



**Estudio de FoxO3a en Fibroblastos de
pacientes con Fibrosis Pulmonar
Idiopática, Sujetos Control y Neumonitis
por Hipersensibilidad**

Proyecto Genérico correspondiente a: Salud, Alimentación y Nutrición

Alumna: Yumairen Guadalupe Hernández Becerril

ASESORES

Asesor Interno: Dra. Julia Pérez Ramos

Asesor Externo: Dra. Iliana Herrera Fuentes

Julia Pérez R.
Iliana H.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

1

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

**Estudio de FoxO3a en Fibroblastos de pacientes con
Fibrosis Pulmonar Idiopática, sujetos control y
Neumonitis por Hipersensibilidad**

Proyecto Genérico Correspondiente a: Salud, Alimentación y Nutrición

Alumna: Yumairen Guadalupe Hernández Becerril

ASESORES

Asesor Interno: Dra. Julia Pérez Ramos

Asesor Externo: Dra. Iliana Herrera Fuentes

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

Fecha de inicio del proyecto: 14 de Marzo del 2022

Fecha de término del proyecto: 14 de Septiembre del 2022

Ciudad de México, A 15 de Noviembre del 2022

ÍNDICE

1. Introducción	3
2. Marco Teórico	4
2.1 FoxO3a	4
2.1.1. Estructura de FoxO3a	4
2.1.2. Regulación de la Actividad de FoxO3a	5
2.1.3. Funciones de FoxO3a	8
2.1.4. FoxO3a como diana terapéutica	10
2.2. SIRT1	11
2.2.1. Regulación de la expresión de SIRT1	11
2.2.2. Función de SIRT1	13
2.3. Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)	14
2.3.1. Patogénesis de la FPI	14
2.3.2. FoxO3a y su Relación con la FPI	16
2.4. Neumonitis por Hipersensibilidad (NH)	16
2.4.1. Patogénesis de la NH	16
2.4.2. Neumonitis por Hipersensibilidad y su Relación con FoxO3a	19
2.5. PCR en tiempo real (qPCR)	19
2.6. Western Blot	21
2.7. Inmunofluorescencia	23
3. Objetivos	24
3.1. Objetivo General	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. Hipótesis	24
5. Materiales y Métodos	25
5.1. Obtención de fibroblastos	25
5.2. PCR en tiempo real	25
5.3. Inmunofluorescencia	26
5.4. Western Blot	26
6. Resultados	28
7. Discusión	36
8. Conclusión	40
9. Referencias	41

1. Introducción

FoxO3a es un factor de transcripción implicado en múltiples funciones celulares y regulado por modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la cual favorece la retención del factor en el citoplasma, su inhibición y degradación, por otro lado, también puede ser acetilado y en condiciones de estrés oxidativo es translocado al núcleo donde induce la transcripción de sus genes diana, respuesta mediada por SIRT1, la cual se encarga de desacetilarlo. Adicionalmente, está implicado en enfermedades pulmonares como; la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), enfermedad pulmonar crónica y mortal en la cual los fibroblastos muestran resistencia a la muerte celular; y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH), enfermedad pulmonar generada por una respuesta inmunomediada por la exposición constante a un antígeno (Costabel et al., 2020; Calnan, D y Brunet, A, 2008; Richeldi et al., 2017), entre otras.

Los niveles de expresión de FoxO3a en FPI están disminuidos en los pulmones, debido a la fosforilación de FoxO3a por Akt, quinasa que regula la fibrosis pulmonar al inducir la producción de TGF- β e IL-13 (Rahman et al., 2012). Debido a esta desregulación se han buscado alternativas que apuntan a SIRT1 con una alternativa terapéutica, ya que se ha demostrado que la desacetilación de FoxO3a por parte de SIRT1 disminuye la fosforilación de FoxO3a dependiente de Akt, favoreciendo su localización nuclear y por tanto la transcripción de sus genes diana reduciendo la lesión pulmonar. Es por ello que en la presente investigación se evaluó el papel de FoxO3a en fibroblastos diagnosticados con FPI, NH y sujetos control, mediante RT-qPCR se determinó la expresión a nivel gen de FoxO3a, posteriormente se analizó la localización celular de FoxO3a mediante inmunofluorescencia y finalmente se determinó el estado de acetilación y desacetilación mediante western blot.

2. Marco Teórico

2.1 FoxO3a

FoxO3a es un miembro de la subfamilia FOXO de factores de transcripción Forkhead box O que median una variedad de procesos celulares, incluida la regulación del ciclo celular, apoptosis, metabolismo, longevidad y la resistencia al estrés oxidativo. La función de FoxO3a está regulada por distintos procesos, como la supresión postranscripcional por microARN, interacciones proteína-proteína y modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, acetilación, ubiquitinación y metilación, que a su vez regulan la localización subcelular, los niveles de proteína, las propiedades de unión al ADN y su actividad transcripcional, por tanto, dichas modificaciones son esenciales para la homeostasis metabólica, el equilibrio REDOX y la respuesta al estrés. (Hiroaki et al., 2011; Lui et al., 2018).

2.1.1. Estructura de FoxO3a

FoxO3a tiene un tamaño de aproximadamente 71kDa y contiene cinco dominios (*Figura 1*):

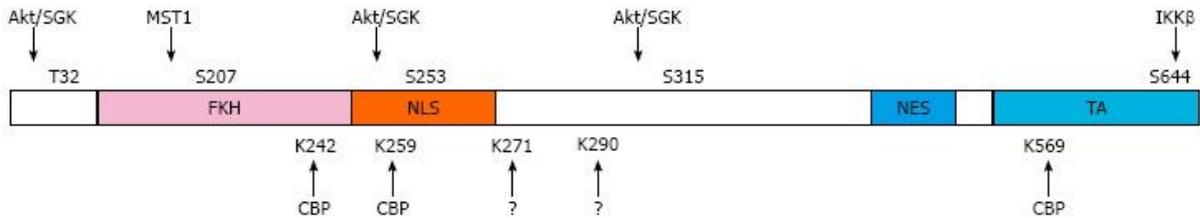
- Un dominio de unión a DNA (FKH) que es responsable de la interacción directa entre FoxO3a y el ADN y modula la interacción con el receptor de estrógeno α (ER α) y p53.
- Dos secuencias de localización nuclear (NLS), necesarias para la translocación de FoxO3a del citoplasma al núcleo y también la liberación 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.

Además, los dominios de FoxO3a contienen sitios de modificaciones postraduccionales como: fosforilación de serina/treonina por Akt (proteína quinasa B), SGK (proteína quinasa inducida por suero y glucocorticoides), MST1 y IKK β (cinasa I κ B). Y residuos acetilados por CBP (la proteína de unión al elemento sensible al AMP cíclico (CREB)). Cabe mencionar que, se ha demostrado

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 (Lui et al.,2018; Nho y Hergert, 2014).

Figura 1

Estructura de FoxO3a



Nota: Se ilustran sitios de acetilación por Akt/SGK, MST1 y IKK; sitios de acetilación por CBP y acetiltransferasas no identificadas (?). FKH: dominio de unión a DNA; NLS: señal de localización nuclear; NES: exportación nuclear; TA: dominio de transactivación. Adaptado de *FoxO3a and disease progression*. (p. 348), por R. Nho y P. Hergert, 2014, *World Journal of Biological Chemistry*, 5(3).

2.1.2. Regulación de la Actividad de FoxO3a

Las funciones de FoxO3a están reguladas por distintos procesos incluyendo la supresión postranscripcional por microRNA (miRNA), modificaciones postraduccionales e interacciones proteína-proteína.

2.1.2.1. Regulación Postranscripcional de FoxO3a por micro RNA.

Los microRNA (miRNA) son un tipo de RNA pequeños no codificantes con una longitud de aproximadamente 19-25 nucleótidos con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Regulan negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional al reprimir la traducción y/o promover la degradación del mRNA a través de un proceso de desadenilación.

Lamadrid y colaboradores (2013), muestran o demuestran que la región 3' no traducida (3'-UTR) del mRNA de FoxO3a contiene diversas secuencias diana de miRNA que median la expresión

de las proteínas de FoxO3a en diversas condiciones implicados en la promoción, el crecimiento o la metástasis de tumores:

- miR-155: FoxO3a es objetivo de este miRNA en enfermedades renales isquémicas y varios tipos de cáncer, ya que la sobreexpresión de miR-155 disminuye la expresión de la proteína FoxO3a, mientras que la disminución de la expresión de miR-155 aumenta la expresión de FoxO3a.
- miR-132, miR-212 y mi-R-223: estos se unen directamente a FoxO3a en la región 3'-UTR e inhiben la expresión de FoxO3a. Cabe mencionar que la represión de FoxO3a por miR-132 y miR-212 causa apoptosis neuronal en Alzheimer. Por otro lado, miR-132 y 223 inducen la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal mediante la regulación negativa.
- miR-96: participa en cáncer de mama y en fibrosis pulmonar idiopática, mediante su unión a la región 3'-UTR del mRNA de FoxO3a, y en consecuencia disminuye la actividad de FoxO3a en p27 (inhibidor ciclina-cinasa que bloquea el ciclo celular y previene la progresión del ciclo celular) y p21 (Interruptor molecular en vías de señalización, que influyen en el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular).

2.1.2.2. Regulación de FoxO3a por Interacciones Proteína-Proteína

La actividad de FoxO3a puede estar regulada por una variedad de proteínas intracelulares a través de interacciones proteína-proteína. En las neuronas, la proteína homóloga C/EBP (CHOP) indicador de la apoptosis inducida por estrés, interactúa directamente con FoxO3a en respuesta al estrés del retículo endoplasmático, dando como resultado el incremento de la actividad de transcripción de FoxO3a e induce la expresión de sus genes diana Puma y Bim (proteínas proapoptóticas).

En las células HeLa, FoxO3a es desfosforilado por su interacción con PP2A (proteína fosfatasa 2A), dando como resultado la inmediata translocación nuclear y la activación transcripcional de FoxO3a. Por otro lado, en células de cáncer gástrico, el complejo de RUNX3 (factor de transcripción) y FoxO3a participa en la inducción de la apoptosis mediante la activación del gen objetivo *Bim* de FoxO3a. Mientras que, en las mitocondrias, la interacción de SIRT3 con FoxO3a aumenta la actividad de unión al ADN de FoxO3a, así como la expresión génica dependiente de FoxO3a.

2.1.2.3. Regulación de FoxO3a por modificaciones postraduccionales

Como se mencionó anteriormente FOXO es regulado por diversas modificaciones postraduccionales para regular diversos procesos celulares, Calnan, D y Brunet, A (2008): Xie et al., 2012 destacan las siguientes:

- *Ubiquitinación:* La degradación de FOXO es regulada por la vía de la ubiquitina, ya que varias ubiquitinas E3 ligasas son necesarias para la ubiquitinación de FOXO. La E3 ligasa MDM2 se une a FoxO3a para promover su degradación y la proteína quinasa ERK es necesaria para este proceso.
- *Fosforilación:* La fosforilación de FOXO es regulada por proteínas quinasas que modifican su localización subcelular, estabilidad y su actividad de unión al DNA. La proteína quinasa B serina-treonina (Akt) y la quinasa inducible por suero/glucocorticoides (SGK) son las principales enzimas que fosforilan FoxO3a en el residuo N-terminal Thr32, Ser253, y Ser3. La fosforilación en estos sitios incrementa su asociación con proteínas 14-3-3 dando como resultado la translocación de FOXO del núcleo al citoplasma, lo cual provoca su inactivación transcripcional. Además, la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) regula la homeostasis celular, y estudios han demostrado que

AMPK fosforila a FoxO3a en seis sitios, lo cual conduce a la activación de FoxO3a sin modificar su localización celular.

Por otro lado, la proteína quinasa ERK fosforila FOXO3 en Ser294, Ser344 y Ser425, lo cual hace inestable a FoxO3a debido a su interacción con la ubiquitina E3, en cuanto a la proteína quinasa IKK, esta induce la fosforilación Ser644 en FOXO3 y conduce a tanto la exclusión nuclear como la degradación de las proteínas FOXO3. Por tanto, ERK como IKK se han identificado como oncogenes en tumorigénesis.

- *Acetilación:* La acetilación en FOXO está controlada por histonas acetiltransferasas y por histonas desacetilasas (HDACs). En cuanto a las histonas acetiltransferasas, los coactivadores transcripcionales CBP/P300 son esenciales para la acetilación de FOXO y ello disminuye la capacidad de unión de FoxO3a al DNA. Por otro lado, las HDACs, como SIRT1 forman un complejo con FoxO3a en respuesta al estrés oxidativo. Sirt1 tiene un doble efecto en la regulación de FoxO3a ya que aumentan la capacidad de FOXO para inducir la detención del ciclo celular y la resistencia al estrés oxidativo, pero inhibe su capacidad de inducir la apoptosis celular.

2.1.3. Funciones de FoxO3a

FoxO3a interviene en distintos procesos fisiológicos y patológicos al inducir la transcripción de genes implicados en la apoptosis, proliferación, progresión del ciclo celular, respuesta a diversos tipos de estrés celular, longevidad y autofagia.

2.1.3.1. Proliferación celular y apoptosis

Nho y Hergert, (2014) mencionan que la activación de FoxO3a aumenta la producción de proteínas inhibitoras del ciclo celular como p21 y p27, las cuales suprimen la transición del ciclo celular de la fase G1 a S. Por otro lado, Hwang et al., (2011) señalan que FoxO3a inhibe la función de NF- κ B (El factor nuclear kappa B, que participa en la respuesta inmune e inflamatoria

mediante el desarrollo, formación, progresión y apoptosis de tumores) y que la alteración de FoxO3a está asociada con células T auxiliares hiperproliferativas, inflamación a causa del humo del cigarro y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

FoxO3a también incrementa la activación de genes diana como, Bim, TRAIL, PUMA, Noxa, p21, p27, FasL, los cuales promueven la apoptosis celular o la proliferación. Nowak et al., (2007) agregan que FoxO3a se une directamente a la región promotora de Bim causando la apoptosis de células neuronales. Acorde a lo anterior, FoxO3a puede contribuir en una proliferación celular descontrolada e incluso ser involucrado en la resistencia a la apoptosis celular.

2.1.3.2. Resistencia al estrés

FoxO3a participa en la protección contra el estrés oxidativo al inducir la expresión de proteínas antioxidantes como la catalasa, la peroxidoredoxina 3 y la superóxido dismutasa (SOD). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están relacionadas con la activación de FoxO3a para preservar las células expuestas a condiciones desfavorables, ya que las ROS desreguladas inducen apoptosis y están asociadas a múltiples enfermedades del envejecimiento. Por su parte, Hori et al., (2013) agregan que Sirt1 disminuye los niveles de ROS promoviendo la resistencia celular en condiciones de estrés, mientras que FoxO3a aumenta la expresión de la SOD protegiendo a las células de manera independiente de Sirt1.

2.1.3.3. Longevidad

La longevidad es el resultado de factores genéticos, se ha demostrado que los sujetos longevos portan genes protectores que funcionan como defensa celular. Conjuntamente, Willcox et al., (2008) agregan que evidencia en modelos animales indica que la vía de señalización de insulina-IGF1 (IIS) es una vía muy importante conservada evolutivamente que influye en el envejecimiento y la longevidad.

Aunado a ello, Nho y Hergert, (2014) mencionan que el gen FoxO3a está asociado con el envejecimiento debido a que es regulado por la señalización de la insulina -IGF1 (IIS) el cual influye en el metabolismo y la vida útil de organismos. Link, W (2019) señala que FoxO3a contiene aproximadamente 40 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) no codificantes que se asocian con la longevidad y diferentes fenotipos de envejecimiento en una población longeva. Asimismo, se sabe que un aumento en los niveles celulares de ROS está asociado con el envejecimiento, y el estrés oxidativo regula las modificaciones postraduccionales de FOXO y como se mencionó anteriormente FoxO3a regula la resistencia al estrés oxidativo.

Por otro lado, el complejo formado por FoxO3a y Sirt1 en respuesta al estrés oxidativo aumenta la capacidad de FoxO3a para inducir la detención del ciclo celular y la resistencia al estrés, por tanto, este complejo juega un papel importante como mecanismo de autodefensa celular.

2.1.4. FoxO3a como diana terapéutica

FoxO3a está ampliamente implicado en una variedad de enfermedades, como el cáncer de mama, hígado, colon, próstata y nasofaringe, ya que actúa como supresor de tumores, además, se ha demostrado que la sobreexpresión de FoxO3a inhibe la proliferación, el potencial tumorigénico y la invasividad de las células cancerosas, mientras que, el silenciamiento de este factor de transcripción está asociado con la iniciación y progresión del cáncer.

Akt, IKK y Erk son quinasas oncogénicas activadas en cánceres humanos y estas tres quinasas se dirigen a FoxO3a para inhibir su función como supresor de tumores, mediante la fosforilación de FoxO3a estimulando su ubiquitinación, lo cual conduce a la degradación proteasomal de FoxO3a. Acorde a lo anterior, se ha planteado un nuevo enfoque dirigido a FoxO3a a través de la regulación de las quinasas mencionadas. Asimismo, ha demostrado que algunos fármacos usados para el tratamiento del cáncer median su función mediante la restauración de la actividad de FoxO3a. Por ejemplo; paclitaxel y KP372-1 (inhibidor de quinasas) son usados para el

tratamiento de cáncer de mama mediante la activación de FoxO3a a través de la represión de AKT y la inducción de la señalización de JNK, lo que en conjunto conduce a la localización nuclear y la activación de FoxO3a, por su parte, Imatinib activa FoxO3a e induce a sus genes diana proapoptóticos, como Bim y PUMA. Toda la evidencia plantea la posibilidad de desarrollar fármacos que actúen sobre FoxO3a para activar genes que favorezcan la supresión de tumores (Nho y Hergert, 2014; Boccitto y Kalb, 2011).

2.2. SIRT1

SIRT1 pertenece a la familia de proteínas sirtuina (SIRT) que son histonas desacetilasas de clase III (HDAC III) dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). Se han identificado siete SIRT en el genoma de mamíferos, las cuales están localizadas en distintos compartimentos celulares como el núcleo, las mitocondrias y el citoplasma. García-Peterson y Li (2021) mencionan que SIRT1, SIRT6 y SIRT7 suelen estar presentes en el núcleo; SIRT2 está presente en el citoplasma; y SIRT3, SIRT4 y SIRT5 normalmente se presentan en las mitocondrias. Sin embargo, las SIRT se mezclan entre compartimentos subcelulares, es decir, SIRT1 normalmente se encuentra en el núcleo, pero también puede estar presente en el citoplasma.

2.2.1. Regulación de la expresión de SIRT1

La expresión de SIRT1 es regulada a nivel transcripcional y postranscripcional Yang y colaboradores (2022) describen las siguientes:

2.2.1.1. Regulación transcripcional de SIRT1

- **Metilación del DNA:** La metilación de DNA es una modificación importante ya que regula la transcripción de genes. Para ello las DNA metiltransferasas (DNMT) metilan secuencias de nucleótidos específicas en promotores de genes CpG. La hipermetilación en estas regiones se correlacionan negativamente con la transcripción génica. Además,

la hipermetilación del DNA se asocia con una expresión reducida de SIRT1. Lo cual sugiere que la transcripción de SIRT1 se ve afectada por la metilación del DNA.

- Regulación de SIRT1 por factores de transcripción: La transcripción de SIRT1 es regulada por distintos factores de transcripción y cofactores que reprimen o promueven su transcripción.
 - P53: La acetilación de P53 influye en su actividad postranscripcional, ya que SIRT1 desacetila la lisina 382 de P53, sin embargo, P53 puede actuar por retroalimentación negativa inhibiendo la transcripción de SIRT1 al unirse a su promotor.
 - FoxO3a: Promueve la transcripción de SIRT1 de manera similar a P53. Cabe mencionar que FoxO3a puede ser desacetilado por SIRT1, lo cual permite que FOXO participe en la regulación de distintos procesos biológicos.
 - HIC1: Este factor de transcripción participa en la regulación negativa de SIRT1. HIC1 se une a SIRT1 formando un complejo de inhibición que reprime la expresión de SIRT1.
 - E2F1: E2F1 interactúa con dos sitios de unión en el promotor de SIRT1 para inducir la transcripción de esta desacetilasa. Y SIRT1 puede inhibir su propia transcripción al desacetilar a E2F1. Este mecanismo de retroalimentación negativa es relevante para la regulación de la apoptosis en respuesta al daño de DNA. Se cree que E2F1 activa la expresión de SIRT1 en respuesta al daño celular para la protección y reparación del DNA, lo cual da como resultado un aumento en la expresión de SIRT1 que afecta a la apoptosis.
 - C-Myc: Este factor puede unirse al promotor SIRT1 e inducir la transcripción de SIRT1, sin embargo, SIRT1 desacetila a C-Myc inhibiendo así la expresión de SIRT1.

2.2.1.2. Regulación postranscripcional de SIRT1

- miRNA: La evidencia indica que los miRNA son importantes reguladores de la expresión de SIRT1 y existen varios miRNA que regulan este mecanismo entre ellos; miR-34a y miR-181^a, los cuales se unen directamente a la región UTR 3' del RNA mensajero de SIRT1 y de este modo reducen su expresión. Cabe mencionar que los niveles de miR-34a incrementan con el envejecimiento, mientras que los niveles de miR-181a se encuentran muy elevados en hepatocitos resistentes a la insulina y también en el suero de pacientes con diabetes (Choi y Kemper, 2013).

2.2.1.3. Regulación funcional de la proteína SIRT1

- Relación NAD⁺ / NADH: La actividad de SIRT1 es regulada por la relación NAD⁺ / NADH, es decir, la actividad de SIRT1 incrementa cuando los niveles celulares de NAD⁺ aumentan.
- AMPK: La proteína quinasa activada por AMP, es una proteína que puede regular los cambios en el nivel de ATP, de modo que, AMPK promueve la actividad de SIRT1 al aumentar el nivel de NAD⁺ intracelular.

2.2.2. Función de SIRT1

SIRT1 fue la primer SIRT descubierta en mamíferos, ya que es la proteína más estudiada debido a que su actividad influye en diversas funciones biológicas; puede regular las estructuras de cromatina y la transcripción de genes a través de la desacetilación de histonas como la H1 lisina 26 (H1K26ac), H3 lisina 9 (H3K9ac), H3 lisina 56 (H3K56ac) y H4 lisina 16 (H4K16ac), también, puede controlar la actividad de proteínas no histonas (como factores de transcripción, tal como FOXO) mediante la regulación de sus genes diana involucrados en la respuesta al daño del ADN, la remodelación de la cromatina, la expresión génica, la diferenciación y proliferación celular, el envejecimiento, la señalización endocrina, la respuesta al estrés, el metabolismo, la apoptosis,

la inflamación y la carcinogénesis. SIRT1 y FoxO3a forman un complejo en las células en respuesta al estrés oxidativo, de modo que SIRT1 aumenta la capacidad de FoxO3a para inducir la detención del ciclo celular, resistencia al estrés oxidativo. Pero inhibe la función de FoxO3a para inducir la muerte celular. SIRT1 también regula numerosos procesos, incluida la inflamación y la senescencia/envejecimiento celular, debido a su capacidad para desacetilar NF- κ B, P53, etc. (Yang et al., 2022).

FoxO3a y SIRT1 participan en distintas patologías pulmonares, como la fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad.

2.3. Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI)

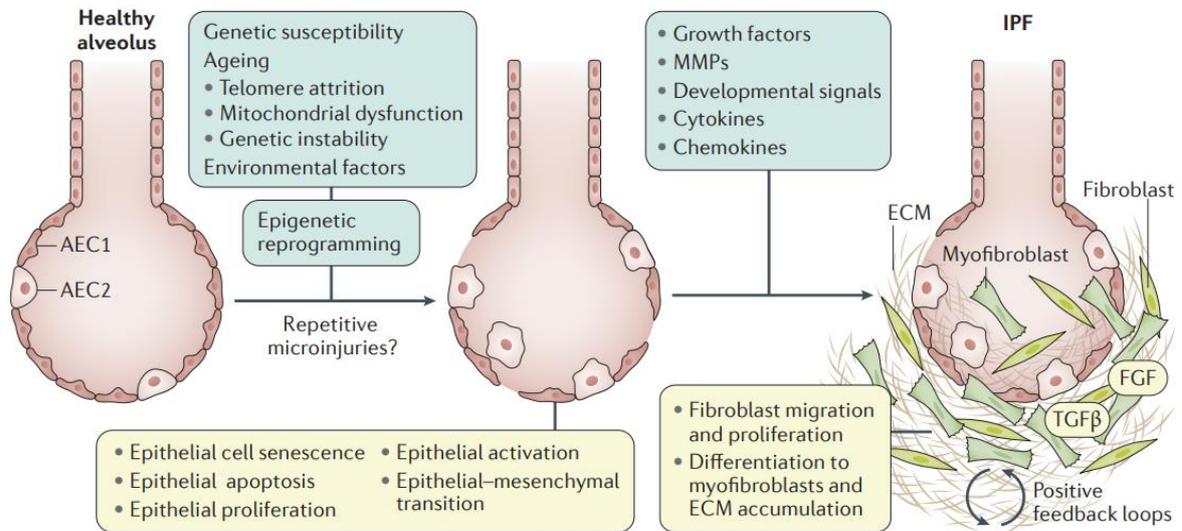
La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad progresiva crónica de causa desconocida, este padecimiento es el resultado de distintos procesos anormales de las células epiteliales alveolares, que producen mediadores que inducen la formación de fibroblastos y miofibroblastos, los cuales segregan cantidades excesivas de matriz extracelular, dando como resultado la cicatrización de la estructura pulmonar; impidiendo así, el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre los alvéolos y los vasos sanguíneos pulmonares, provocando que los pacientes con este padecimiento experimenten dificultad para respirar, tos seca, necesidad de oxígeno suplementario y eventual insuficiencia respiratoria (Shenderov *et al.*, 2021; Talmadge *et al.*, 2011).

2.3.1. Patogénesis de la FPI

Aunado a ello, se estima que la fibrosis es el resultado de múltiples factores que interactúan entre sí, como: exposiciones ambientales, tabaquismo, factores genéticos, infecciones virales crónicas y comorbilidades, produciendo microlesiones repetitivas en el epitelio alveolar envejecido. Las células epiteliales alveolares tipo 2 (AEC2) son células madre del pulmón que contribuyen a la renovación de las células epiteliales alveolares tipo 1 (AEC1). La AEC2, tienen funciones

secretoras surfactantes, metabólicas e inmunológicas. En FPI, las ACE2 muestran inestabilidad a nivel genético, cambios epigenéticos, desgaste de los telómeros, detección de nutrientes desregulada, disfunción mitocondrial, senescencia celular y una mala comunicación intercelular (Richeldi et al., 2017; Luppi et al., 2021). Por otro lado, Martínez y colaboradores (2017) plantean que la lesión epitelial alveolar en un individuo podría conducir a una reprogramación epigenética profibrótica, senescencia prematura de las epiteliales y la activación continua de células mesenquimales, lo cual conduce a la secreción de mediadores como MMP1 y MMP7, factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas que inducen a la migración, la activación, proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos, que son resistentes a la apoptosis y secretan cantidades excesivas de matriz extracelular (ECM) que conduce a la destrucción de la arquitectura pulmonar (Figura 2).

Figura 2
Patogénesis de la Fibrosis Pulmonar Idiopática



Nota: Múltiples factores genéticos, ambientales y cambios relacionados con el envejecimiento provocan una reprogramación epigenética compleja que activa las células epiteliales alveolares (AEC). El epitelio activado secreta mediadores que inducen la migración, proliferación y activación de fibroblastos y miofibroblastos, mismos que secretan cantidades excesivas de matriz extracelular (ECM). Adaptado de *Idiopathic pulmonary fibrosis*. (p. 5), por Martínez et al., 2017, *Nature Reviews Disease Primers*. 3 (17074).

2.3.2. FoxO3a y su Relación con la FPI

En condiciones normales, los fibroblastos producen matriz extracelular para facilitar la cicatrización de heridas y después de la reparación del tejido los fibroblastos sufren apoptosis, mediante un mecanismo donde la actividad de la fosfatasa y la tensina (PTEN) incrementa, lo cual suprime la función de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) reduciendo los niveles de Akt fosforilados. En FPI, los miofibroblastos producen cantidades excesivas de matriz extracelular y mantienen un fenotipo resistente a sufrir apoptosis debido a que la actividad de PTEN es baja, lo cual genera una actividad de PI3K/Akt inapropiadamente alta. En consecuencia, Akt fosforila el residuo ser 253 de FoxO3a, lo que promueve el transporte de FoxO3a desde el núcleo hasta el citoplasma inhibiendo su actividad implicada en la inhibición del ciclo celular y apoptosis, favoreciendo la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos confiriendo el fenotipo patológico de la FPI (Im et al., 2015; Nho et al., 2013; Nho et al., 2011).

2.4. Neumonitis por Hipersensibilidad (NH)

La neumonitis por hipersensibilidad (NH), también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es un síndrome inmunomediado a consecuencia de la inflamación del parénquima pulmonar y de las vías respiratorias. Esta reacción es desencadenada por la inhalación de una amplia variedad de antígenos al que el sujeto ha sido sensibilizado. Se han identificado más de 200 alérgenos como agentes causales de la NH, la mayoría se derivan de hongos, bacterias, protozoos, proteínas animales e incluso compuestos químicos de bajo peso molecular. La NH se puede clasificar en aguda, predominantemente inflamatoria, subaguda y crónica o fibrótica (Nogueira et al., 2018; Spagnolo et al., 2015).

2.4.1. Patogénesis de la NH

Costabel y colaboradores (2020) agregan que la exposición continua a antígenos promueve el desarrollo de una reacción inmunitaria que provoca una inflamación pulmonar aguda, esta

reacción inmunitaria se puede volver crónica por la activación de miofibroblastos y en consecuencia, a la producción de matriz extracelular, que en cantidades excesivas promueve la destrucción de la arquitectura pulmonar.

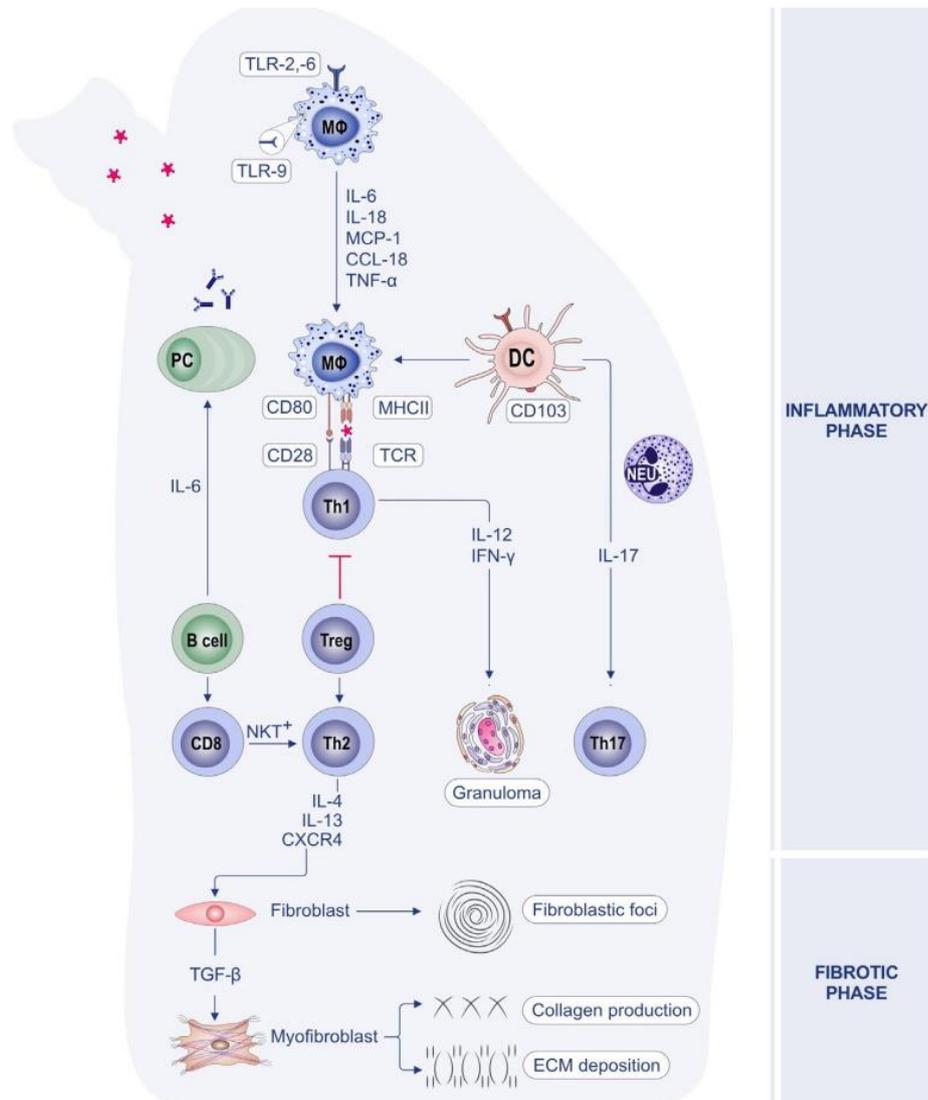
2.4.1.1. Inmunopatología de la NH

Como se muestra en la *Figura 3*, durante el desarrollo de la NH, el sistema inmunológico juega un papel muy importante, después de la inhalación continua de un antígeno, las células dendríticas y los macrófagos (células presentadoras de antígeno, APC) se activan y liberan factores proinflamatorios y quimiotácticos como CCL18 (que atrae a los linfocitos), IL-18, el MCP-1, TNF- α , IL-1 y IL-6 que regulan la expresión de B7 (proteína localizada en la superficie de células B y monocitos). Las APC se acoplan al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), y a través de los receptores tipo toll (TLR), el antígeno es reconocido por las células T CD4+. La transición de un proceso inflamatorio agudo a un proceso fibrótico crónico es regulado por el cambio de una respuesta inflamatoria de Th1 a Th2, donde las células T reguladoras (Treg) expresan una disminución de FOXP3 promoviendo la inflamación efectuando a las Th2. Adicionalmente, la IL-6 favorece la diferenciación de las células B en células plasmáticas, las células B estimuladas producen anticuerpos IgG que inician la cascada del complemento estimulando aún más a los macrófagos, los cuales se unen con células multinucleadas y células epiteliales para formar granulomas, esta respuesta es mediada por IL-12, IFN γ produce CXCL10 para reclutar linfocitos T al espacio alveolar y promover la formación del granuloma. En consecuencia, los factores quimiotácticos producidos por los granulomas, las citosinas Th2 (IL-4, IL-3 y CXCR4), la producción de células CD8+ y la diferenciación de las células Th17 (inducida por CD103 y células detriticas) promueven la proliferación de fibroblastos los cuales son activados por citocinas profibróticas, se diferencian en miofibroblastos y migran al

espacio alveolar, por acción de IL-13 que activa a TGF β , favoreciendo la producción de matriz extracelular que provoca rigidez tisular e hipoxia (Costabel et al., 2020; Barnes et al., 2021).

Figura 3

Inmunopatogénesis de HP



Nota: La respuesta inmunitaria de la NH surge cuando los antígenos inhalados interactúan con las células presentadoras de antígenos (APC), estas estimulan una respuesta Th1 favoreciendo la producción de citocinas y quimiocinas. Por su parte las células B, producen anticuerpos IgG que activan la cascada del complemento estimulando a los macrófagos, mismos que después forman granulomas al ser fusionados con células gliales multinucleadas, posteriormente la respuesta Th2 es estimulada favoreciendo la secreción de citocinas como IL-13 que a su vez estimula la producción de TGF β , el cual induce a la diferenciación de miofibroblastos. Adaptado de *Hypersensitivity pneumonitis: Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment* (p.4), por Barnes et al., 2021, Allergy.

2.4.2. Neumonitis por Hipersensibilidad y su Relación con FoxO3a

Aunque no se sabe con exactitud la relación entre FoxO3a y NH, se ha demostrado que FoxO3a puede ser regulado por TGF- β (factor importante en la NH para desencadenar la fibrosis), se sabe que este factor induce a la inactivación de FoxO3a, mediante la vía Akt, produciendo su translocación hasta el citoplasma, por otro lado, se ha demostrado que la sobre expresión de FoxO3a inhibe la secreción de citoquinas inflamatorias reduciendo la inflamación pulmonar (Vivar et al.,2020; Xu et al.,2022).

Para comprender la relación y el grado de expresión de FoxO3a y SIRT1 en fibroblastos con las dos patologías se pueden emplear técnicas de biología molecular como PCR, Western Blot e Inmunofluorescencia.

2.5. PCR en tiempo real (qPCR)

Tamay y colaboradores (2013) agregan que la reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* en la cual se amplifica miles de veces una secuencia específica de DNA. La enzima que lleva a cabo esta reacción se denomina como DNA polimerasa, la más utilizada es la Taq DNA polimerasa, su sustrato es DNA genómico o cDNA proveniente de mRNA (El cDNA se utiliza cuando analizamos la expresión del mRNA de algún gen de interés), cuando se utiliza este último la reacción se denomina como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se lleva a cabo por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el mRNA en una molécula de cDNA. Además del DNA o cDNA y la enzima, también son necesarios oligonucleótidos que delimiten la secuencia blanco que se desea amplificar, su tamaño usualmente oscila entre 15-25 pares de bases, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citocina y guanina), ion Mg⁺, un buffer y H₂O.

La reacción se produce en tres etapas principales:

- Desnaturalización: el sustrato es sometido a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos para que al final de esta etapa las cadenas del DNA o cDNA estén separadas.
- Hibridación: los oligonucleótidos se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria, la temperatura de esta etapa es de 50-60 °C.
- Extensión: la enzima Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-oligonucleótidos y comienza su función catalítica, además adiciona dNTPs para producir la cadena completa de DNA. La temperatura apropiada para esta etapa es de 72 °C, dando como resultado amplicones de la secuencia deseada.

La PCR en tiempo real se basa en el principio antes mencionado, pero esta técnica detecta y cuantifica las secuencias específicas en cada ciclo de la reacción mediante reporteros fluorescentes. Cuando se utiliza DNA genómico para amplificar en PCR en tiempo real la reacción se denomina qPCR (PCR cuantitativa, por sus siglas en inglés), en contraparte, si se usa cDNA se denomina RT-qPCR. En esta reacción la enzima, dNTPs, Mg⁺, buffer y el reportero fluorescente se compran en una solución denominada "Master Mix". En la PCR en tiempo real la detección de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante dos métodos diferentes que se dividen en específicos y no específicos. Los métodos no específicos utilizan moléculas intercalantes con afinidad al DNA de doble cadena y al ser oxidados generan una señal fluorescente, que es capturada en la etapa de extensión, esta señal es proporcional al número de copias de DNA generadas en cada ciclo, este reportero es conocido como SYBR Green, la principal desventaja de este es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de primers. Para optimizar esto se utiliza una curva melting para determinar si hubo formación de un producto único o dímeros de primers (Tamay et al., 2013).

Por otro lado, los métodos específicos generan una señal basándose en el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET, por sus siglas en inglés), este método se fundamenta en la transferencia de energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o quencher. Para ello se usan sondas fluorescentes de oligonucleótidos marcados con un reportero y un quencher, ambos se encuentran en estrecha unión a menos que la sonda se hibride, cuando hibrida surgen cambios conformacionales en el reportero y el quencher, permitiendo que la Taq polimerasa rompa esta unión, aprobando que la fluorescencia sea liberada y capturada por el equipo, la especificidad de este método es muy alta ejemplo de este sistema son sondas TaqMan (Tamay et al., 2013).

2.6. Western Blot

Western Blot (WB) es una técnica ampliamente utilizada para el análisis de proteínas, su localización celular, interacciones proteína-proteína y sus modificaciones postraduccionales como la fosforilación, ubiquitinación, glicosilación y metilación. Además, puede proporcionar datos semicuantitativos/cuantitativos sobre proteínas diana en muestras biológicas, el principio del WB implica distintos pasos (Bass et al., 2017; Mishra et al., 2017):

- La preparación de muestras: en este paso se realiza la extracción de proteínas mediante la lisis y ruptura de las membranas celulares mediante técnicas de homogeneización, durante este procedimiento se liberan enzimas como proteasas, quinasas, fosfatasa, las cuales pueden degradar a las proteínas de interés. Por tanto, es necesario adicionar inhibidores capaces de suprimir la actividad de estas enzimas.
- Cuantificación de las proteínas: posterior a la extracción, las proteínas deben ser cuantificadas mediante métodos colorimétricos o de absorbancia UV. El método de Bradford es comúnmente utilizado ya que es simple de realizar, requiere solo del equipo espectrofotométrico, la reacción es rápida y el producto es estable aproximadamente

durante una hora a temperatura ambiente. La técnica se basa en un cambio colorimétrico del reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250 de 465 nm (marrón) sin unir a la proteína y 595 nm (azul) cuando hay unión a proteína. De modo que la concentración de la proteína es proporcional a la absorción 595 nm con referencia a una curva estándar.

- Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE): la electroforesis se realiza para la separación de proteínas desnaturalizadas y cargadas negativamente en función de su peso molecular, lo anterior se lleva a cabo en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS).
- Electro transferencia: después de la separación las proteínas son transferidas e inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Las proteínas cargadas negativamente en el gel se transfieren a través de la membrana por acción de una corriente eléctrica.
- Bloqueo de proteínas no específicas en la membrana: este procedimiento evita la unión no específica de los anticuerpos primarios y secundarios a la membrana, ya que esta tiene gran afinidad por las proteínas y los anticuerpos lo son.
- Interacción de proteína diana con anticuerpos primarios específicos: la detección de la proteína se debe a su interacción con el anticuerpo primario específico ya que este reconoce el epítipo de la proteína de interés.
- Incubación con el anticuerpo secundario: el anticuerpo secundario conjugado con una molécula quimioluminiscente o fluorescente se une al fragmento cristalizable (Fc) del anticuerpo primario de este modo es posible su detección por colorimetría o quimioluminiscencia.
- Análisis densitométrico: se utiliza para comparar la abundancia de proteínas entre cada una de las muestras.

2.7. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia (IF) permite la visualización de componentes celulares mediante el uso de anticuerpos específicos conjugados con fluoróforos. Para llevar a cabo esta técnica es necesaria la fijación celular para inmovilizar los antígenos sin perjudicar la arquitectura celular, de modo que los anticuerpos puedan interactuar con cualquier componente celular. Los solventes orgánicos como el metanol y la acetona eliminan los lípidos, deshidratan las células, desnaturalizando y precipitando los componentes celulares, conjuntamente, permeabiliza la membrana evitando su posterior tratamiento con detergentes, en seguida de la fijación, las células son bloqueadas para evitar que los anticuerpos se unan a epítomos inespecíficos, posteriormente, las células son tratadas mediante uno de dos métodos; IF directa donde el anticuerpo primario reacciona con el epítomo específico y emite una señal ya que el anticuerpo está conjugado con un fluoróforo; por su parte la IF indirecta, involucra dos pasos un anticuerpo primario que se une al epítomo objetivo y un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo, el cual reconoce y se une al anticuerpo primario. Aunque el primer método es más sencillo, es más sensible este último. Cabe mencionar que los fluoróforos no alteran la especificidad del anticuerpo y permiten su detección mediante un microscopio de fluorescencia capaz de excitar a los fluoróforos a una longitud de onda apropiada (Im et al., 2019).

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Evaluar el papel de FoxO3a en fibroblastos provenientes de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, neumonitis por hipersensibilidad y sujetos controles.

3.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión a nivel de gen con sondas TaqMan específicas para FoxO3a y SIRT1 en fibroblastos fibróticos, provenientes de neumonitis por hipersensibilidad y controles.
2. Analizar la localización celular de FoxO3a, en fibroblastos fibróticos, de neumonitis por hipersensibilidad y controles mediante inmunofluorescencia.
3. Evaluar el estado de acetilación y desacetilación en fibroblastos fibróticos, de neumonitis por hipersensibilidad y sujetos control mediante Western Blot.

4. Hipótesis

El factor de transcripción FoxO3a está involucrado en diversas funciones celulares, debido a modificaciones postraduccionales y la actividad de la desacetilasa SIRT1 es de vital importancia en este mecanismo.

5. Materiales y Métodos

5.1. Obtención de fibroblastos

Se adquirieron cultivos primarios de fibroblastos obtenidos de biopsias de pacientes diagnosticados con Fibrosis Pulmonar Idiopática y Neumonitis por Hipersensibilidad, además, se adquirieron las líneas de fibroblastos pulmón de humanos sanos obtenidas del ATCC y PromoCell. Dichas células fueron cultivadas en medio Ham's F12 (Gibco, BRL) enriquecido con suero fetal bovino (Gibco BRL) al 10%, penicilina (100U/mL), estreptomycin (100µg/mL) y anfotericina B (0.25µg/mL) a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. No obstante, cada tercer día se cambió el medio de cultivo de las células y estas fueron divididas hasta obtener una confluencia temprana (70-80%), para su posterior procesamiento en los diferentes procedimientos.

5.2. PCR en tiempo real

Los fibroblastos cultivados se lisaron con TRIzol (Invitrogen), posteriormente se adicionaron 200µL de cloroformo, se centrifugo a 9000rpm durante 15 minutos a 4°C, el RNA total se precipito con 500 µL de isopropanol y se lavó con EtOH al 75%, el pellet fue resuspendido en 20 µL de H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y la muestra fue colocada en el ultracongelador a -70 °C.

Posteriormente para evaluar el transcrito del gen FoxO3a y de SIRT1, se llevó a cabo la retrotranscripción de RNA a cDNA con la enzima transcriptasa reversa del kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Waltham, MA, EU), se utilizó 1 µg de RNA total aislado, 1 µL de Oligo(dT), 4 µL de 5xcDNA, 2 µL de dNTP's Mix, 1 µL de RTenhancer y 1 µL de la enzima Verso, las muestras se sometieron 30 minutos a 42 °C, 2 minutos a 95 °C y 10 minutos a 4 °C en el termociclador de punto final (Labnet's MultiGene), finalmente se agregaron 80 µL de H₂O libre

de DNAsas. Para determinar la expresión de FoxO3a, SIRT1 y HPRT, se utilizaron 0.36 μ L de cada sonda taqman, 3 μ L de cDNA, 7.5 μ L de Master Mix y 4.14 μ L de H₂O por cada muestra, en seguida se sometieron a un análisis de q-PCR en tiempo real utilizando Light Cycler 1.5 (Roche Applied Science).

5.3. Inmunofluorescencia

Las células se cultivaron en cubreobjetos en placas de 6 pozos a una densidad de 1.6×10^5 por pozo, se fijaron con metanol-acetona (1:1) durante 5 minutos y se conservaron en PBS 1X, para su procesamiento; las células se bloquearon y permeabilizaron con bloqueador universal 1X y Tritón 0.5% durante 30 minutos. Se incubó con los anticuerpos primarios anti-FoxO3a (1:50) y anti-FOXO acetilado (1:200) (Cell Signaling) toda la noche a 4°C en la cámara húmeda, en seguida se lavó tres veces con 500 μ L de PBS-T 0.1% durante 5 minutos, se adicionaron los anticuerpos secundarios anti-mouse 549 (1:400) y anti-rabbit 488 (1:200) (Invitrogen), nuevamente se lavó tres veces con PBS-T, después, se tiñó con Hoechst (1:500) durante 15 minutos y se adicionó el medio de montaje para capturar las imágenes mediante microscopia confocal.

5.4. Western Blot

Los fibroblastos fibróticos, de neumonitis y controles se cultivaron hasta tener una confluencia del 100%. Posteriormente se obtuvieron proteínas de núcleo y citoplasma para lo cual se utilizó el Kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, Waltham, MA, EU), así mismo, se obtuvieron lisados totales y se empleó Buffer RIPA + coctel de inhibidores, los lisados celulares se sonicaron en hielo. Las proteínas se cargaron en geles SDS-PAGE al 7.5% y se corrieron a 80V durante 2 horas y media, se montó el sándwich para la transferencia del gel a membranas de nitrocelulosa (Amersham) y se corrió durante una hora a 100V, las membranas se bloquearon con BSA al 5% durante una hora, posteriormente se incubaron las

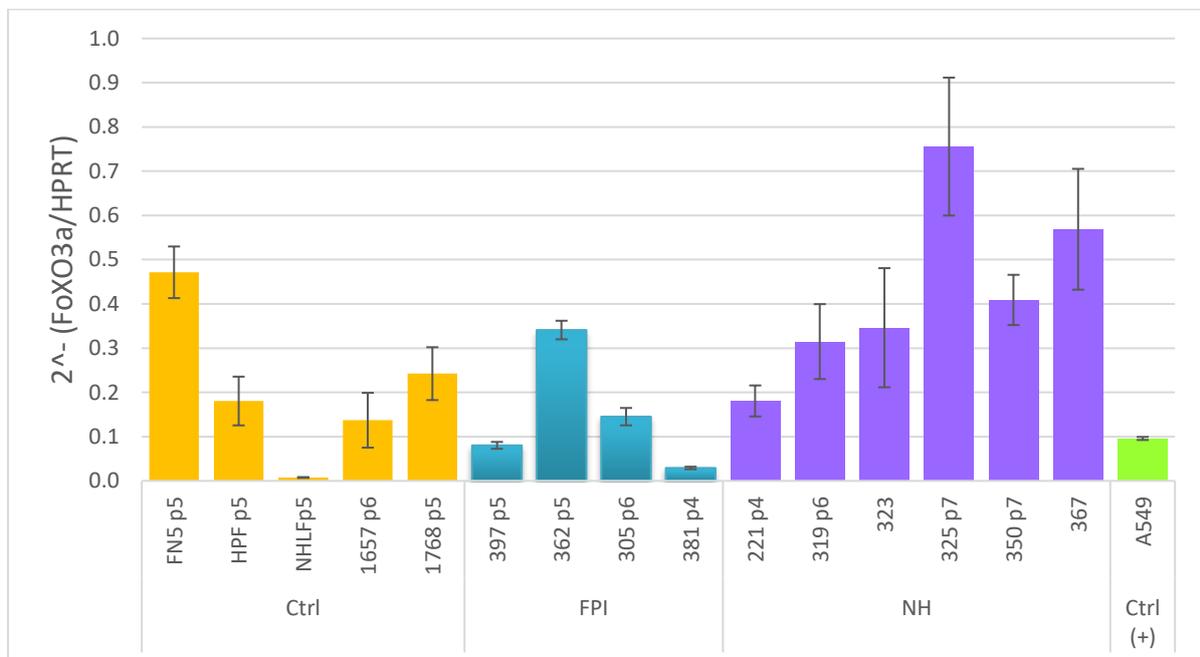
membranas con los anticuerpos primarios específicos anti-FoxO3a, anti acetyl-FoxO3a, anti-acetylated lysine, SIRT1 y el control de carga; β -actina, GAPDH para proteínas de citoplasma e histona 3 para proteínas nucleares dejando el anticuerpo toda la noche. Después, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T 0.05% durante 10 minutos, se adicionaron los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-rabbit/anti-mouse) y se incubaron durante 1 hora, finalmente la marca fue revelada con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific).

6. Resultados

Se determinó la expresión a nivel de gen de FoxO3a y SIRT1 en fibroblastos fibróticos, de neumonitis por hipersensibilidad y de pacientes control. Para ello, se usaron sondas TaqMan para su amplificación en PCR en tiempo real, se usó como gen endógeno HPRT, en la *Figura 4*, se observa que, FoxO3a se expresa más en fibroblastos de NH en comparación con los fibroblastos de FPI. Cabe mencionar que en la línea control FN5 p5, se expresa más a comparación de las líneas fibróticas.

Figura 4

Expresión de FoxO3a mediante RT-qPCR



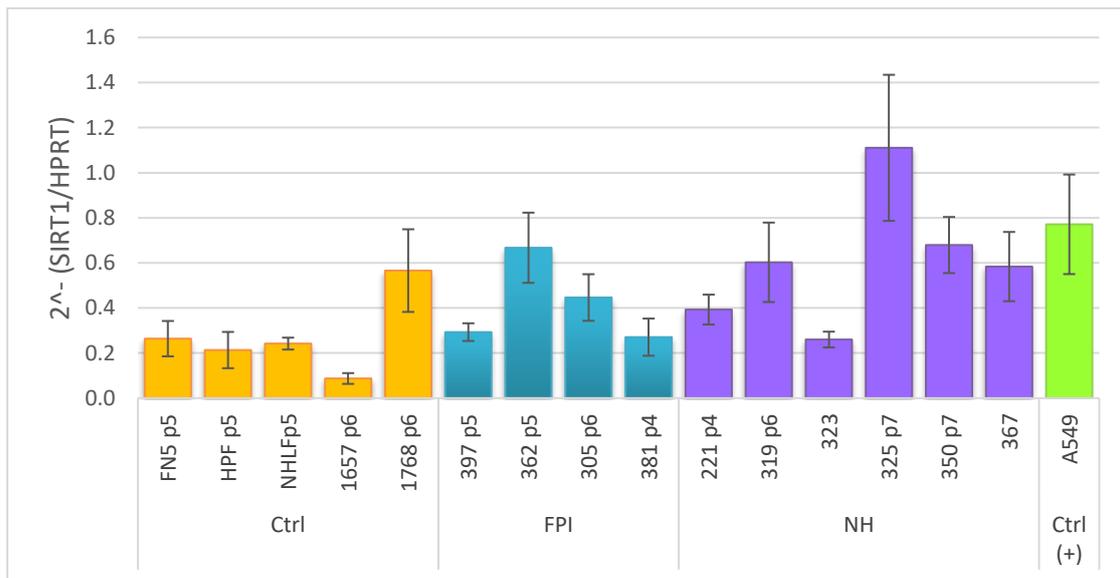
Nota: El nivel de expresión de FoxO3a es mayor en fibroblastos de NH, a comparación de fibroblastos fibróticos, siendo estos últimos menores que el control. En el control positivo A549, FoxO3a se encuentra disminuido.

Para determinar la expresión de SIRT1, una desacetilasa que interviene en las funciones celulares de FoxO3a, se utilizó una sonda TaqMan específica y se obtuvieron los resultados plasmados en la *Figura 5*, en la cual se muestra que hay mayor expresión de este gen en los

fibroblastos de neumonitis, sin embargo, los fibroblastos de ambas patologías expresan más este gen en comparación con los controles. El control positivo, A549, para el gen de FoxO3a se observa muy poco expresado en comparación con los fibroblastos de ambas patologías, sin embargo, para SIRT1, A549 muestra una mayor expresión.

Figura 5

Expresión de SIRT1 mediante RT-qPCR



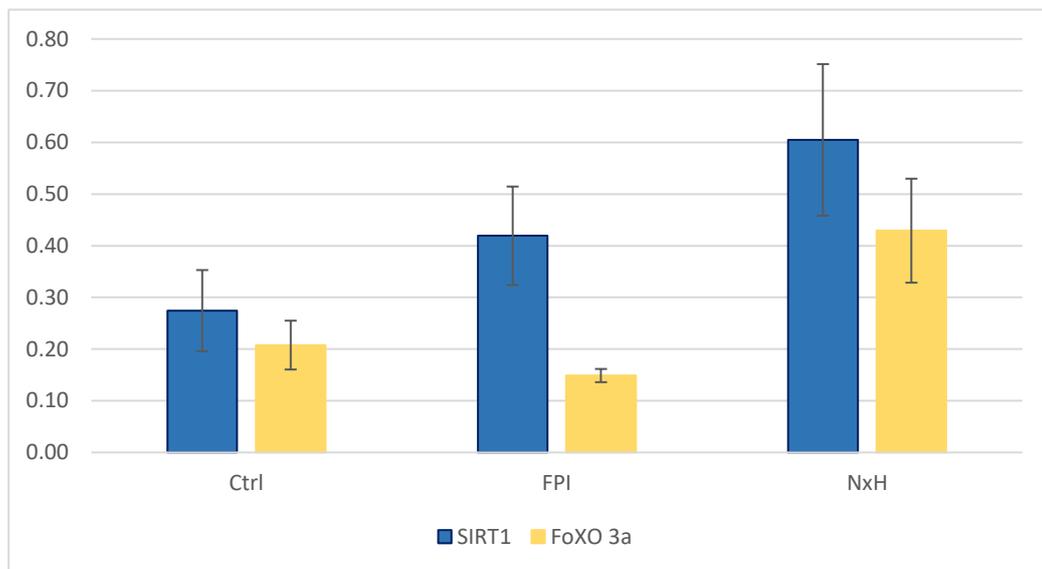
Nota: Expresión de SIRT1 a nivel gen en fibroblastos de sujetos sanos, de FPI y NH. A549 es el control positivo. La expresión de SIRT1 es mayor en fibroblastos con NH.

En general, se observó una mayor expresión de SIRT1 en comparación con la expresión de FoxO3a en los tres grupos de estudio. No obstante, para percibir mejor la expresión de los genes en cada grupo se realizó un análisis de la expresión de los genes por cada grupo como se muestra en la *Figura 6*, en la cual se confirma que en la expresión de SIRT1 es mayor a la expresión de FoxO3a en los tres grupos de estudio, además, se reitera que la expresión de FoxO3a es mayor en los fibroblastos de neumonitis por hipersensibilidad en comparación con los fibroblastos controles y fibróticos ($p < 0.05$), además, aunque FoxO3a pareciera expresarse menos en fibroblastos con FPI en comparación con el control, estadísticamente se demostró que

no hay diferencias significativas entre los grupos ($p > 0.05$). De igual manera, SIRT1 se expresa más en fibroblastos de neumonitis en comparación con los fibróticos ($p < 0.05$), por otro lado, la expresión de SIRT1 parecer ser mayor en fibroblastos con FPI en comparación con el grupo control, pero estadísticamente no hay significancia entre los grupos ($p > 0.05$).

Figura 6

Expresión de FoxO3a vs SIRT1 en fibroblastos con FPI, NH y controles sanos.



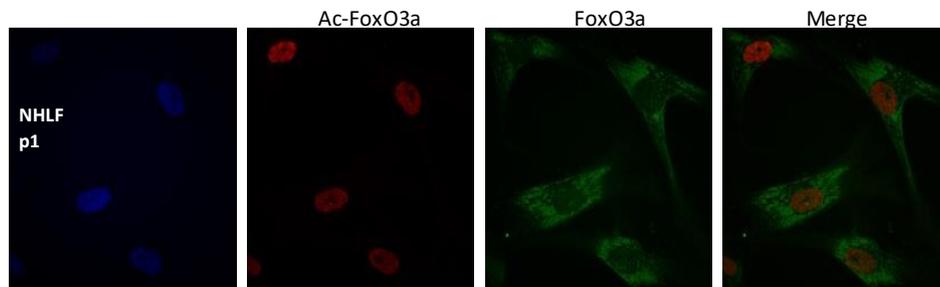
Nota: La expresión de SIRT1 es mayor que FoxO3a, donde en NH es más dominante la cantidad a nivel gen de FoxO3a con respecto al grupo control y FPI ($p < 0.05$). No hay existe significancia en la expresión de FoxO3a del grupo control con respecto al de FPI ($p > 0.05$).

Las modificaciones postraduccionales como la acetilación y fosforilación participan en la regulación de la actividad de FoxO3a y modifican su localización intracelular, se sabe que FoxO3a al ser acetilado en respuesta a estímulos de estrés es relocalizado al compartimento nuclear de las células y cuando es fosforilado se ubica en el citoplasma, para analizar esta acción se llevó a cabo una inmunofluorescencia en fibroblastos fibróticos, de neumonitis por hipersensibilidad y controles. La *Figura 7* muestra que, para la línea control, NHLF p1, FoxO3a acetilado se localiza en el núcleo mientras que FoxO3a total se ubica en citoplasma y ligeramente

en núcleo, sin embargo, también se puede observar la señal muy semejante en ambos compartimentos.

Figura 7

Inmunofluorescencia de NHLF p1 (Control)



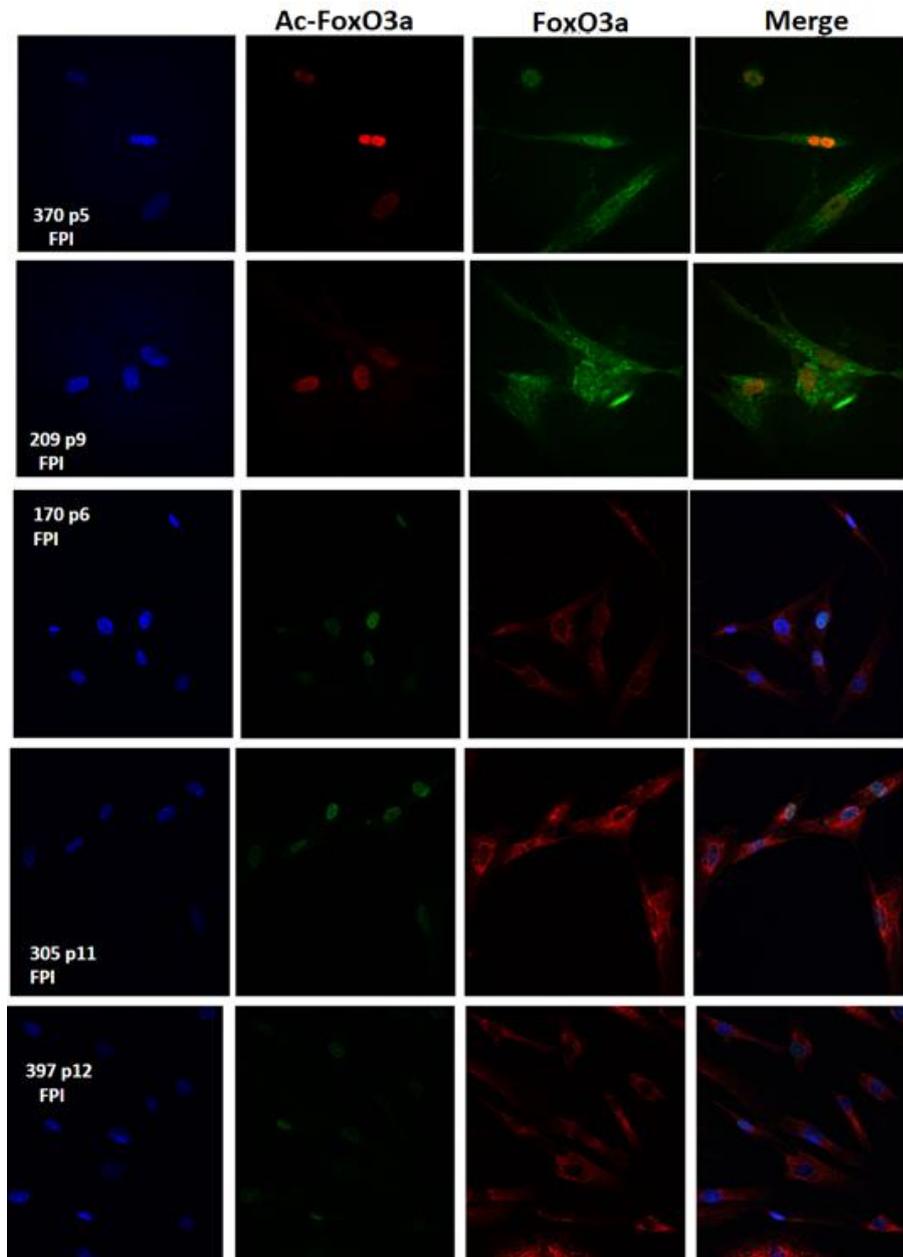
Nota: NHLF p1 (Control) en la primera imagen observamos el núcleo teñido con Hoechst, en seguida FoxO3a acetilado Alexa Fluor 488, FoxO3a total Alex Fluor 594 y finalmente el merge.

En cuanto a los fibroblastos de FPI, en la *Figura 8* se aprecia que FoxO3a acetilado se localiza en núcleo; en las líneas 209 p9 y 305 p11 se expresa ligeramente, en las células 370 p5 la marca es más intensa en un par de núcleos, en cambio, en la línea 170 p6 y 397 p12 la intensidad es casi nula, lo que significa que no hay presencia de este factor en el núcleo. Por otro lado, en citoplasma si hay presencia de FoxO3a total en todas las líneas celulares, aunque en la línea 170 p6 es más tenue su expresión. Cabe mencionar que la expresión de FOXO en citoplasma impide la activación de sus genes diana, adicionalmente en este compartimento celular FoxO3a es degradado. En los fibroblastos de neumonitis por hipersensibilidad, es evidente la expresión nuclear de FoxO3a acetilado en todas las líneas celulares. Por su parte, FoxO3a total en las líneas 221 p6 y 325 p5 se localiza preferentemente en el citoplasma, pero también en núcleo, en cambio, en las células 331 p2, 350 p2 y 367 p2 es claro que FoxO3a se localiza en mayor proporción en el núcleo (*Figura 9*). De acuerdo a lo anterior, en la línea control se percibe la misma intensidad de FoxO3a total y acetilado en los distintos compartimentos celulares, ahora bien, FoxO3a en fibroblastos con FPI se localiza en citoplasma donde puede ser degradado, lo cual coincide con la baja expresión de FoxO3a en la cuantificación por PCR en tiempo real. Por

el contrario, la presencia de FoxO3a en fibroblastos con NH es más evidente en núcleo lo cual explicaría su expresión en qPCR.

Figura 8

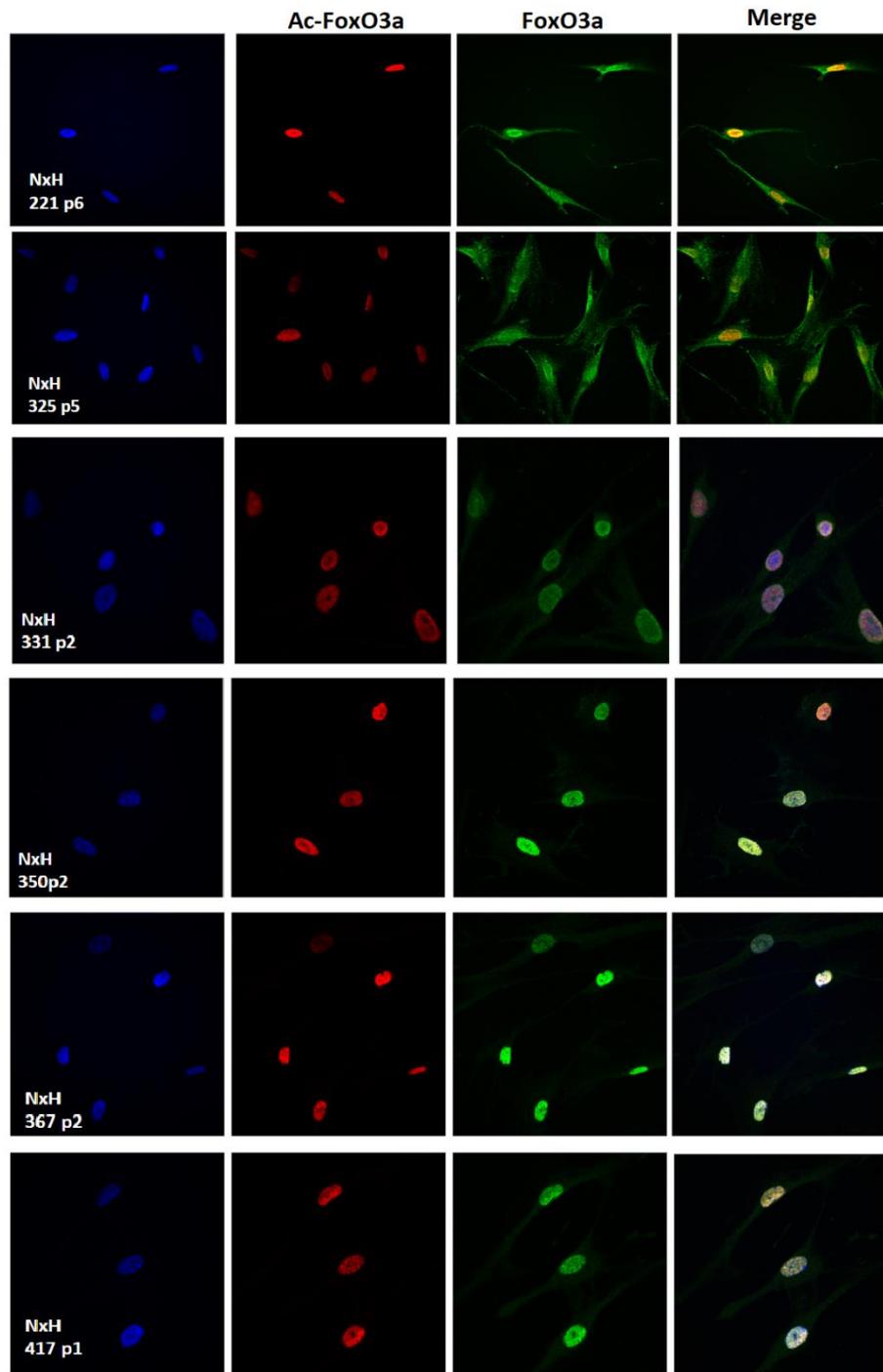
Inmunofluorescencia de fibroblastos diagnosticados con FPI



Nota: en la primera imagen observamos el núcleo teñido con Hoechst, en seguida FoxO3a acetilado Alexa Fluor 488, FoxO3a total Alex Fluor 594 y finalmente el merge. La intensidad emitida por los fluoróforos para FoxO3a total indica que este factor se ubica preferentemente en el citoplasma. FoxO3a acetilado se encuentra en núcleo pero su intensidad es menor.

Figura 9

Inmunofluorescencia de fibroblastos diagnosticados con NH



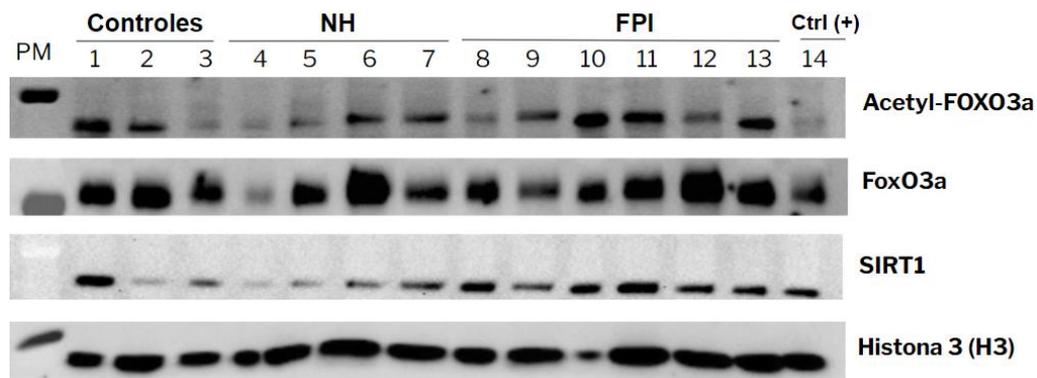
Nota: en la primera imagen observamos el núcleo teñido con Hoechst, en seguida FoxO3a acetilado Alexa Fluor 488, FoxO3a total Alex Fluor 594 y finalmente el merge. FoxO3a acetilado se localiza preferentemente en el núcleo, por su parte FoxO3a total en la línea 221 p6 y 325 p5 se localiza en el citoplasma, mientras que el resto de los fibroblastos se ubican en el compartimento nuclear.

FoxO3a en estado acetilado migra al núcleo para inducir la expresión de sus genes diana, en este compartimento FoxO3a y SIRT1 forman un complejo; Sirt1 aumenta la capacidad de FOXO para inducir la detención del ciclo celular y la resistencia al estrés oxidativo, pero inhibe la capacidad de inducir la apoptosis celular. Para evaluar el estado de acetilación y desacetilación en los tres grupos se realizó extracción de proteínas de núcleo, citoplasma y lisados totales. Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE 7.5% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para su análisis por Western Blot.

En proteínas nucleares la expresión de Acetyl-FoxO3a es casi nula en algunas líneas celulares como las marcadas en los carriles 3, 4, 5, 8 y 14. En cuanto a FoxO3a es más notoria su expresión en fibroblastos fibróticos a comparación de los controles, del mismo modo, no se observa mucha diferencia en la expresión de FoxO3a en fibroblastos fibróticos y de neumonitis. En consecuencia, la expresión de SIRT1 es ligeramente mayor en fibroblastos fibróticos a comparación de la nula expresión en fibroblastos sanos (controles) y de neumonitis por hipersensibilidad (*Figura 10*).

Figura 10

Estado de acetilación/desacetilación de FoxO3a en proteínas nucleares.



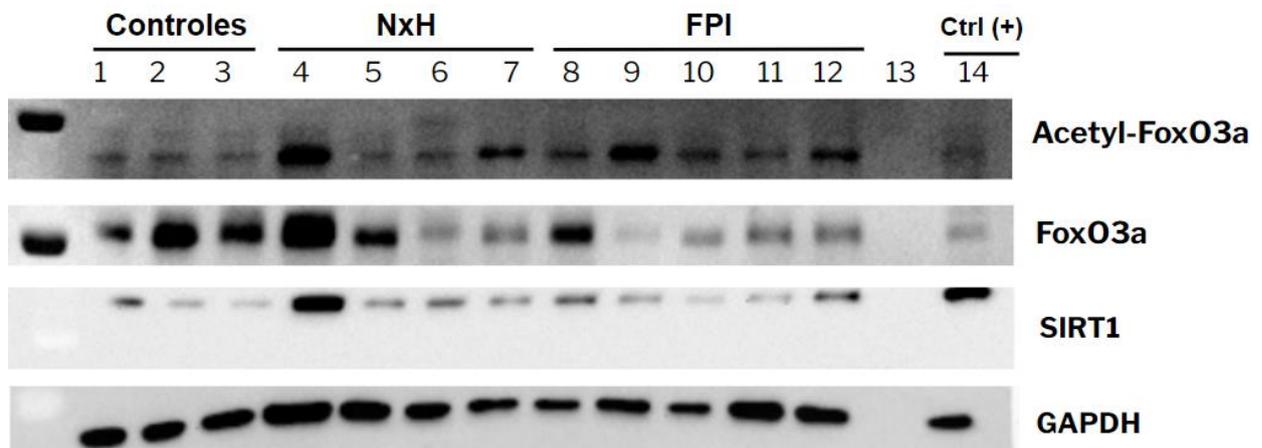
1. NHLF p8 4. 207 p6 7. 319 p6 10. 305 p11 13. 337 p7
 2. CCD19 p7 5. 350 p7 8. 170 p6 11. 342 p9 14. A549
 3. HPF p7 6. 331 p7 9. 231 p10 12. 397 p12

Nota: La expresión de FoxO3a en los tres grupos de estudio es mayor a FoxO3a en su estado acetilado, donde la intensidad de este último es semejante a la cantidad de SIRT1.

Respecto a las proteínas citoplasmáticas (*Figura 11*) se observa que FoxO3a se expresa más en las líneas controles, FoxO3a acetilado se aprecia ligeramente en los tres grupos de estudio, en cuanto a SIRT1 su expresión es muy mínima en todas las líneas celulares, cabe resaltar, que cuanto mayor es la expresión de SIRT1 mayor es la expresión de FoxO3a en las células tal y como se observa en la línea 207 p6 del carril 4 del WB de las proteínas citoplasmáticas, sin embargo, en el resto de las líneas celulares se observa muy disminuida su expresión.

Figura 11

Estado de acetilación/desacetilación de FoxO3a en proteínas citoplasmáticas.



1. NHLF p8 4. 207 p6 7. 319 p6 10. 305 p11 13. NO SE
 2. CCD19 p7 5. 350 p7 8. 170 p6 11. 342 p9 CARGÓ
 3. HPF p7 6. 331 p7 9. 231 p10 12. 397 p12 14. A549

Nota: la señal de SIRT1 y FoxO3a es casi nula en citoplasma, así mismo la expresión FoxO3a total es mínima en fibroblastos diagnosticados con cada parología a comparación del control. GAPDH control de carga.

7. Discusión

Además de la intervención de FoxO3a en múltiples procesos celulares, se ha demostrado su participación en distintas patologías como cánceres y enfermedades pulmonares tal como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y Neumonitis por hipersensibilidad (NH). Las citocinas profibroticas IL-13 y TGF- β participan en el desarrollo de estas patologías mediante la diferenciación de miofibroblastos y la secreción de matriz extracelular. Im y colaboradores (2015), agregan que la alteración de la vía PTEN-Akt, regula la fibrosis mediante la basta producción de los mediadores inflamatorios antes mencionados de modo que las enfermedades pulmonares mantienen su fenotipo patológico al suprimir la autofagia, mediante la inactivación de FoxO3a. Por su parte, Wang et al., (2017) afirman que los factores de crecimiento como TGF- β 1 y citocinas inflamatorias inician una cascada de señalización que genera la producción de quinasas como AKT/SGK, ERK e IKK, mismas que fosforilan FoxO3a en sitios específicos induciendo su retención y degradación citoplasmática, provocando la inhibición de la transcripción de los genes diana de este factor. En contraste, los resultados de la expresión a nivel gen de FoxO3a del presente proyecto confirmaron que al igual que lo expresan Wang y colaboradores (2020), FoxO3a se encuentra disminuido en fibroblastos de pacientes con FPI a comparación de fibroblastos de sujetos control, debido a la participación de las citocinas profibroticas y la activación de las quinasas AKT/SGK, ERK e IKK. Por el contrario, la expresión de FoxO3a fue mayor en fibroblastos de NH, lo anterior se atribuye a que la NH en primera instancia puede dar lugar a una inflamación pulmonar aguda donde participan las células Th1, sin embargo, esta reacción inmunitaria puede volverse crónica mediante la producción de células Th2, que secretan IL-4, IL13 y otras citoquinas que inducen fibrosis mediante la estimulación y la producción de TGF- β 1. Cabe mencionar que no todos los pacientes desarrollan la NH crónica, por tanto, la expresión génica de FoxO3a, fue mayor en fibroblastos de NH debido a que los fibroblastos de

los pacientes con esta patología posiblemente padezcan de esta en su forma aguda (Costabel et al., 2020).

Es necesario considerar que la actividad de FoxO3a es regulada por múltiples procesos, principalmente por modificaciones postraduccionales que repercuten en su localización subcelular y su actividad de unión al DNA. Debido a ello, en la inmunofluorescencia indirecta se observó que, en fibroblastos fibróticos FoxO3a se localiza preferentemente en el citoplasma donde es degradado y su actividad es inhibida, además, la acetilación de FoxO3a en FPI es mínima ya que la señal emitida es muy débil. Como se mencionó anteriormente, en FPI la vía de señalización de Akt induce la fosforilación de FoxO3a, esta modificación favorece su localización citoplasmática, supresión de su actividad y degradación (Xie et al., 2012). Adicionalmente en fibroblastos de NH, FoxO3a se localizó preferentemente en el compartimento nuclear a excepción de dos líneas celulares (221 p6 y 325 p5), aquí la intensidad del fluoróforo parecer ser semejante tanto en FoxO3a acetilado y total. Masaki y colaboradores (2010) agregan que al ser expuesto a estrés oxidativo FoxO3a se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de sus genes diana mediante su unión a la secuencia consenso TTGTTTAC, además, el estrés favorece la unión del factor con las proteínas CBP/P300, acción fundamental para la transactivación de sus genes diana, no obstante, disminuye su actividad de unión a DNA (Wang et al., 2017; Lars P y Marten S, 2005). Con lo anterior se reitera que existe una mayor expresión de este factor de transcripción en fibroblastos de NH a comparación de los fibroblastos con FPI.

En otro sentido, las modificaciones postraduccionales como la acetilación y la fosforilación que son mecanismos interdependientes que interactúan para regular las proteínas FOXO, estas modificaciones pueden ser reversibles, esta acción es realizada por SIRT1. Bordbari y colaboradores (2021) agregan que la acetilación de FoxO3a mediada por CBP/p300 atenúa su actividad e induce su degradación, por el contrario, la desacetilación mediada por SIRT1 activa

a FoxO3a en el núcleo favoreciendo la expresión de varios genes (Wang et al., 2017). De acuerdo a lo anterior, para evaluar el estado de acetilación/desacetilación de FoxO3a en los tres grupos de estudio se utilizó la técnica de WB, donde se demostró que en proteínas nucleares la expresión de SIRT1 y Acetyl-FoxO3a es semejante, mientras que FoxO3a total es mayor. En proteínas citoplasmáticas, FoxO3a en su estado acetilado es proporcional a la señal emitida por SIRT1, en cuanto a FoxO3 total se en cuenta disminuido a comparación de su expresión en proteínas nucleares. Lo anterior indica que la desacetilación de FoxO3a mediada por SIRT1, favorece a la presencia de FoxO3a total en núcleo donde puede llevar a cabo sus funciones, lo cual coincide con lo mencionado por Olmos et al., (2013), quienes descubrieron que la sobreexpresión de SIRT1 provoca una disminución en la fosforilación de FoxO3a por parte de Akt, aumentando los niveles totales de FoxO3a, además sus estudios de inmunofluorescencia mostraron que la sobre expresión de SIRT1 aumenta los niveles nucleares de FoxO3a. Estos mismos autores mencionan que SIRT1 no solo regula los niveles celulares de FoxO3a, sino también favorecen su estabilidad protegiendo a FoxO3a de la fosforilación de Akt en condiciones basales y estrés oxidativo.

Por otro lado, la expresión de SIRT1 se encontraba reducida en los fibroblastos de ambas patologías lo cual confirma lo mencionado por Chao y colaboradores (2017) quienes demostraron que, en tejidos con patologías pulmonares como EPOC, SIRT1 se encuentra reducido. Por el contrario, los autores exponen que el aumento de la actividad de la desacetilasa inhibe la producción de citocinas proinflamatorias atenuando la lesión pulmonar, de modo que disminuye el crecimiento de células cancerosas mediante la activación de genes relacionados con el ciclo células, apoptosis reduciendo la progresión de la patología (Masaki et al., 2010; Zhou et al., 2022).

La diferencia de la localización subcelular, la expresión a nivel gen de SIRT1, FoxO3a total y acetilado en fibroblastos de cada patología se pueden atribuir a que no todos los pacientes que

son expuestos al mismo alérgeno desarrollan una respuesta fibrótica, se ha demostrado que dentro de los factores de riesgo de la FPI y NH están relacionados con variables genéticas y cambios postranscripcionales que dan como resultado la pérdida de la integridad del epitelio pulmonar. Estudios en neumonía intersticial familiar (FIP) han identificado variables genéticas como; mutación heterocigota en el gen que codifica la proteína C surfactante (SFTPC), misma que ayuda a esparcir el surfactante por la superficie del tejido pulmonar para reducir la tensión superficial y facilitar la respiración. Las mutaciones en este gen causan una acumulación del surfactante en los alveolos por deficiencia de proteína C del surfactante, además, se han identificado seis mutaciones adicionales en este gen que están asociadas con la fibrosis pulmonar (National Library of Medicine, 2022; Wolters et al., 2014). Adicionalmente, existen variantes genéticas relacionadas con el mantenimiento de la longitud de los telómeros como la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), el componente de RNA de telomerasa (TERC), la ribonucleasa específica de poliA (PARN) y el regulador de la elongación de los telómeros helicasa (RTEL). Estas mutaciones en los genes de la telomerasa favorecen el desarrollo de disqueratosis congénita, un síndrome de envejecimiento prematuro. Conjuntamente, la pérdida de la actividad de la telomerasa puede contribuir a la fibrosis pulmonar a través de la supresión de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y mediante la senescencia de las células epiteliales alveolares (Luppi et al., 2021; Richeldi et al., 2017).

En síntesis, la función biológica de FoxO3a es regulada por modificaciones postraduccionales que pueden ser reversibles mediante la participación de SIRT1. La consecuencia de las modificaciones es múltiple, ya que la fosforilación es favorecida por la desregulación de citocinas como IL-13 y TGF- β mismas que se producen en respuesta de las patologías y que activan cinasas como Akt que fosforila a FoxO3a conduciendo a su retención citoplasmática, inactivación y degradación. De manera similar, la acetilación vía CBP/P300 atenúa la actividad transcripcional de FoxO3a y la desacetilación de este factor activa sus genes diana favoreciendo la regulación

del ciclo celular, apoptosis, senescencia, longevidad, de modo que podría ser una diana terapéutica para reducir la lesión pulmonar en FPI y NH.

8. Conclusión

FoxO3a es regulado por modificaciones postraduccionales influyendo en su localización celular y sus funciones como regulación del ciclo celular, autofagia, apoptosis, etc. Es por ello que se evaluó el papel de FoxO3a en fibroblastos provenientes pacientes diagnosticados con FPI, NH y sujetos control, donde se demostró que su expresión a nivel gen por RT-qPCR es disminuida y desregulada en fibroblastos de FPI, por el contrario en fibroblastos de NH se encontró sobre expresado ya que los factores inflamatorios IL-13 y TGF β se presentan solo cuando esta patología es crónica lo cual no sucede en todos los pacientes expuestos al mismo antígeno, por su parte en FPI estos factores inflamatorios son los que desarrollan la respuesta fibrótica, incrementando la producción de quimiocinas como Akt, que se encarga de fosforilar a FoxO3a e inducir su degradación en el citoplasma. Con la fosforilación FoxO3a migra al citoplasma, mientras que al ser expuesto a estrés oxidativo migra al núcleo donde favorece la expresión de sus genes diana, por ello en la inmunofluorescencia se demostró que la localización de FoxO3a en pacientes con FPI es en el citoplasma, mientras que en pacientes con NH la localización es favorable en el núcleo; con lo anterior se reitera que la expresión de este factor es mayor en fibroblastos con NH a comparación de los de FPI. La acetilación de FoxO3a por estrés extracelular, es reversible mediante la acción de SIRT1, este proceso favorece la presencia de FoxO3a total en núcleo donde puede desarrollar sus funciones para reducir la lesión pulmonar en FPI y NH. Aunado a lo anterior, se confirma la hipótesis ya que las modificaciones postraduccionales como la fosforilación y acetilación influyen en la localización subcelular de FoxO3a, y SIRT1 es de vital importancia debido a que juega un papel importante en las funciones celulares del factor.

9. Referencias

- Barnes, H., Troy, L., Lee, C., Sperling, A., Strek, M., y Glaspole, J. (2021). Hypersensitivity pneumonitis: Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Allergy*, 1-9. doi: 10.1111/all.15017
- Bass, J., Wilkinson, D., Rankin, D., Phillips, B., Szewczyk, N., Smith, K., y Atherton, P. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 27(1), 4-25. doi:10.1111/sms.12702
- Bocitto, M., y Kalb, R. (2011). Regulation of Foxo-dependent transcription by post-translational modifications. *Current drug targets*, 12(9), 1303-1310. doi:10.2174/138945011796150316
- Calnan, D., y Brunet, A. (2008). The FoxO code. *Nature*, 27(16), 2276-2288. doi: 10.1038/onc.2008.21
- Chao, G., Yaqing, L., Jialiang, L., Xiwang, Y., Yuanshun, L., Jianping, Y., Chun, C., Hongbin, Z., Liming, C., y Yingyu, M. (2017). LncRNA-mediated SIRT1/FoxO3a and SIRT1/p53 signaling pathways regulate type II alveolar epithelial cell senescence in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Molecular Medicine Reports*, 15(5), 3129-3134. doi: 10.3892/mmr.2017.6367
- Choi, S., y Kemper, J. (2013). Regulation of SIRT1 by microRNAs. *Molecules and cells*, 36(5), 385-392. doi:10.1007/s10059-013-0297-1
- Costabel, U., Miyazaki, Y., Pardo, A., Koschel, D., Bonella, F., Spagnolo, P., Guzman, J., Ryerson, C., y Selman, M. (2020). Hypersensitivity pneumonitis. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(65), 1-16. doi: 10.1038/s41572-020-0191-z

- Garcia, L., y Li, X. (2021). Trending topics of SIRT1 in tumorigenicity. *BBA - General subjects*, 1865(9), 129952. doi:10.1016/j.bbagen.2021.129952
- Hiroaki, D., Jun-ichi, S., y Akiyoshi, F. (2011). Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein–protein interactions. *Biochimica et Biophysica*, 1813(11), 1954-1960. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.001
- Hori, Y., Kuno, A., Hosoda, R., y Horio, Y. (2013). Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *PLoS one*, 8(9), 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0073875
- Hwang, J., Rajendrasozhan, S., Yao, H., Chung, S., Sundar, I., Huyck, H., Pryhuber, G., Kinnula, V., y Rahman, I. (2011). FOXO3 deficiency leads to increased susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation, airspace enlargement, and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of immunology*, 187(2), 987-998. doi:10.4049/jimmunol.1001861
- Im, J., Hergert, P., y Nho, R. (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. doi:10.1152/ajplung.00079.2015.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M., y Yong, W. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 299-311. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Katrin, N., Katrin, K., Christine, G., y Werner, L. (2007). E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1769(4), 244-252. doi: 10.1016/j.bbaexp.2007.04.001

- Lars, H., y Marten, S. (2005). Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *Trends Biochem Sci*, 30(2), 81-86. doi: 10.1016/j.tibs.2004.12.002
- Link, W. (2019). Introduction to FOXO Biology. *Methods Mol Biol*, 1890(1), 1-9. doi: 10.1007/978-1-4939-8900-3_1
- Liu, Y., Ao, X., Ding, W., Ponnusamy, M., Wu, W., Hao, X., Yu, W., Wang, Y., Li, P., y Wang, J. (2018). Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Molecular cancer*, 17(1), 104. doi:10.1186/s12943-018-0856-3
- Luppi, F., Kalluri, M., Faverio, P., Kreuter, M., y Ferrara, G. (2021). Idiopathic pulmonary fibrosis beyond the lung: understanding disease mechanisms to improve diagnosis and management. *Respiratory research*, 22(1), 109. doi:10.1186/s12931-021-01711-1
- Martinez, F., Collard, H., Pardo, A., Raghu, G., Richeldi, L., Selman, M., Swigris, J., Taniguchi, H., y Wells, A. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 20(3), 17074. doi: 10.1038/nrdp.2017.74
- Masaki, S., Akira, Y., Eiji, K., Yasuhiro, T., Junichi, I., Katsunori, T., Kentaro, K., Takeshi, U., Narihito, S., y Seiji, N. (2010). Foxo3a expression and acetylation regulate cancer cell growth and sensitivity to cisplatin. *Cancer Science*, 101(5), 1177-1185. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01503.x
- Mishra, M., Tiwari, S., y Gomes, A. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics*, 14(11), 1037-1053. doi:10.1080/14789450.2017.1388167
- National Library of Medicine. (2022). *SFTPC surfactant protein C [Homo sapiens (human)]*. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6440>
- Nho, R., y Hergert, P. (2014). FoxO3a and disease progression. *World journal of biological chemistry*, 5(3), 346-354. Doi: 10.4331/wjbc.v5.i3.346

- Nho, R., Hergert, P., Kahm, J., Jessurun, J., y Henke, C. (2011). Pathological alteration of FoxO3a activity promotes idiopathic pulmonary fibrosis fibroblast proliferation on type I collagen matrix. *The American journal of pathology*, 179(5), 2420-2430. Doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.020
- Nho, R., Peterson, M., Hergert, P., y Henke, C. (2013). FoxO3a (Forkhead Box O3a) deficiency protects Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) fibroblasts from type I polymerized collagen matrix-induced apoptosis via caveolin-1 (cav-1) and Fas. *PLoS one*, 8(4), e61017. Doi: 10.1371/journal.pone.0061017
- Nie, Yunjuan., Sun, Lei., Wu, Yaxian., Yang, Yaoyao., Wang, Jun., He, Huiqiong., Hu, Yudong., Chang, Yanhua., Liang, Qing., Zhu, Jianwei., Ye, R., Christman, J., y Qian, Feng. (2017). AKT2 Regulates Pulmonary Inflammation and Fibrosis via Modulating Macrophage Activation. *The Journal of Immunology*, 1601503. doi: 10.4049/jimmunol.1601503
- Nogueira, R., Melo, N., Novais, H., Martins, N., Delgado, L., Morais, A., y Mota, P. (2018). *Hypersensitivity pneumonitis: Antigen diversity and disease implications. Pulmonology*, 25 (2), S2531043718301120-. doi: 10.1016/j.pulmoe.2018.07.003
- Olmos, Y., Sánchez-Gómez, F. J., Wild, B., García-Quintans, N., Cabezudo, S., Lamas, S., & Monsalve, M. (2013). SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 α complex. *Antioxidants & redox signaling*, 19(13), 1507–1521. doi: 10.1089/ars.2012.4713
- Rahman, I., Kinnula, V. L., Gorbunova, V., & Yao, H. (2012). SIRT1 as a therapeutic target in inflammaging of the pulmonary disease. *Preventive medicine*. doi:10.1016/j.ypmed.2011.11.014

- Richeldi, L., Collard, H., y Jones, M (2017).. *Idiopathic pulmonary fibrosis. The Lancet*, S0140673617308668-. doi:10.1016/S0140-6736(17)30866-8
- Shenderov, K., Collins, S., Powell, J y Horton, M. (2021). Immune dysregulation as a driver of idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 131(2), e143226. Doi:10.1172/JCI143226
- 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.
- Talmadge E., Annie P y Moisés S. (2011). *Idiopathic pulmonary fibrosis. Seminar* 378(9807), 0–1961. doi:10.1016/s0140-6736(11)60052-4
- Tamay L., Ibarra C y Velasquillo C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Medigraphic. 2 (2), 70-78. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/rid>
- Vivar, R., Humeres, C., Anfossi., Bolivar, S., Catalan, M., Hill, J., Lavandero, Sergio., y Diaz-Araya, G. (2020). *Role of FoxO3a as a negative regulator of the cardiac myofibroblast conversion induced by TGF-β*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118695
- Wang, X., Hu, S., y Liu, L. (2017). Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically?. *Oncology letters*, 13(5), 2867–2872. Doi:10.3892/ol.2017.5851
- Willcox, B., Donlon, T., He, Q., Chen, R., Grove, J., Yano, K., Masaki, K., Willcox, D., Rodriguez, B., y Curb, J. D. (2008). FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), 13987–13992. Doi: 10.1073/pnas.0801030105

- Wolters, P. J., Collard, H. R., y Jones, K. D. (2014). Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Annual review of pathology, 9*, 157–179. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104706
- Xie, Q., Chen, J y Yuan, Z. (2012). *Post-translational regulation of FOXO. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 44*(11), 897–901. doi:10.1093/abbs/gms067
- Xu, S., Zhang, X., Ma, Y., Chen, Y., Xie, H., Yu, L., Wang, J., Xu, S. Q., & Pan, F. (2022). FOXO3a Alleviates the Inflammation and Oxidative Stress *via* Regulating TGF- β and HO-1 in Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in immunology, 13*, 935534. Doi: 10.3389/fimmu.2022.935534
- Yang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Chao, Y., Zhang, J., Jia, Y., Tie, J., & Hu, D. (2022). Regulation of SIRT1 and Its Roles in Inflammation. *Frontiers in immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2022.831168
- Zhou, Y., Zhang, F., & Ding, J. (2022). As a Modulator, Multitasking Roles of SIRT1 in Respiratory Diseases. *Immune network, 22*(3), doi:10.4110/in.2022.22.e21