La exposición al H₂O₂ provoca modificaciones oxidativas de las bases nitrogenadas del ADN y/o roturas de simples y dobles cadena (SSB y DSB, respectivamente) debido a la acción directa o la generación de radicales libres (Blanco *et al.*, 2018).

Las células están constantemente expuestas a diversos tipos de ataques genotóxicos que desafían la estabilidad del genoma, incluidos aquellos que inducen daño oxidativo en el ADN. Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados sobre la adaptación al estrés oxidativo *in vitro* se han realizado con exposiciones cortas y/o modelos de estrés agudo que no permiten la inducción completa de procesos celulares que pueden resultar en una respuesta adaptativa, ya que emplean una dosis única de oxidantes y lapsos de tiempo cortos. Por ello, Santa-González y colaboradores (2016), demostraron que la exposición crónica y repetida a una concentración micromolar de H₂O₂ podría activar las respuestas al daño del ADN, lo que resultaría en adaptaciones celulares. Informaron que la exposición intermitente a largo plazo a este estímulo oxidativo casi eliminó la toxicidad celular y disminuyó significativamente la genotoxicidad (en particular, una disminución de >5 veces en las roturas de doble cadena), como resultado de la exposición aguda posterior al estrés oxidativo. Esta protección se asoció con la detención del ciclo celular en G2/M y la inducción de la expresión de nueve genes de reparación del ADN. En conjunto, esta evidencia respaldó una respuesta adaptativa al estrés oxidativo crónico de bajo nivel que da como resultado una protección genómica y un mantenimiento regulado de la homeostasis celular (Santa-González *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

General

Evaluar la relación del factor de transcripción FoxO3a con el daño a ADN en Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) y líneas control.

Específicos

- Crecer cultivos primarios de fibroblastos provenientes de biopsias de pacientes diagnosticados con Fibrosis Pulmonar Idiopática, Neumonitis por Hipersensibilidad y líneas control.
- Estimular los cultivos celulares con H₂O₂ a una [650 µM] durante 2 horas.
- Llevar a cabo la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Obtener proteínas de lisados totales y núcleo/citoplasma del cultivo celular.
- Cuantificar el ARN y proteínas extraídas del cultivo celular.
- Analizar el daño al ADN de fibroblastos de FPI, NH y líneas control, expuestos al estímulo de H₂O₂ mediante el ensayo cometa.
- Evaluar la expresión a nivel gen de p21, p53 y FoxO3a en fibroblastos de FPI, NH y líneas control, utilizando sondas y primers específicos para su amplificación, mediante q-PCR en tiempo real.
- Analizar la expresión de las proteínas p21, p53, FoxO3a, Ac-FoxO3a y GADD45a, con y sin estímulo de H₂O₂ mediante Western Blot.

HIPÓTESIS

El factor de transcripción FoxO3a participa ante el daño oxidativo al ADN de fibroblastos de FPI y NH, activando proteínas como p53, p21 y GADD45a para revertir su efecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y cultivo de fibroblastos

Se obtuvieron cultivos primarios de fibroblastos de biopsias de pacientes diagnosticados con Fibrosis Pulmonar Idiopática, Neumonitis por Hipersensibilidad y controles, estas últimas adquiridas del ATCC.

Los cultivos se crecieron en cajas T-25 con medio Advanced DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 5% y antibiótico (Primocin), para los controles se utilizó el medio Fibroblast Basal Medium 2 (FBM 2) enriquecido con SFB al 10% y Primocin. Las condiciones en las que se mantuvieron los cultivos fueron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

Diariamente se observó la morfología y confluencia de las células en un microscopio, se cambió el medio de cultivo cada tercer día, y se procedió a dividir las células en dos cajas T-25 hasta observar una confluencia del 80-100%, una se utilizó sin estímulo y otra se estimuló a [650 μ M] de H₂O₂ durante 2 horas.

Se realizó el conteo celular con ayuda de una cámara de Neubauer para plaquear 60,000 células destinadas al ensayo cometa, también se seleccionaron las células para extracción de ARN y proteína.

Extracción de ARN

Se retiró el medio de cultivo y se añadieron 500 μ L del reactivo TRIzol, se dejó actuar durante 1 minuto y se lavó toda la superficie de la caja, la muestra resultante se colocó en tubos de 1.5 mL previamente etiquetados y se guardaron a -70°C hasta su uso. Posteriormente, se incubó la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 200 μ L de cloroformo y se agitó el tubo vigorosamente durante 15 segundos, después se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 9,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, el ARN total se precipitó con 500 μ L de isopropanol y se guardó a -70°C durante un día. Al día siguiente, se incubó la muestra 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm 10 minutos a 4°C, enseguida, se lavó el pellet con 1 mL de etOH 75%, se agitó en un vórtex y se volvió a centrifugar a las mismas condiciones previamente descritas, se lavó una vez más con 500 μ L etOH 75% y se centrifugó. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 15 minutos. Finalmente, el pellet resultante se resuspendió en 20 μ L de DEPC (H₂O tratada) y se guardó a -70°C hasta su uso.

Preparación de lisado de células

Se añadió 1 mL de reactivo Tripsina a las cajas T-25 para levantar las células y se incubaron durante 5 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo, se observó en el microscopio si las células ya se encontraban levantadas de la caja, enseguida se detuvo la reacción de la Tripsina con 5 mL de medio de cultivo al 10% de SFB, se resuspendió cuidadosamente y la mezcla resultante se pasó a un tubo estéril de 15 mL para centrifugarlo a 2,000 rpm durante 10 minutos, se retiró el medio de cultivo y el pellet resultante se resuspendió en 1 mL de PBS 1x y se transfirió a un tubo de 1.5 mL, después se centrifugó a 5,000 rpm 7 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en 40 μ L de Buffer RIPA y el tubo se mantuvo en hielo durante 1 hora. El tubo se sonicó 10 veces, 20 segundos c/u con descanso en

hielo de 1 minuto, finalmente se centrifugó a 14,000 rpm 15 minutos a 4°C y se guardó a -70°C hasta su uso.

Extracto núcleo/citoplasma

Se utilizó el kit de extracción NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se añadió 1 mL de reactivo Tripsina a las cajas T-25 para levantar las células y se incubaron durante 5 minutos a 37°C, transcurrido este tiempo, se observó en el microscopio si las células ya se encontraban levantadas de la caja, enseguida se detuvo la reacción de la Tripsina con 5 mL de medio de cultivo al 10% de SFB, se resuspendió cuidadosamente y la mezcla resultante se pasó a un tubo estéril de 15 mL para meterlo a la centrifuga a 2,000 rpm durante 10 minutos, se retiró el medio de cultivo y el pellet resultante se resuspendió en 1 mL de PBS 1x y se transfirió a un tubo de 1.5 mL, después se centrifugó a 12,000 rpm 5 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 70 µL de reactivo CER I y se agitó en un vórtex durante 30 segundos, a continuación, se incubó en hielo durante 10 minutos.

Posteriormente, se añadieron 5 µL de CER II al tubo, se agitó en un vórtex durante 10 segundos y se incubó en hielo 1 minuto, se volvió a agitar en el vórtex durante 10 segundos y se procedió a centrifugarlo a 14,000 rpm 10 minutos a 4°C. Inmediatamente se transfirió el sobrenadante (extracto citoplásmico) a un tubo frío y se guardó a -70°C hasta su uso.

Por otro lado, el pellet formado (núcleo) se resuspendió en 35 µL de NER y se agitó con ayuda de un vórtex vigorosamente cada 5 minutos durante 30 segundos hasta cumplir 40 minutos.

Finalmente, la muestra se llevó a centrifugar a 14,000 rpm 15 minutos a 4°C, se transfirió el sobrenadante (fracción nuclear) a un tubo nuevo y se guardó a -70°C hasta su uso.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una reacción enzimática *in vitro*, que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia de interés resulta copiada fielmente, para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa, la cual tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Si se utiliza como sustrato ADN genómico, entonces típicamente se refiere a una qPCR (*quantitative* PCR, por sus siglas en inglés),

pero si se usa ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm, se le conoce como RT-qPCR (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y es llevada a cabo por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. La PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR) se encarga de la detección y cuantificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos en cada ciclo de la reacción, utilizando reporteros fluorescentes (SYBR Green). La PCR se lleva a cabo en tres etapas: desnaturalización (95°C), hibridación (50-60°C) y extensión (72°C) (De Dios L *et al.*, 2013) (ver figura 14).

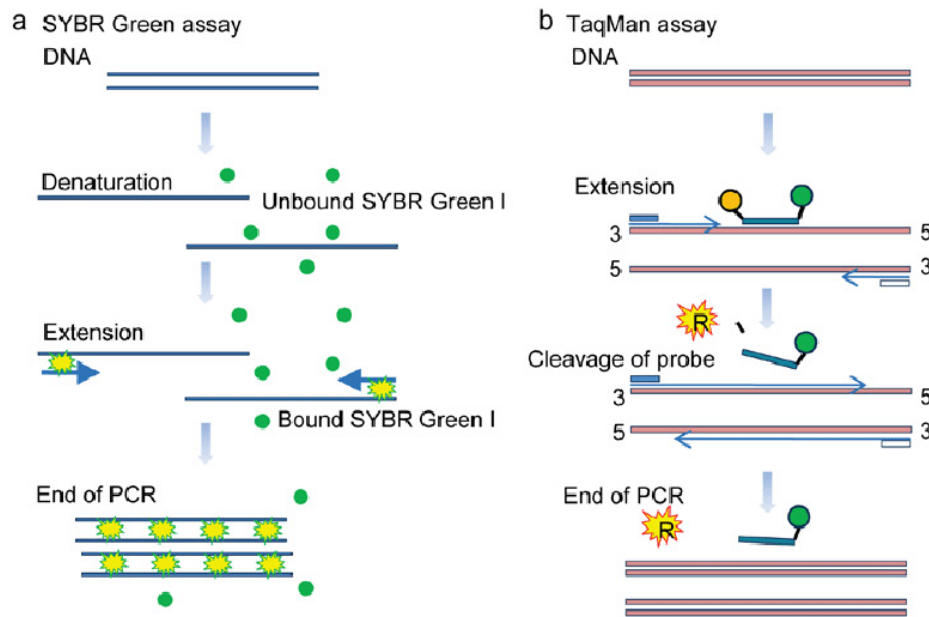


Figura 14. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real: (a) ensayo SYBR Green, (b) ensayo TaqMan (Bae & Ogram, 2015).

Para fines de esta investigación, la PCR se llevó a cabo de la siguiente manera:

Primero se cuantificaron las muestras de ARN con ayuda del espectrofotómetro Nanodrop, a una longitud de onda de $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Para evaluar el transcrito del gen p21, p53 y FoxO3a, se llevó a cabo la técnica de conversión de RNA a cDNA mediante retrotranscripción con la enzima transcriptasa reversa, utilizando el kit Verso cDNA Synthesis, para lo cual se necesitó 1 μL de Oligo (dT), 4 μL de 5x cDNA buffer, 2 μL de dNTP's Mix, 1 μL de RT Enhancer y 1 μL de la enzima Verso, se tomaron 9 μL del mix para cada preparación y 0.5 μg de ARN de cada muestra, enseguida se aforó a 20 μL de H₂O y se sometieron 30 minutos a 42°C, 2 minutos a 95°C y 10 minutos a 4°C en

el termociclador de punto final. Por último, las muestras se aforaron a 250 µL de H₂O libre de nucleasas y se conservaron a -20°C.

Una vez sintetizado el cDNA, para determinar la expresión de los genes de interés p21, p53 y FoxO3a, así como el gen de referencia HPRT, se emplearon sondas y primers específicos para su amplificación (ver apéndices, tabla 1-5) mediante q-PCR en tiempo real, se cargó el mix y cDNA por triplicado en una placa de 96 pozos, se selló perfectamente utilizando una película adhesiva óptica y se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos a 4°C, finalmente se incorporó la placa en el termociclador de q-PCR para la posterior amplificación de los genes p21, p53, FoxO3 y HPRT.

Western Blot

Otra técnica molecular aplicada fue Western Blot, también conocida como transferencia de proteínas o inmunotransferencia (debido al uso de anticuerpos para la detección de un antígeno específico), es una técnica que sirve para investigar la presencia de proteínas, localización celular, abundancia relativa, masa relativa, presencia de modificaciones postraduccionales (metilación, glicosilación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación y escisión), así como para estudiar las interacciones proteína-proteína (Begum *et al.*, 2022).

Estas aplicaciones brindan información valiosa tanto en investigación como en pruebas diagnósticas y terapéuticas. Western Blot se basa en la interacción específica de los anticuerpos con los antígenos diana presentes en la muestra (Pillai-Kastoori *et al.*, 2020).

Es el método estándar que se utiliza comúnmente para separar, visualizar, identificar y cuantificar diversas proteínas de una mezcla de proteínas compleja.

Esta mezcla de proteínas se separa llevando a cabo una electroforesis que permite la separación de grandes moléculas como ácidos nucleicos y proteínas a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE (De Dios L *et al.*, 2013).

Para la separación de ácidos nucleicos se utilizan matrices de agarosa y para la separación de proteínas se utilizan matrices de poliacrilamida (Navarro & Flores, 2019).

La separación de proteínas se ve favorecida de acuerdo con el peso molecular de las proteínas y el tamaño de los poros del gel. La separación de proteínas más

grandes necesita un porcentaje de acrilamida bajo ($\leq 8\%$), mientras que las proteínas más pequeñas se separan en un gel con más acrilamida ($\geq 12\%$).

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) fracciona las cadenas polipeptídicas en función de su tamaño, tiene varias propiedades fundamentales como claridad óptica, neutralidad eléctrica y disponibilidad en un amplio rango de porosidad. Estos geles se polimerizan a partir de acrilamida y N, N'-metileno bisacrilamida (Bis). Se usa SDS debido a que es un detergente que desnatura estructuras secundarias y terciarias no enlazadas con disulfuro y lo cubre con una carga negativa que se correlaciona con su longitud, permitiendo que los pesos moleculares sean estimados. La movilidad a través del gel puede verse afectada por el estado de la proteína, por ejemplo: fosforilación y presencia de moléculas multiméricas (Navarro & Flores, 2019).

Después de la separación de proteínas en función de su peso molecular, se realiza una transferencia electroforética de las proteínas a una membrana adsorbente de nitrocelulosa (Begum *et al.*, 2022).

La transferencia de proteínas es una poderosa herramienta para detectar y caracterizar múltiples proteínas, especialmente aquellas que son de baja abundancia (Kurien & Scofield, 2006).

La técnica comienza con la preparación de la muestra y termina con la detección de una proteína de interés específica (ver figura 15).

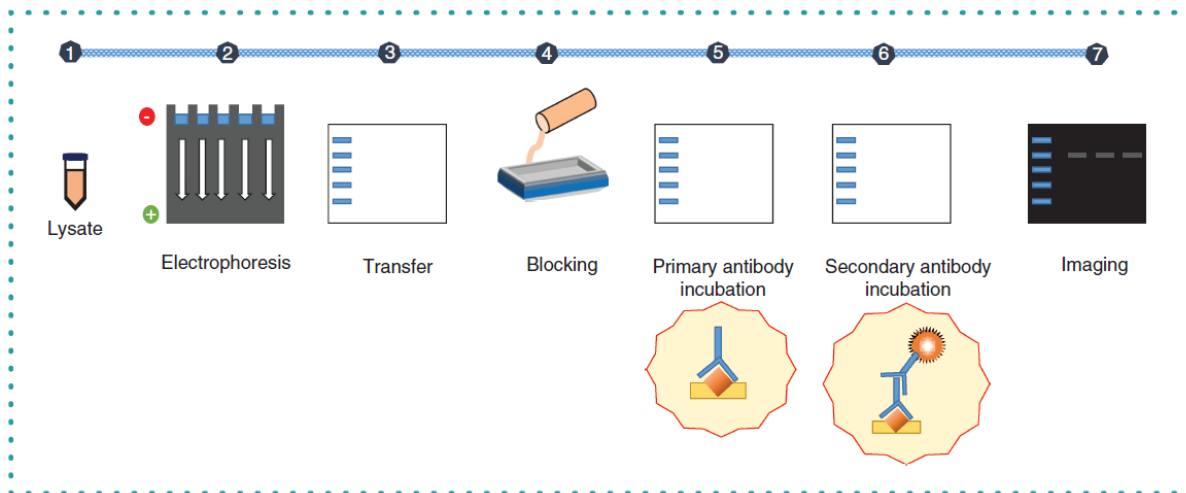


Figura 15. Esquema general de la técnica de Western Blot, los pasos incluyen la preparación de muestras, SDS-PAGE, transferencia de proteínas, bloqueo, incubación con anticuerpos primarios y secundarios, y finalmente la detección de la proteína diana mediante quimioluminiscencia (Begum *et al.*, 2022).

El objetivo de un control de carga en Western Blot, es proporcionar una estimación de la cantidad total de proteína transferida y validar visualmente el éxito y la

homogeneidad de la técnica. Para verificar la carga igual o la normalización de cualquier variación de carga, comúnmente se utilizan proteínas de mantenimiento como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), actina o tubulina (Begum *et al.*, 2022).

Para fines de esta investigación, la técnica de Western Blot se llevó a cabo de la siguiente manera:

Primero se obtuvieron proteínas de núcleo y citoplasma para lo cual se utilizó el kit NE-PER, de igual manera se obtuvieron lisados totales utilizando el Buffer RIPA. Se realizó una cuantificación de las proteínas utilizando una curva de BSA y reactivo de Bradford, se hicieron diluciones de las muestras 1:30 y se cargaron 10 μ L en placas de 96 pozos por duplicado, se adicionaron 200 μ L de Bradford a cada pozo y se cuantificó en un Lector de ELISA a $\lambda = 595$ nm.

Enseguida, se prepararon geles SDS-PAGE al 7.5% y 12% (ver apéndices, tabla 6), se preparó cada muestra con Laemmli Sample buffer 2x y se cargaron 10 μ g en los pozos correspondientes, así como 8 μ L del peso molecular (ver apéndices, figura 2), después se corrió una electroforesis a 80 V durante 3 horas.

Más tarde, se llevó a cabo la transferencia del gel a membranas de nitrocelulosa mediante la técnica de sándwich y se corrió a 100 V durante 1 hora.

Posteriormente, las membranas se bloquearon con BSA al 5% durante 1 hora y se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios específicos FoxO3a, Ac-FoxO3a, GADD45, p21 y p53 (ver apéndices, tabla 7).

Como control de carga se utilizó un anticuerpo β -actina, β -tubulina y H3. (ver apéndices, tabla 7).

Al día siguiente, las membranas se lavaron 4 veces con 10 mL de TBS-T 0.01% durante 10 minutos cada lavado y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (ver apéndices, tabla 7) durante 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz, a continuación, se lavaron 4 veces con 10 mL de TBS-T 0.05% durante 10 minutos. Por último, se reveló la marca con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL y se analizaron en un ChemiDoc, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo Cometa

El Ensayo Cometa (EC) o Electroforesis Alcalina de Células Individuales, es una técnica que se utiliza para medir las roturas y reparaciones de las cadenas de ADN monocatenario y bicatenario a nivel de células individuales (Gajski *et al.*, 2021).

Además de medir el daño del ADN, el Ensayo Cometa se puede utilizar para controlar la reparación celular o las roturas de hebras o bases oxidadas *in vitro*, con la inclusión de formamidopirimidina ADN glicosilasa para reconocer purinas oxidadas, o Nth (endonucleasa III) para detectar pirimidinas oxidadas. También tiene aplicaciones en la evaluación del estado antioxidante de las células (Collins, 2014).

Kucharova y colaboradores (2019) reportan que la sensibilidad y especificidad del Ensayo aumentan considerablemente si el ADN se incuba con una enzima que reconoce un tipo específico de daño en el ADN.

El principio del Ensayo señala que, bajo un campo eléctrico, el ADN fragmentado migra fuera del cuerpo nucleoide (también conocido como “cabeza de cometa”) y forma una mancha de ADN en el gel de agarosa (conocida como “cola del cometa”). Con la tinción de nucleótidos, el alcance del daño en el ADN se puede cuantificar analizando los “cometas” formados por esta electroforesis unicelular. Este daño al ADN se puede evaluar cuantitativamente utilizando una gran variedad de softwares para el Ensayo Cometa, basándose en imágenes digitalizadas utilizando microscopios de fluorescencia confocales o estándar después de teñir el núcleo celular con un tinte de ADN (Lu *et al.*, 2017; Walsh & Kato, 2022).

El Ensayo Cometa, ha logrado ubicarse en una posición privilegiada dentro de los ensayos utilizados para evaluar la respuesta de las células frente a agentes genotóxicos, estreses bióticos y abióticos que conducen a daño al ADN. Se han desarrollado diferentes versiones del Ensayo con el fin de ampliar el espectro de las lesiones al ADN que pueden ser detectadas. Estas modificaciones permiten medir diferentes tipos de alteraciones en la estructura del ADN (oxidación, alquilación entrecruzamientos, etc) y la capacidad de reparación del ADN (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015; Muruzabal *et al.*, 2020).

En su versión estándar, el Ensayo Cometa se lleva a cabo en condiciones alcalinas con base en el método descrito por Singh y colaboradores (1988), con ligeras modificaciones al método desarrollado por primera vez por Ostling y Johanson en 1984, el cual se aplicaba en condiciones neutras.

Zúñiga (2009) describe las etapas de la técnica, sin embargo, para fines de este proyecto se realizaron algunas modificaciones para el desarrollo del experimento, el cual se describe a continuación:

Se utilizaron portaobjetos limpios y desinfectados con etanol al 75%, se pusieron 3 capas de agarosa de distinto punto de fusión en forma de sándwich (ver apéndices, figura 1) primero se añadió una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMA) al 1%, previamente deshidratada a 60°C durante 1 hora. Posteriormente, se prepararon alícuotas con 60,000 células, cada una mezclada con 80 µL de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0.5% conservada a 37°C, a continuación, se depositó la mezcla celular sobre los portaobjetos y se colocó un cubreobjetos de 22x22 mm, se guardó a 4°C durante 1 hora para solidificar la capa. Después se incubó el portaobjetos a temperatura ambiente durante 1 hora y se agregó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) sobre la capa celular.

Una vez que las capas se encontraban sólidas, se sumergieron los portaobjetos en buffer lisis (ver apéndices, tabla 8 y 9) durante 1 hora a 4°C, más adelante se lavaron con PBS 1x durante 5 minutos a temperatura ambiente y se prosiguió a colocar las preparaciones en un tanque de electroforesis horizontal, se llenó con buffer de electroforesis (ver apéndices, tabla 10) de tal manera que los portaobjetos quedaron completamente sumergidos y se dejó reposar en esas condiciones durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se corrió una electroforesis durante 20 minutos a 25 V, 0.30 A y 2 W. Enseguida, los portaobjetos se sumergieron en el buffer de neutralización (ver apéndices, tabla 11) en un vaso coplin envuelto en aluminio a 4°C durante 15 minutos. Inmediatamente, las preparaciones se deshidrataron con 500 µL de etanol 75% por 3 minutos y se guardaron en una charola protectora de la luz durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, los portaobjetos se tiñeron con 50 µL de bromuro de etidio (BrEt) a una concentración de 0.4 µg/mL y se colocó encima un cubreobjetos de 24x60 mm, la visualización se llevó a cabo utilizando un microscopio de fluorescencia equipado con filtro de excitación de 480-550 nm, se observó en el filtro 3 y 5 (DAPI), en 4x a una exposición de 555.6 ms y en 10x a 454.6 ms.

RESULTADOS

RT-qPCR

Se evaluó la expresión génica de algunos genes relacionados con el daño y reparación del ADN: FoxO3a, así como p21 y p53 en fibroblastos de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) y líneas control. (ver figuras 16, 17 y 18). Para lo cual se utilizaron sondas TaqMan para FoxO3a, así como primers específicos para la expresión de p21 y p53, como gen de referencia se usó HPRT y se llevó a cabo su amplificación por medio de PCR en tiempo real (qPCR). Obteniendo los resultados descritos a continuación:

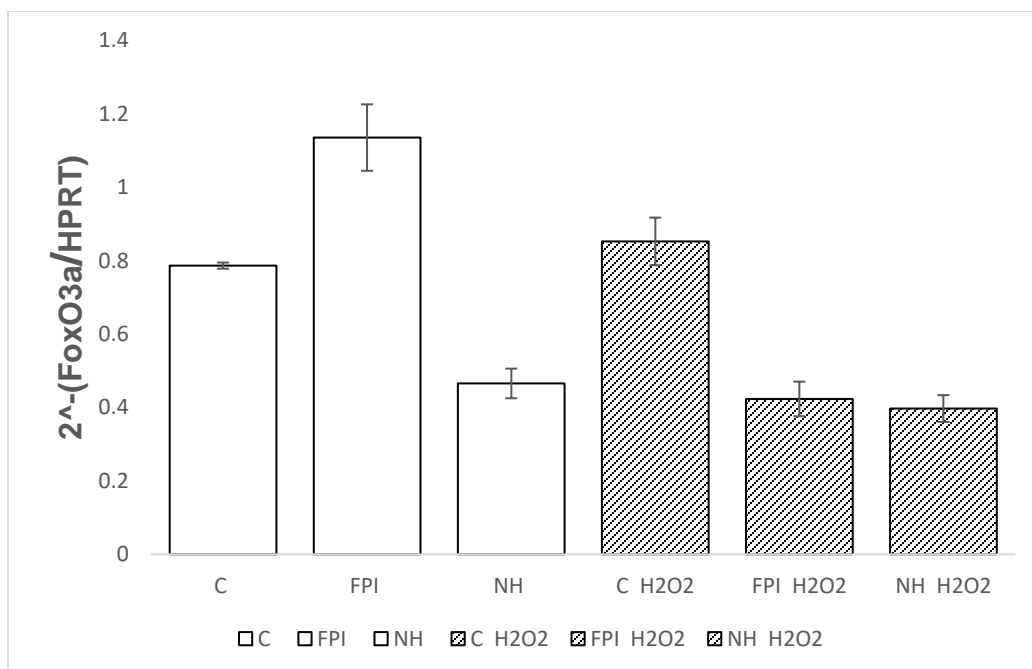


Figura 16. Expresión de FoxO3 a nivel gen en fibroblastos de FPI, NH y líneas control, en ausencia y presencia del estímulo de H₂O₂ a una concentración 650 μM durante 2 horas.

Se observó que no hubo un cambio en la expresión de FoxO3a en las líneas control en presencia del estímulo de H₂O₂, ya que no hay diferencia entre las desviaciones estándar. En cuanto a las patológicas, se puede apreciar que hay un cambio significativo en FPI, en ausencia del estímulo la expresión de FoxO3 aumenta y, por el contrario, ante el estímulo, la expresión disminuye considerablemente, es posible que la patología presente cierta resistencia al estímulo. A su vez, NH no tuvo el mismo comportamiento, en ausencia del estímulo se observó un ligero aumento en la expresión de FoxO3a que en

presencia de este, sin embargo, la diferencia no llegó a ser significativa debido a que las desviaciones estándar se sobrelapan.

Se ha reportado que FoxO3 participa en la expresión de una gran variedad de genes involucrados en diferentes procesos celulares, por lo que de igual manera se evaluó la expresión de genes blanco de FoxO3 tales como p21 y p53 en ausencia y presencia del estímulo de H₂O₂ para observar el comportamiento de los fibroblastos ante el daño causado en el ADN, obteniendo lo siguiente: (ver figura 17 y 18)

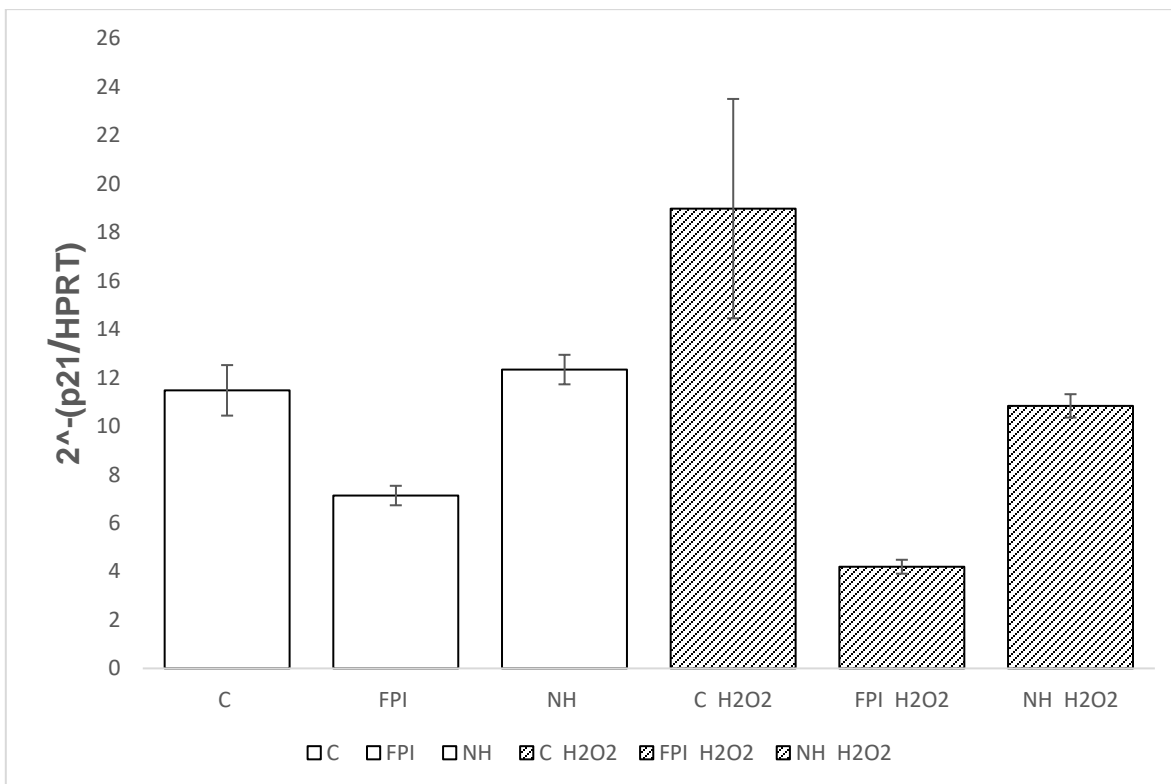


Figura 17. Expresión de p21 a nivel gen en muestras de fibroblastos de FPI, NH y líneas control, en ausencia y presencia del estímulo de H₂O₂ a una concentración 650 μM durante 2 horas.

En cuanto al análisis de expresión del gen p21, se puede observar que hay un incremento significativo del gen cuando las células son estimuladas con H₂O₂ en las líneas control.

Con base en la figura 17, puede observarse la misma tendencia que en la expresión de FoxO3a, ya que en este caso también hay un incremento en la expresión del gen p21 en presencia del estímulo en las líneas control, aquí se observan diferencias significativas en las desviaciones estándar. Por otro lado, las

líneas patológicas en ausencia del estímulo de H₂O₂ la expresión es mayor y, por el contrario, ante el estímulo se observa una disminución en la expresión del gen, observándose en FPI la diferencia mayormente significativa y en NH la diferencia es menor.

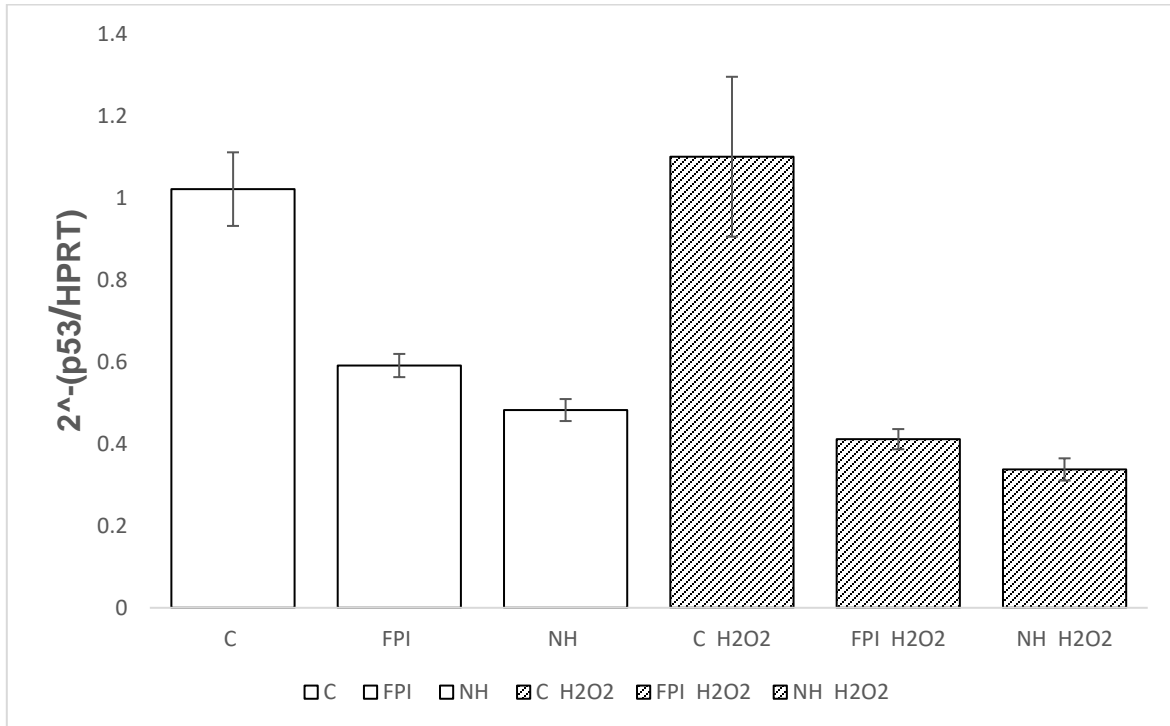


Figura 18. Expresión de p53 a nivel gen en fibroblastos de FPI, NH y líneas control, en ausencia y presencia del estímulo de H₂O₂ a una concentración 650 μM durante 2 horas.

En relación con la figura 18, el nivel de expresión de p53 (al igual que en los genes previamente descritos) es mayor en las líneas control en presencia del estímulo H₂O₂ que en ausencia, sin embargo, la expresión no es significativa ya que las desviaciones estándar no se encuentran tan alejadas. De nuevo, los fibroblastos de FPI y NH muestran el mismo comportamiento, en ausencia del estímulo hay una mayor expresión que en presencia, a su vez, FPI muestra un cambio significativo en la expresión del gen.

Ensayo Cometa

Para evaluar el daño al ADN en fibroblastos de FPI, NH y líneas control, las células fueron estimuladas con 650 μM de H_2O_2 durante 2 horas, se llevó a cabo la técnica del Ensayo Cometa a través de un análisis visual utilizando un microscopio de fluorescencia, así como una determinación cuantitativa mediante el software OpenComet v1.3 donde se determinó el porcentaje del daño con base en la medición de parámetros como la cola y la cabeza de los cometas encontrados.

El software detecta los cometas de tres maneras: puede captar cometas normales o aceptables, probables cometas y partículas con fluorescencia pero que no se consideran cometas (ver figura 19).

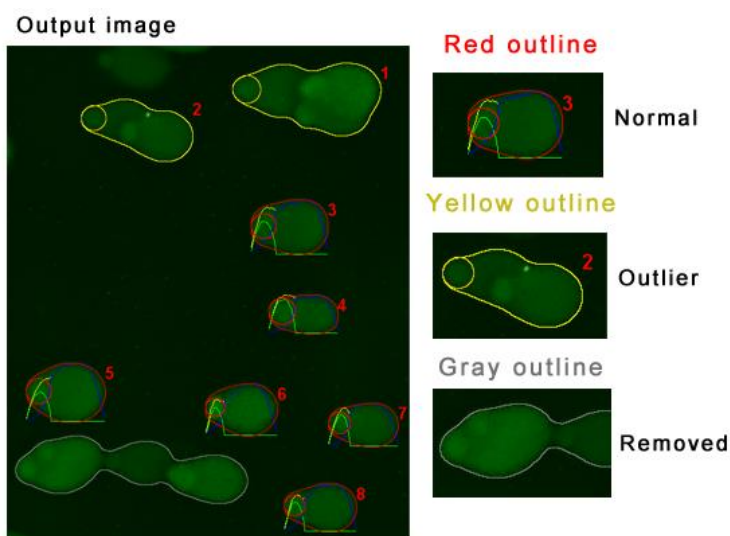


Figura 19. Posibles formas de detección de cometas por el software OpenComet.
1) Los cometas que se consideran aceptables o normales se encierran en un círculo rojo.
2) Los posibles cometas que no están muy bien definidos, se detectan en color amarillo.
3) El software detecta en color gris las partículas con fluorescencia que son parte de la imagen, pero que se descartan como cometas.

Una vez señalado el cometa, es importante conocer el perfil del cometa (ver figura 20).

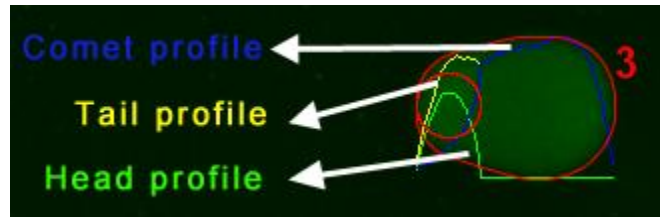
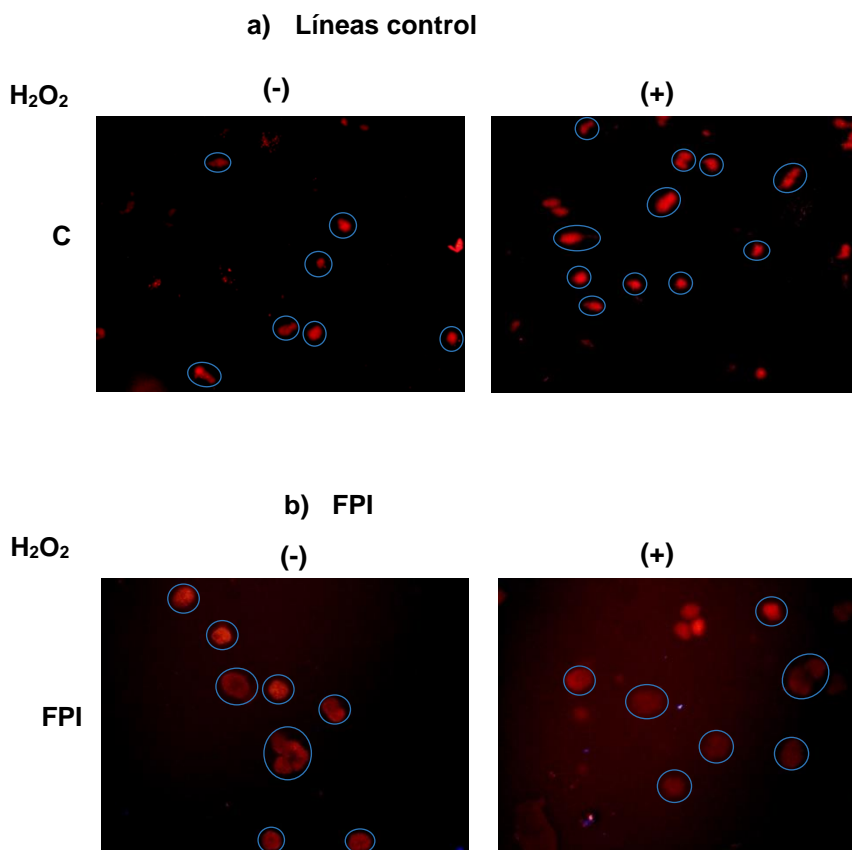


Figura 20. Perfil del cometa. El cometa es detectado de color azul (cabeza y cola), la cabeza del cometa se detecta en color verde y la cola de color amarillo.

A continuación, se presentan las imágenes de los cometas identificados en fibroblastos de FPI, NH y líneas control, ante la ausencia y presencia del estímulo de H_2O_2 (ver figura 21 y 22).



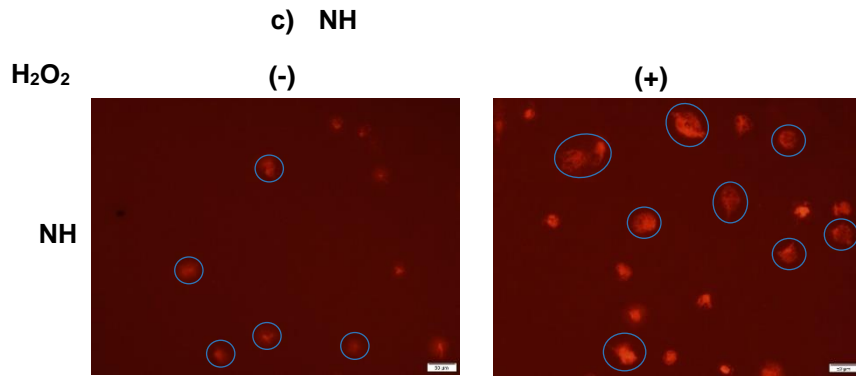
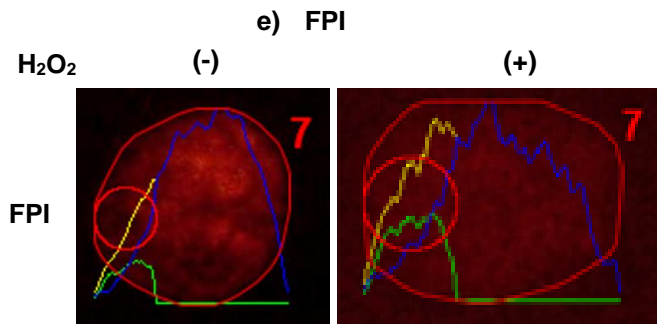
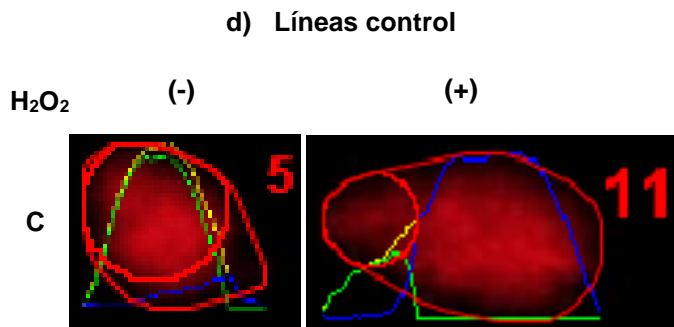


Figura 21. Determinación de cometas a partir de las imágenes resultantes de la visualización previa en un microscopio de fluorescencia en el filtro 3 en 10x a 454.6 ms. a) Líneas control. b) Fibroblastos de FPI. c) Fibroblastos de NH. Los fibroblastos se estimularon a [650 μM] de H₂O₂ durante 2 horas.



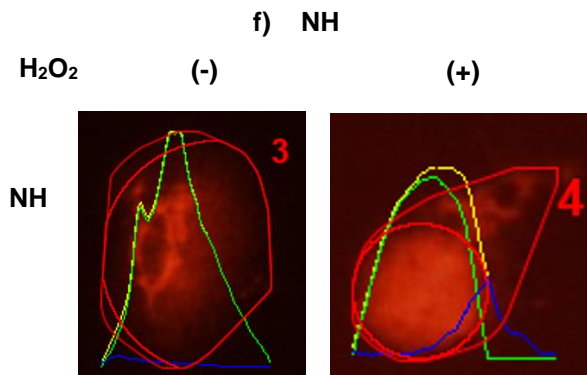


Figura 22. Perfil individual de los cometas detectados a partir de las imágenes resultantes de la visualización previa en un microscopio de fluorescencia en el filtro 3 en 10x a 454.6 ms. d) Líneas control. e) Fibroblastos de FPI. f) Fibroblastos de NH. Los fibroblastos se estimularon a [650 μ M] de H_2O_2 durante 2 horas.

En general, se puede observar una diferencia entre los cometas detectados en ausencia del estímulo de H_2O_2 y en presencia, como se espera, en ausencia hay menor cantidad de cometas y estos no se encuentran definidos tanto en fibroblastos de FPI y NH, así como en las líneas control, ya que el ADN no sufre un daño significativo y, por lo tanto, no se forma la cola del cometa.

Por otro lado, ante el estímulo se puede apreciar un cambio en la morfología celular, en este caso tanto en fibroblastos de FPI como en NH y las líneas control, se muestra el perfil completo del cometa, señalando la cabeza y la cola que representa un daño presente en el ADN.

Se llevó a cabo un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de un factor en el software Statgraphics Centurion con un nivel de confianza del 95%, donde se obtuvo un valor de $p=0.0011$, menor que $p<0.05$, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias del % de ADN presente en la cola del cometa en líneas control y fibroblastos de FPI y NH.

Western Blot

Se evaluaron las modificaciones a nivel proteína de FoxO3a, su forma acetilada Ac-FoxO3a, así como proteínas blanco de FoxO3a que participan en el daño y reparación en el ADN como p53, p21 y GADD45a, en ausencia y presencia del estímulo de H₂O₂ a una concentración 650 μ M durante 2 horas. Por lo que se realizó la extracción de proteínas de núcleo y citoplasma, así como lisados totales, las proteínas se cargaron en geles SDS-PAGE al 7.5% y al 12% (parámetro tomado en cuenta con base en el peso molecular de las proteínas de interés, por lo que para proteínas pequeñas se realizaron geles al 12% y para proteínas grandes se prepararon geles al 7.5%) después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron por medio de Western Blot. Como control de carga se emplearon Histona 3 (H3) para extractos nucleares, β -actina y β -tubulina para lisados totales y citoplasma.

Se analizó FoxO3 total (FoxO3a) y FoxO3 acetilado (Ac-FoxO3a), obteniendo que la expresión fue mayor en FoxO3a, ya que las bandas se muestran más intensas, por otro lado, las bandas de Ac-FoxO3a son muy tenues. De acuerdo con la ausencia/presencia del estímulo de H₂O₂, para FoxO3a la banda se muestra más intensa en ausencia del estímulo. En contraste con Ac-FoxO3a, se observa mayor expresión en presencia del estímulo (ver figura 23).

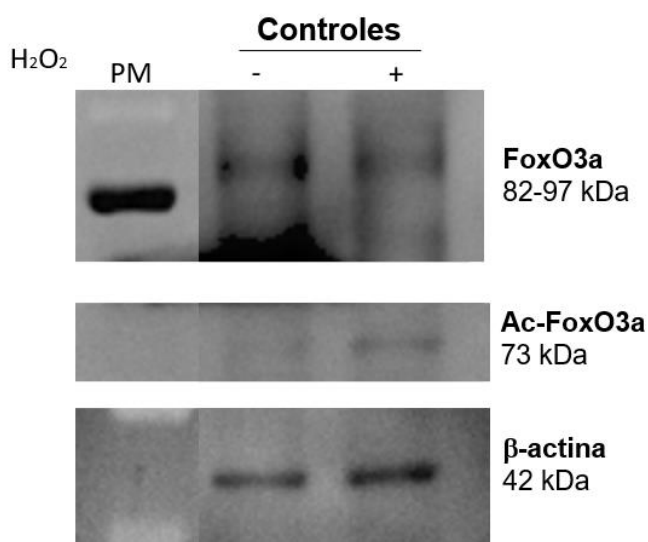


Figura 23. Expresión a nivel proteína de FoxO3a y Ac-FoxO3a. Se analizaron las líneas control en un gel SDS-PAGE al 7.5% cargando 10 μ g de proteínas de lisados totales, en ausencia y en presencia del estímulo de H₂O₂ a 650 μ M, utilizando como control de carga β -actina. La intensidad de las bandas es mayor en FoxO3a que en FoxO3a en su forma acetilada (Ac-FoxO3a).

También se comparó a FoxO3a y Ac-FoxO3a en fibroblastos de FPI y NH, observando que la expresión fue mayor en FoxO3a comparada con Ac-FoxO3a donde la intensidad de las bandas es muy baja.

Hablando de la ausencia y presencia del estímulo de H₂O₂ a 650 μM, tanto en FoxO3a como en Ac-FoxO3a, no se aprecia una diferencia significativa en la expresión de las proteínas en ambas patologías (ver figura 24).

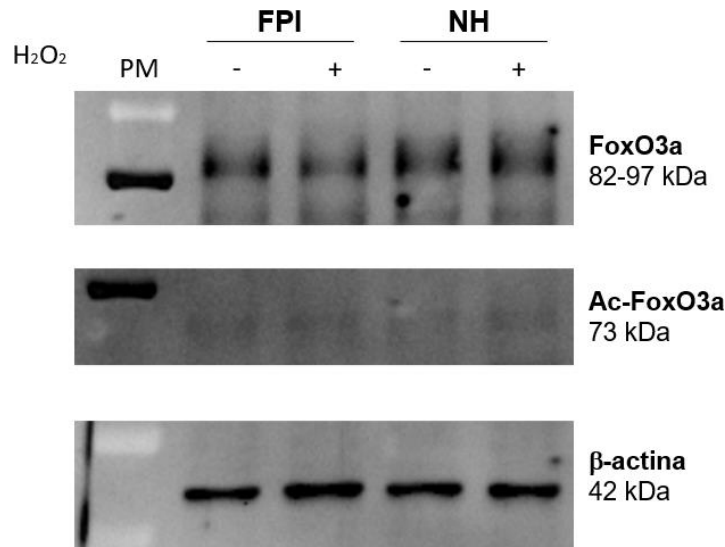


Figura 24. Expresión a nivel proteína de FoxO3a y Ac-FoxO3a. Se analizaron fibroblastos de FPI y NH en un gel SDS-PAGE al 7.5% cargando 10 μg de proteínas de lisados totales, en ausencia y en presencia del estímulo de H₂O₂ a 650 μM, utilizando como control de carga β-actina. La intensidad de las bandas es mayor en FoxO3a que en FoxO3a en su forma acetilada (Ac-FoxO3a).

Además, se observó la expresión de p53 y p21 a nivel proteína a partir de extracto nuclear y citoplasmático. En la figura 25 se muestra la expresión del extracto nuclear de líneas control, así como de fibroblastos de FPI y NH en ausencia del estímulo de H₂O₂ a 650 μM, se puede apreciar que la expresión de p53 fue mayor en fibroblastos de NH, mientras que en fibroblastos de FPI y líneas control, tuvo un comportamiento similar. De igual manera, p21 mostró una mayor expresión en fibroblastos de NH, dado que sus bandas son más intensas que las que se observan en fibroblastos de FPI y líneas control, sin embargo, en fibroblastos de FPI hubo mayor expresión que en las líneas control.

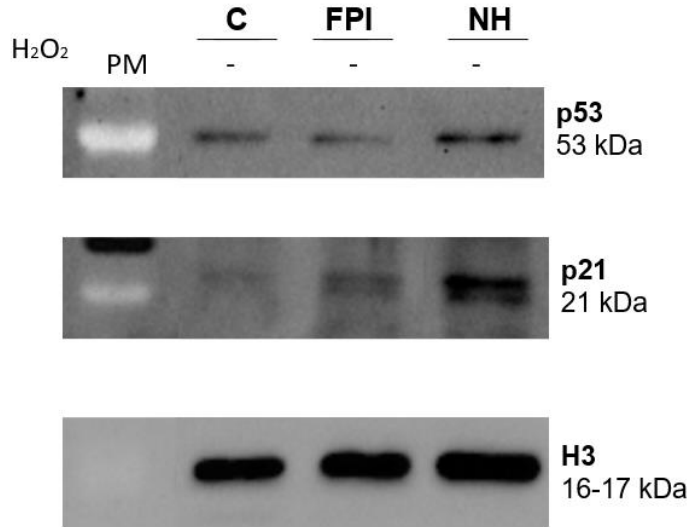


Figura 25. Expresión a nivel proteína de p53 y p21. Se analizaron líneas control, fibroblastos de FPI y NH en un gel SDS-PAGE al 12% cargando 10 µg de proteínas de extracto nuclear, en ausencia del estímulo de H₂O₂ a 650 µM, utilizando como control de carga Histona 3 (H3). Ambas proteínas se expresan mayoritariamente en fibroblastos de NH.

En presencia del estímulo de H₂O₂ a 650 µM en extracto nuclear de líneas control, fibroblastos de FPI y NH, la expresión de p53 es mayor en las líneas control que en las patológicas, sin embargo, entre las patológicas se expresa más en fibroblastos de NH. La expresión de p21 es muy poca, se observa igual para fibroblastos de FPI y líneas control, en el caso de los fibroblastos de NH, la banda se observa ligeramente más intensa en comparación con fibroblastos de FPI (ver figura 26).

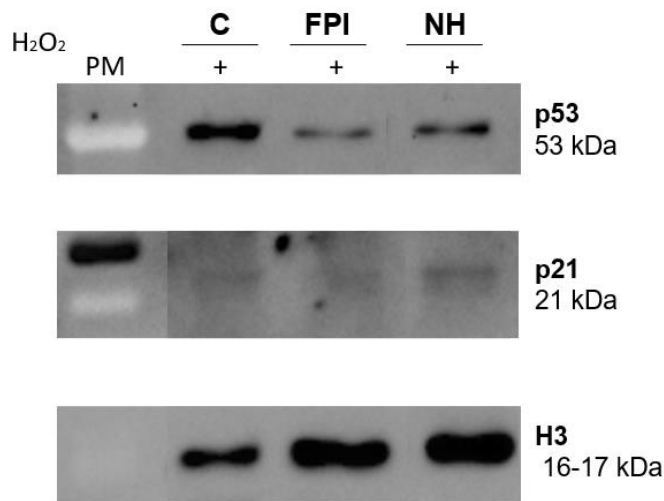


Figura 26. Expresión a nivel proteína de p53 y p21. Se analizaron líneas control, fibroblastos de FPI y NH en un gel SDS-PAGE al 12% cargando 10 µg de proteínas de

extracto nuclear, en presencia del estímulo de H₂O₂ a 650 μM, utilizando como control de carga Histona 3 (H3). Ambas proteínas se expresan, sin embargo, la expresión de p53 es mayor, de igual manera, la expresión de ambas proteínas es ligeramente mayor en fibroblastos de NH.

Por otra parte, en la figura 27 se muestra la expresión utilizando el extracto citoplasmático de líneas control, así como fibroblastos de FPI y NH en ausencia del estímulo de H₂O₂ a 650 μM, se puede apreciar que la expresión de p53 fue mayor que p21, ya que presenta una mayor intensidad en las bandas, hay mayor expresión de esta proteína en las patologías que en las líneas control, asimismo, esta expresión es mayor en fibroblastos de NH. En cuanto a la proteína p21, su expresión fue mayor en fibroblastos de NH, mientras que en fibroblastos de FPI y líneas control tuvo un comportamiento similar.

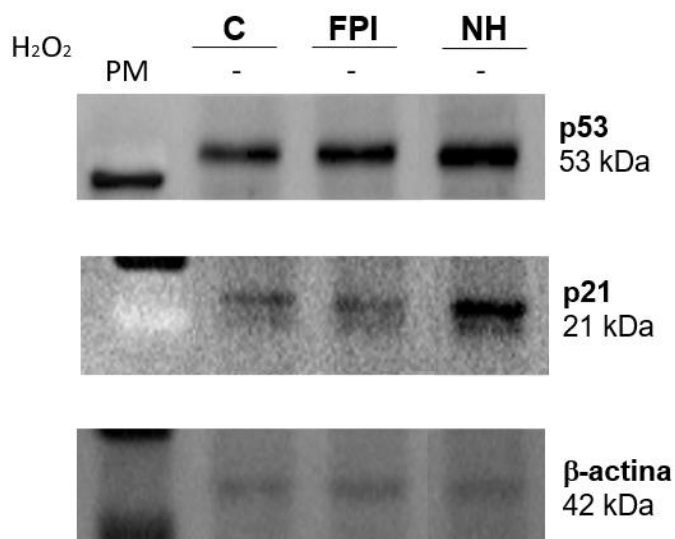


Figura 27. Expresión a nivel proteína de p53 y p21. Se analizaron líneas control, fibroblastos de FPI y NH en un gel SDS-PAGE al 12% cargando 10 μg de proteínas de extracto citoplasmático, en ausencia del estímulo de H₂O₂ a 650 μM, utilizando como control de carga β-actina. Ambas proteínas se expresan, sin embargo, la expresión de p53 es mayor, de igual manera, la expresión de ambas proteínas es ligeramente mayor en fibroblastos de NH.

Ante el estímulo de H₂O₂ a 650 μM en el extracto citoplasmático de líneas control, así como de fibroblastos de FPI y NH, la expresión de p53 fue más baja que la de p21, sin embargo, se expresó mayormente en las líneas control comparadas con las patológicas. Entre los fibroblastos se observa una expresión ligeramente mayor en NH. En cuanto a la expresión de p21, fue más alta en las líneas patológicas que en los controles, a su vez, se expresa más en fibroblastos de NH que en FPI (ver figura 28).

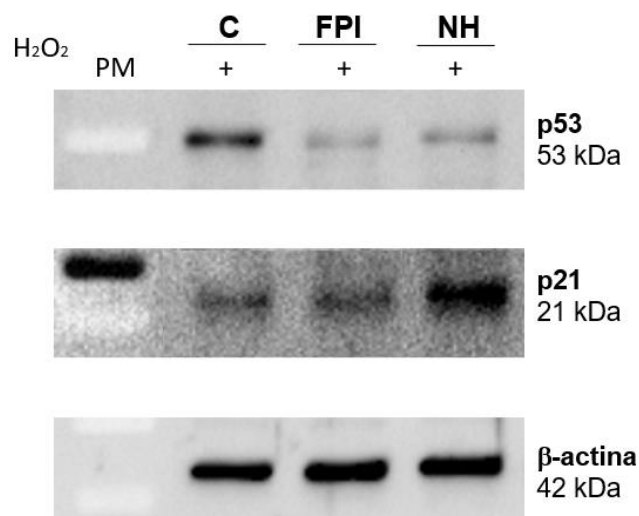


Figura 28. Expresión a nivel proteína de p53 y p21. Se analizaron líneas control, así como fibroblastos de FPI y NH en un gel SDS-PAGE al 12% cargando 10 μ g de proteínas de extracto citoplasmático, en presencia del estímulo de H₂O₂ a 650 μ M, utilizando como control de carga β -actina. Ambas proteínas se expresan, sin embargo, la expresión de p21 es mayor que p53, de igual manera se expresan más en fibroblastos de NH.

DISCUSIÓN

La toxicidad oxidativa es un desafío frecuente para la homeostasis celular que puede desencadenarse por una variedad de factores endógenos y exógenos. A pesar de que el H₂O₂ en bajas concentraciones puede desempeñar múltiples funciones en la célula, resulta una fuente principal (tanto endógena como exógena), de especies reactivas de oxígeno (ROS), la producción excesiva de estas especies o la escases en cuanto a defensas antioxidantes para contrarrestarlo, provoca estrés oxidativo, lo que puede contribuir a la disfunción celular o al desarrollo de diversas patologías. Asimismo, estas especies reactivas de oxígeno pueden provocar daño oxidativo en el ADN que, de acuerdo con Blanco y colaboradores (2018), la exposición al H₂O₂ provoca modificaciones oxidativas de las bases nitrogenadas del ADN y/o roturas de simples y dobles cadena (SSB y DSB, respectivamente) debido a la acción directa o la generación de radicales libres. Para fines de esta investigación, se utilizó H₂O₂ como fuente exógena para dañar el ADN de fibroblastos de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) y también líneas control. La genotoxicidad se indujo por exposición aguda, es decir, una dosis alta única, en este caso de 650 μ M durante 2 horas.

La Electroforesis Alcalina de Células Individuales (Ensayo Cometa) se utiliza ampliamente en pruebas de genotoxicidad para examinar los efectos sobre el ADN de exposiciones que puedan provocar un daño, tal es el caso del estímulo con H_2O_2 . En general, tanto los fibroblastos de Fibrosis Pulmonar Idiopática como los fibroblastos de Neumonitis por Hipersensibilidad muestran alteración en su morfología al ser estimulados con H_2O_2 , lo que resulta en cometas con un perfil completo, es decir, se puede observar la cabeza y cola del cometa (que corresponde al daño presente en el ADN) por otra parte, los cometas identificados en ausencia del estímulo, no cumplen con las características del perfil de los cometas, por lo que se logra apreciar una diferencia entre estos grupos.

Las células están constantemente expuestas a diversos tipos de ataques genotóxicos que desafían la estabilidad del genoma, incluidos aquellos que inducen daño oxidativo en el ADN, tal es el caso del estímulo con H_2O_2 . No obstante, con base en la literatura, se han reportado estudios sobre la adaptación al estrés oxidativo *in vitro*, los cuales se han realizado ante exposiciones cortas y modelos de estrés agudo que no permiten la inducción completa de procesos celulares que pueden resultar en una respuesta adaptativa, ya que se emplea una dosis única de oxidantes en un corto lapso de tiempo, por lo que se recomienda la exposición crónica de las líneas control y fibroblastos de FPI y NH ante el estímulo de H_2O_2 (es decir, dosis bajas/moderadas durante un mayor lapso de tiempo) para observar este comportamiento, ya que un estudio reportado por Santa-González y colaboradores (2016), demostraron que la exposición crónica y repetida a una concentración micromolar de H_2O_2 podría activar las respuestas al daño del ADN, lo que resultaría en adaptaciones celulares. Informaron que la exposición intermitente a largo plazo de este estímulo oxidativo casi eliminó la toxicidad celular y disminuyó significativamente la genotoxicidad (en particular, una disminución >5 veces en las roturas de doble cadena). Esta protección se asoció con la detención del ciclo celular en G2/M y la inducción de la expresión de genes de reparación del ADN. En conjunto, esta evidencia respaldó una respuesta adaptativa al estrés oxidativo crónico de bajo nivel que da como resultado una protección genómica y un mantenimiento regulado de la homeostasis celular.

Si bien, la exposición aguda de especies reactivas de oxígeno desencadena una serie de mecanismos de defensa que contrarrestan el daño causado, se ha comprobado que el factor de transcripción FoxO3a participa en la protección contra el estrés oxidativo al inducir la expresión de proteínas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD), a su vez, De Moraes y colaboradores (2016) señalaron que FoxO3a desempeña un papel fundamental en la respuesta celular mediante la regulación de la expresión de genes esenciales para la reparación del daño al ADN, tal es el caso de p21 y p53.

En cuanto a los resultados de la RT-qPCR donde se evaluó la expresión a nivel gen de p21, p53 y FoxO3a en fibroblastos de FPI, NH y líneas control, se obtuvo que hay una mayor expresión de los tres genes evaluados en las líneas control en comparación con las patológicas, lo que podría significar que ante las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID), como FPI y NH, se desconoce el comportamiento de los fibroblastos, y el resultado puede ser muy heterogéneo por lo que valdría la pena en un futuro evaluar más líneas celulares para poder observar un efecto más representativo ya que lo que se logró apreciar fue lo contrario a lo esperado, que ante el estímulo, haya mayor expresión de los genes relacionados con la reparación en el ADN, que en ausencia del estímulo. Sin embargo, las líneas control respondieron como se esperaba, ya que, en ausencia del estímulo la expresión de los genes evaluados fue menor, y contrario a esto, ante el estímulo se observa una mayor expresión de p21, p53 y FoxO3a.

Por otro lado, se pudo observar que la expresión del gen FoxO3a es mayor en fibroblastos de NH comparados con los fibroblastos de FPI, en ausencia del estímulo hay una mayor expresión que en los fibroblastos estimulados, es posible que, ante la fisiopatología, los fibroblastos presenten cierta resistencia al estímulo como una vía de señalización para activar a FoxO3a y asimismo contrarrestar el daño causado en el ADN.

Chung y colaboradores (2012) señalan que el factor de transcripción FoxO3a y p53 comparten varias similitudes en sus funciones y regulaciones, no solo interactúan entre sí, sino que también regulan la actividad o la estabilidad de cada uno.

Debido a que FoxO3a desempeña un papel en la activación de genes que participan en la reparación ante el daño en el ADN, como p21 y p53, los resultados presentan un comportamiento similar al de FoxO3a, dando a conocer que tanto p21 como p53 son genes que se expresaron principalmente en fibroblastos de NH que en fibroblastos de FPI, asimismo, se observó una menor expresión cuando los fibroblastos se expusieron al estímulo, y en ausencia de este, hubo una mayor expresión. Confirmando que FoxO3a participa en la transcripción de estos genes, por lo que, si este gen no se expresó en presencia del H₂O₂, entonces p21 y p53 no se expresaron como se esperaba en respuesta al estímulo que provocó un daño al ADN.

A su vez, se recomienda hacer estudios de las modificaciones postraduccionales tanto de FoxO3a como de sus genes blanco para saber si hay alguna relación entre ellos, ya que Chung y colaboradores (2012) reportaron que p53 fosforilado, inhibe la actividad de FoxO3a. También, Fluteau y colaboradores (2015) señalaron que la fosforilación postraduccionale de FoxO3a regula la translocación de FoxO3a desde el núcleo al citosol, lo que resulta en la represión de la transcripción de

genes asociados con la protección contra el estrés oxidativo, reparación del ADN y la anti-apoptosis.

Por otro lado, al evaluar a nivel proteína mediante Western Blot, a FoxO3a total, FoxO3a acetilado (Ac-FoxO3a) en lisados totales y p53, p21 y GADD45a en fraccionamiento celular núcleo-citoplasma, tanto en líneas control como en fibroblastos de FPI y NH, la expresión de la proteína fue mayor para FoxO3a que para Ac-FoxO3a, asimismo, se expresaron más en los fibroblastos de FPI y NH en comparación con las líneas control. A su vez, en ausencia y presencia del estímulo de H₂O₂, no se observa diferencia en la expresión de FoxO3a en FPI y NH, sin embargo, en las líneas control si se nota una diferencia en las bandas correspondientes a Ac-FoxO3a, ya que en ausencia del estímulo es casi imperceptible la expresión; y, por el contrario, en donde hubo estímulo, se incrementa la expresión.

En cuanto al análisis de expresión de p53, p21 y GADD45a en extractos nucleares provenientes de fibroblastos de FPI, NH y líneas control, las líneas patológicas presentan una mayor expresión de la proteína p53 y p21 en comparación con las líneas control. En ausencia del estímulo, tanto p53 como p21 tuvieron una mayor expresión en fibroblastos de NH que en fibroblastos de FPI.

En presencia del estímulo en extracto nuclear de fibroblastos de FPI, NH y líneas control, p53 se expresa de mayor manera en fibroblastos de NH, por otro lado, la expresión de p21 es muy baja, pero se expresa más en fibroblastos de NH, la proteína que tuvo mayor expresión ante el estímulo fue p53.

En cuanto a los resultados obtenidos de las fracciones citoplásmicas de fibroblastos de FPI, NH y líneas control, en ausencia del estímulo, se puede apreciar que la expresión de p53 fue mayor que p21. Sin embargo, con el estímulo, la expresión de p53 se ve disminuida en comparación con la de p21. Tanto en ausencia como en presencia del estímulo, la expresión fue mayor en fibroblastos de NH.

Los resultados anteriores coinciden con el análisis del estudio realizado mediante RT-qPCR, ya que también hay una mayor expresión, pero a nivel gen de los fibroblastos que no se expusieron al estímulo en comparación con los que fueron estimulados, predominando la expresión de los fibroblastos de NH.

Se sabe que FoxO3a aumenta la expresión de un grupo de genes que forman parte en la respuesta celular al estrés, entre los cuales se encuentra GADD45a, quien media los efectos de FoxO3a sobre la progresión de la fase G2-M del ciclo celular, así como la reparación del ADN. Los tres miembros de la familia GADD45: GADD45 α , GADD45 β y GADD45 γ , se expresan en respuesta a estímulos de

estrés que inducen daño al ADN. La transcripción de GADD45a está mediada por la unión directa de FoxO3a a su promotor (Tran *et al.*, 2002).

GADD45a fue otra proteína que se intentó evaluar mediante Western Blot, primero se analizó en proteínas de lisado total, sin embargo, no se obtuvo ninguna marca para esta proteína en las muestras obtenidas con y sin estímulo.

Con base en la literatura, GADD45a es una proteína nuclear, por lo que también se llevó a cabo el análisis en proteínas de extracto nuclear, se estandarizó la técnica utilizando el anticuerpo primario GADD45a a una dilución de 1:500. No obstante, al buscarla en extractos nucleares de fibroblastos de FPI, NH y líneas control, no se logró identificar ninguna banda. Por lo que, para futuras investigaciones, se sugiere probar otras concentraciones del anticuerpo primario o secundario, así como probar a nivel gen mediante primers específicos.

CONCLUSIÓN

Con base en lo anterior, tanto a nivel proteína como a nivel gen, los fibroblastos de NH demostraron una mayor expresión para FoxO3a, p21 y p53 (relacionados con el daño al ADN), la baja expresión de estos genes en fibroblastos de FPI, podría deberse a que el daño fue mayor y por lo tanto fue más difícil revertirlo, o ya que los fibroblastos al provenir de dos patologías como FPI y NH son más resistentes al daño.

Si bien, lo que se esperaba era que los genes tuvieran una mayor expresión en presencia del estímulo, se obtuvo lo contrario, por lo que quizás ante una exposición crónica al H₂O₂, se activen FoxO3a, p21 y p53 en respuesta al daño en el ADN tanto en fibroblastos de NH como en FPI incrementando así su expresión en presencia del estímulo.

De acuerdo con lo anterior, se rechaza la hipótesis propuesta, ya que tanto a nivel gen como a nivel proteína en presencia del estímulo, no se logró demostrar que el factor de transcripción FoxO3a participara en respuesta al daño oxidativo al ADN de fibroblastos tanto de FPI como de NH, ya que no activó las proteínas p53 y p21 para revertir su efecto, por lo que se recomienda usar una dosis más baja de H₂O₂ en un tiempo más largo.

Asimismo, no se logró evaluar a la proteína GADD45a debido a inconvenientes con la estandarización del anticuerpo primario. Por otra parte, se cumplieron satisfactoriamente cada uno de los objetivos planteados en esta investigación, se estimularon los cultivos celulares primarios (líneas control y fibroblastos de FPI y

NH) con 650 μM de H_2O_2 durante 2 horas, donde a través del microscopio se observó la morfología antes y después de la exposición ante el estímulo y se pudo apreciar una diferencia. También, se llevó a cabo la extracción de ARN, núcleo/citoplasma y lisados totales para la obtención de proteínas. El daño presente en el ADN se evaluó mediante el Ensayo Cometa, y, además, se analizó la expresión a nivel gen p21, p53 y FoxO3 utilizando sondas y primers específicos para su amplificación mediante q-PCR en tiempo real, así como observar las modificaciones a nivel proteína de p21, p53, FoxO3 y FoxO3a entre los estimulados con H_2O_2 vs controles mediante Western Blot.

REFERENCIAS

- ❖ Al-Tamari, H. M., Dabral, S., Schmall, A., Sarvari, P., Ruppert, C., Paik, J., DePinho, R. A., Grimminger, F., Eickelberg, O., Guenther, A., Seeger, W., & Savai, R. (2018). FoxO3 an important player in fibrogenesis and therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis. *EMBO Molecular Medicine*, 10(2), 276-293. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606261>
- ❖ Ancochea Bermúdez, J., & De Miguel Díez, J. (2008). *Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas* (12.^a ed., pp. 9–12). Madrid: ERGON. Recuperado el 20-01-2023 de: https://www.neumomadrid.org/wp-content/uploads/monog_neumomadrid_xii.pdf
- ❖ Ansoar-Rodríguez, Y., Fontanetti, C. S., Christofolletti, C. A., & Díaz-Llera, S. D. C. (2015). Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46(1), 51-62.
- ❖ Arab, K., Karaulanov, E., Musheev, M. U., Trnka, P., Schäfer, A., Grummt, I., & Niehrs, C. (2019). GADD45A binds R-Loops and recruits TET1 to CPG Island promoters. *Nature Genetics*, 51(2), 217-223. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0306-6>
- ❖ Bae, H., & Ogram, A. (2015). Molecular genetic analysis of wetland soils. En *Soil Science Society of America book series* (pp. 349-372). <https://doi.org/10.2136/sssabookser10.c18>
- ❖ Barnes, H., Troy, L., Lee, C. T., Sperling, A. I., Streck, M. E., & Glaspole, I. (2021). Hypersensitivity pneumonitis: Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Allergy*, 77(2), 442-453. <https://doi.org/10.1111/all.15017>
- ❖ Begum, H., Murugesan, P., & Tangutur, A. D. (2022). Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques*, 73(1), 58-69. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003>
- ❖ Blanco, A. P., García, S. F., Riverón-Forment, G., Gutiérrez, R. G., Balboa, J. P., de Armas Santiesteban, A., Molina, G. L., & Izadal, Y. L. (2018). Daño al ADN y capacidad de reparación en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas tratados con poliquimioterapia. *Revista habanera de ciencias médicas*, 17(2), 178–189. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2208>
- ❖ Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L., Cheng, H., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., & Greenberg, M. E. (2004). Stress-Dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303(5666), 2011-2015. <https://doi.org/10.1126/science.1094637>
- ❖ Cebollero, P., Echechipía, S., Echeгойen, A., Lorente, M. P., & Fanlo, P. (2005). Neumonitis por hipersensibilidad (alveolitis alérgica extrínseca). *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 28, 91–99.

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000200012

- ❖ Charitou, P., & Burgering, B. M. (2013). Forkhead Box(O) in control of reactive oxygen species and genomic stability to ensure healthy lifespan. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(12), 1400-1419. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4921>
- ❖ Chung, Y., Park, S., Tsai, W. B., Wang, S. Y., Ikeda, M. A., Berek, J. S., Chen, D. J., & Hu, M. C. (2012). FOXO3 signalling links ATM to the P53 apoptotic pathway following DNA damage. *Nature Communications*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms2008>
- ❖ Collins, A. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(2), 794-800. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.022>
- ❖ Costabel, U., Miyazaki, Y., Pardo, A., Koschel, D., Bonella, F., Spagnolo, P., Guzman, J., Ryerson, C. J., & Selman, M. (2020). Hypersensitivity pneumonitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0191-z>
- ❖ D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813-824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
- ❖ Daitoku, H., Sakamaki, J., & Fukamizu, A. (2011). Regulation of FOXO transcription factors by acetylation and protein–protein interactions. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1813(11), 1954-1960. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.001>
- ❖ De Dios L, T., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78. <https://biblat.unam.mx/es/revista/investigacion-en-discapacidad/articulo/fundamentos-de-la-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr-y-de-la-pcr-en-tiempo-real>
- ❖ De Moraes, G. N., Bella, L., Zona, S., Burton, M., & Lam, E. W. (2016). Insights into a critical role of the FOXO3A-FOXO1 axis in DNA damage response and genotoxic drug resistance. *Current Drug Targets*, 17(2), 164-177. <https://doi.org/10.2174/1389450115666141122211549>
- ❖ Engeland, K. (2022). Cell Cycle Regulation: P53-P21-RB Signaling. *Cell Death & Differentiation*, 29(5), 946-960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- ❖ Fluteau, A., Ince, P. G., Minett, T., Matthews, F. E., Brayne, C., Garwood, C. J., Ratcliffe, L. E. K., Morgan, S. V., Heath, P. R., Shaw, P. J., Wharton, S. B., & Simpson, J. E. (2015). The nuclear retention of transcription factor FOXO3A correlates with a DNA damage response and increased glutamine synthetase expression by astrocytes suggesting a neuroprotective role in the ageing brain. *Neuroscience Letters*, 609, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.001>

- ❖ Gajski, G., Ravlić, S., Godschalk, R., Collins, A., Dusinska, M., & Brunborg, G. (2021). Application of the comet assay for the evaluation of DNA damage in mature sperm. *Mutation Research-reviews in Mutation Research*, 788, 108398. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108398>
- ❖ GeneCards (s.f.). *CDKN1A gene - genecards | CDN1A protein | CDN1A antibody*. Recuperado el 11-07-2023 de: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Cdkn1a>
- ❖ GeneCards (s.f.). *GADD45A gene - genecards | GA45A protein | GA45A antibody*. Recuperado el 11-07-2023 de: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GADD45A>
- ❖ GeneCards (s.f.). *TP53 gene - genecards | p53 protein | p53 antibody*. Recuperado el 11-07-2023 de: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53>
- ❖ Greer, E. L., & Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24(50), 7410-7425. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209086>
- ❖ Hori, Y. S., Kuno, A., Hosoda, R., & Horio, Y. (2013). Regulation of FOXOs and P53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *PLOS ONE*, 8(9), e73875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073875>
- ❖ Im, J., Hergert, P., & Nho, R. S. (2015). Reduced FOXO3A expression causes low autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts on collagen matrices. *American Journal of Physiology-lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(6), L552-L561. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00079.2015>
- ❖ José, B. G. F. (2009). *Análisis estructural por RMN de las proteínas PCNA y GADD45Alfa y sus interacciones implicadas en la reparación del ADN y el control del ciclo celular*. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=33818#:~:text=Gadd45%20es%20una%20prote%C3%ADna%20%C3%A1cida,ciclo%20celular%20o%20a%20apoptosis>.
- ❖ Kucharova, M., Hronek, M., Rybáková, K., Zadák, Z., Stetina, R., Joskova, V., & Patkova, A. (2019). Comet assay and its use for evaluating oxidative DNA damage in some pathological states. *Physiological Research*, 1-15. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933901>
- ❖ Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- ❖ Lederer, D. J., & Martinez, F. J. (2018). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 378(19), 1811–1823. <https://doi.org/10.1056/nejmra1705751>
- ❖ Lee, J. (2022) *Neumonitis por hipersensibilidad - trastornos pulmonares, Manual MSD versión para profesionales*. Manuales MSD. Available at: <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-pulmonares/enfermedades-pulmonares-intersticiales/neumonitis-por-hipersensibilidad> (Accessed: January 20, 2023).

- ❖ Liu, J. W., Chandra, D., Rudd, M. D., Butler, A. C., Pallotta, V., Brown, D. A., Coffey, P. J., & Tang, D. G. (2005). Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3A and ROS. *Oncogene*, 24(12), 2020-2031. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208385>
- ❖ Liu, Y., Ao, X., Ding, W., Ponnusamy, M., Wu, W., Hao, X., Yu, W., Wang, Y., Li, P., & Wang, J. (2018). Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Molecular Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0856-3>
- ❖ Lu, Y., Liu, Y., & Yang, C. (2017). Evaluating *In vitro* DNA damage using comet assay. *Journal of Visualized Experiments*, 128. <https://doi.org/10.3791/56450>
- ❖ Luppi, F., Kalluri, M., Faverio, P., Kreuter, M., & Ferrara, G. (2021). Idiopathic Pulmonary fibrosis Beyond the lung: Understanding disease mechanisms to improve diagnosis and management. *Respiratory Research*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01711-1>
- ❖ Lushchak, V. I., & Gospodaryov, D. V. (2012). Oxidative stress and diseases. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/2535>
- ❖ Mansilla, S. F., De La Vega, M. B., Calzetta, N. L., Siri, S. O., & Gottifredi, V. (2020). CDK-Independent and PCNA-Dependent functions of P21 in DNA replication. *Genes*, 11(6), 593. <https://doi.org/10.3390/genes11060593>
- ❖ Maréchal, A., & Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a012716. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- ❖ McCormick, M., Chen, K., Ramaswamy, P., & Kenyon, C. (2011). New genes that extend *Caenorhabditis elegans*' lifespan in response to reproductive signals. *Aging Cell*, 11(2), 192-202. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00768.x>
- ❖ Muruzabal, D., Sanz-Serrano, J., Sauvaigo, S., Gutzkow, K. B., De Cerain, A. L., Vettorazzi, A., & Azqueta, A. (2020). Novel approach for the detection of alkylated bases using the enzyme-modified comet assay. *Toxicology Letters*, 330, 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.04.021>
- ❖ Navarro, C. A. M., & Flores, M. A. L. (2019). ELECTROFORÉSIS: FUNDAMENTOS, AVANCES y APLICACIONES. *Epistemus*, 13(26), 48–54. <https://doi.org/10.36790/epistemus.v13i26.96>
- ❖ Nho, R. S., & Hergert, P. (2014). FoxO3A and disease progression. *World Journal of Biological Chemistry*, 5(3), 346. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i3.346>
- ❖ Nho, R. S., Hergert, P., Kahm, J., Jessurun, J., & Henke, C. A. (2011). Pathological alteration of FOXO3A activity promotes idiopathic pulmonary fibrosis fibroblast proliferation on type I collagen matrix. *American Journal of Pathology*, 179(5), 2420-2430. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.020>
- ❖ Nogueira, R. L. M., Melo, N., Bastos, H. N., Martins, N., Delgado, L., Morais, A., & Mota, P. (2019). Hypersensitivity pneumonitis: antigen diversity and disease implications. *Pulmonology*, 25(2), 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2018.07.003>

- ❖ Nowak, K., Killmer, K., Gessner, C., & Lutz, W. (2007). E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3A. *Biochimica et biophysica acta (N)*, 1769(4), 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.04.001>
- ❖ Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(84\)90411-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)90411-x)
- ❖ Patiño, J. C. H., Palacio, G. V., Castro, J. L. R., & Peña, C. M. M. (2004). Papel del gen TP53 en la oncogénesis. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*, 36(2). <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/663>
- ❖ Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A., & Harford, J. A. (2020). A systematic approach to quantitative Western Blot analysis. *Analytical Biochemistry*, 593, 113608. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113608>
- ❖ Rhee, S. G. (2006). H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 312(5782), 1882-1883. <https://doi.org/10.1126/science.1130481>
- ❖ Richeldi, L., Collard, H. R., & Jones, M. G. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *The Lancet*, 389(10082), 1941-1952. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30866-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30866-8)
- ❖ Santa-González, G. A., Gomez-Molina, A., Arcos-Burgos, M., Meyer, J. N., & Camargo, M. (2016). Distinctive adaptive response to repeated exposure to hydrogen peroxide associated with upregulation of DNA repair genes and cell cycle arrest. *Redox biology*, 9, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.07.004>
- ❖ Sengupta, A., Molkenin, J. D., Paik, J. H., DePinho, R. A., & Yutzey, K. E. (2011). FOXO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7468-7478. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.179242>
- ❖ Shenderov, K., Collins, S., Powell, J. D., & Horton, M. R. (2021). Immune dysregulation as a driver of idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 131(2). <https://doi.org/10.1172/jci143226>
- ❖ Silva, A., Arroyo, A., Arias, C., Lázaro, I. (s.f.). V Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Recuperado el 9-03-2023 de: <https://conganat.uninet.edu/conferencias/C016/index.html>
- ❖ Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- ❖ SinoBiological (s.f.). *P53 signaling pathway | sino biological*. Recuperado el 17-05-2023 de: <https://www.sinobiological.com/pathways/p53-pathway>
- ❖ Spagnolo P., Rossi G., Cavazza A., Bonifazi M., Paladini I., Bonella F., Sverzellati N y Costabel U (2015). Hypersensitivity Pneumonitis: A Comprehensive Review. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 25(4), 237-250.
- ❖ Tafurt Cardona, Y., & Marin Morales, M. A. (2014). PRINCIPALES MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DAÑOS EN LA MOLÉCULA DE

- ❖ Ticli, G., Cazzalini, O., Stivala, L. A., & Prospero, E. (2022). Revisiting the function of P21CDKN1A in DNA repair: The influence of protein interactions and stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7058. <https://doi.org/10.3390/ijms23137058>
- ❖ Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace, A. J., DiStefano, P. S., Chiang, L., & Greenberg, M. E. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3A through the GADD45 protein. *Science*, 296(5567), 530-534. <https://doi.org/10.1126/science.1068712>
- ❖ Tsai, W. B., Chung, Y., Takahashi, Y., Xu, Z., & Hu, M. C. (2008). Functional interaction between FOXO3A and ATM regulates DNA damage response. *Nature Cell Biology*, 10(4), 460-467. <https://doi.org/10.1038/ncb1709>
- ❖ Van Houten, B., Santa-González, G. A., & Camargo, M. (2018). DNA repair after oxidative stress: current challenges. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.009>
- ❖ Venero-Cáceres, M., Herrera-Flores, E. H., Salas-López, J. A., Llanos-Tejada, F., & Saavedra-Leveau, C. A. (2020). Fibrosis pulmonar idiopática. *Diagnóstico*, 58(4), 186-189. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v58i4.174>
- ❖ Walsh, K. D., & Kato, T. A. (2022). Alkaline comet assay to detect DNA damage. En *Methods in molecular biology* (pp. 65-72). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2433-3_7
- ❖ Wang, Y., Gao, H., Cao, X., Li, Z., Kuang, Y., Ji, Y., & Li, Y. (2022). Role of GADD45A in myocardial ischemia/reperfusion through mediation of the JNK/P38 MAPK and STAT3/VEGF pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 50(6). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5200>
- ❖ Wang, Z., Wei, D., & Xiao, H. (2013). Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. En *Humana Press eBooks* (pp. 135-144). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-556-9_11
- ❖ White, R. R., Maslov, A. Y., Lee, M., Wilner, S. E., Levy, M., & Vijg, J. (2020). FOXO3A acts to suppress DNA double-strand break-induced mutations. *Aging Cell*, 19(9). <https://doi.org/10.1111/accel.13184>
- ❖ Zhan, Q. (2005). GADD45A, a P53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research: Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 569(1-2), 133-143. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.055>
- ❖ Zuñiga L. *Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana*. España: Universidad Autónoma de Barcelona; 2009.

APÉNDICES

gen: p21		(15 μ L)
SYBR (2x)		7.5 μ L
P _F p21		1.125 μ L
P _R p21		1.125 μ L
H ₂ O		0.75 μ L
10.5 μ L mix + 4.5 cDNA c/u por triplicado		

Tabla 1. Preparación de mix para la expresión del gen p21.

gen: p53		(15 μ L)
SYBR (2x)		7.5 μ L
P _F p53		1.125 μ L
P _R p53		1.125 μ L
H ₂ O		0.75 μ L
10.5 μ L mix + 4.5 cDNA c/u por triplicado		

Tabla 2. Preparación de mix para la expresión del gen p53.

gen: HPRT		(15 μ L)
SYBR (2x)		7.5 μ L
P _F HPRT		1.125 μ L
P _R HPRT		1.125 μ L

H ₂ O	0.75 µL
10.5 µL mix + 4.5 cDNA c/u por triplicado	

Tabla 3. Preparación de mix para la expresión del gen HPRT.

gen: FoxO3	(15 µL)
Sonda FoxO3 marcada con FAM	0.36 µL
Master Mix	7.5 µL
H ₂ O	4.14 µL
12 µL mix + 3 cDNA c/u por triplicado	

Tabla 4. Preparación de mix para la expresión del gen FoxO3.

gen: HPRT	(15 µL)
Sonda HPRT marcada con VIC	0.36 µL
Master Mix	7.5 µL
H ₂ O	4.14 µL
12 µL mix + 3 cDNA c/u por triplicado	

Tabla 5. Preparación de mix para la expresión del gen HPRT.

	Gel concentrador	Gel separador	
	4%	7.5%	12%
H ₂ O destilada	3 mL	4.8 mL	3.3 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.24 mL	-	-
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	-	2.5 mL	2.5 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL	100 µL
Acilamida-Bisacrilamida 30%	660 µL	2.5 mL	4 mL
APS 10%	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL

Tabla 6. Preparación de geles SDS-PAGE al 7.5% y 12%

Anticuerpo primario	Dilución de anticuerpo primario en BSA 5%	Anticuerpo secundario	Dilución de anticuerpo secundario en BSA 1%
anti-FoxO3a	1:1000	anti-rabbit	1:2500
anti-AcetylFoxO3a	1:500	anti-rabbit	1:2500
anti-GADD45	1:500	anti-rabbit	1:2500
anti-p21	1:500	anti-mouse	1:15000
anti-p53	1:1500	anti-goat	1:7000
anti-β-actina	1:5000	anti-rabbit	1:2500
anti-β-tubulina	1:1000	anti-rabbit	1:1000
H3	1:1000	anti-rabbit	1:2500

Tabla 7. Detalles de anticuerpos primarios y secundarios.

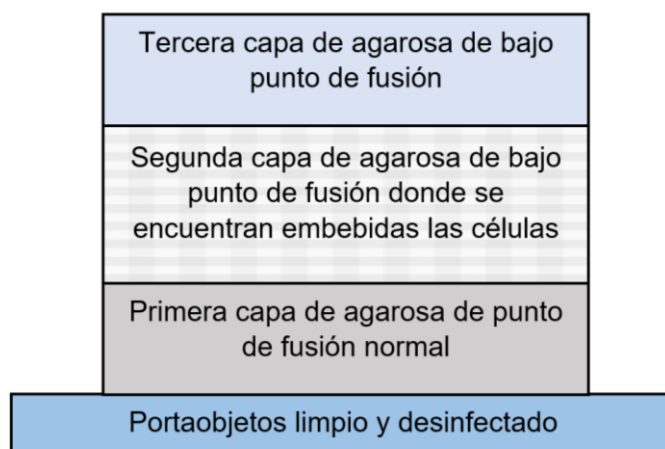


Figura 1. Esquema típico de un portaobjetos con las capas de agarosa dispuestas tipo sándwich.

Reactivos	Cantidad
NaCl 2.5 M	14.61 g
Na ₂ EDTA 100 mM	3.72 g
Tris-HCl 10 mM	0.12 g
H ₂ O destilada	100 mL
Ajustar a pH 10	

Tabla 8. Preparación de solución stock de lisis.

Reactivos	Cantidad
Solución stock	40 mL + 4.5 mL para aforar
Tritón X-100	500 µL
DMSO	5 mL

Tabla 9. Preparación de solución final de lisis.

Reactivos	Cantidad
Na ₂ EDTA 1 nM	0.7445 g
NaOH 300 mM	40 g
H ₂ O destilada	1000 mL
Ajustar a pH >13	

Tabla 10. Preparación de buffer de electroforesis.

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl 0.4 mM	48.5 g
H ₂ O destilada	1000 mL
Ajustar a pH 7.5 conservar a 8°C	

Tabla 11. Preparación de buffer de neutralización.

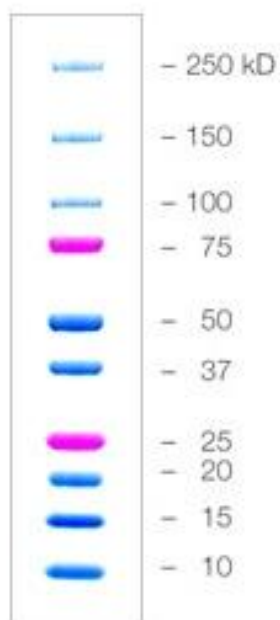


Figura 2. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad).