



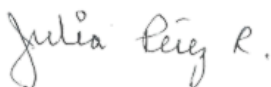
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

El Papel de FoxO3a y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la apoptosis,
en Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH)

ASESORES

Interno: Dra. Julia Pérez Ramos.



Externo: Dra. Iliana Herrera Fuentes.



ALUMNO

Jesús Fuentes Ascencio 2192052370

Lugar de realización

Laboratorio de Biopatología Pulmonar. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas".

Fecha de inicio y termino

Del 25 de septiembre de 2023 al 25 de marzo de 2024

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	3
1.Introducción.....	5
2.Objetivos.....	6
2.1. Objetivo general.....	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
3.Hipótesis.....	6
4.Marco teórico.....	7
4.1. EPID.....	7
4.2. FPI.....	7
4.3. NH.....	9
4.4. FOXO.....	13
4.5. Estrés oxidativo y ROS.....	16
4.6. Apoptosis.....	17
4.7. Familia de proteínas Bcl-2.....	20
5.Materiales y métodos.....	25
5.1. Obtención de fibroblastos.....	25
5.2. Estimulo con H ₂ O ₂	25
5.3. Extracción de ARN.....	25
5.4. Cuantificación de ARN.....	26
5.5. RT-PCR y q-PCR en tiempo real.....	26
5.6. Obtención de lisados totales.....	26
5.7. Preparación de extractos citosólicos y nucleares.....	27
5.8. Curva estándar de BSA.....	27
5.9. Western Blot.....	27
6.Resultados.....	28
6.1.PCR.....	28
6.2. Western Blot.....	33
7.Discusion.....	38
8.Conclusión.....	41
9. Referencias.....	42
10.Apéndice.....	46

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
APAF-1	Factor 1 activador de proteasa apoptótica
AT1	Células epiteliales alveolares tipo 1
AT2	Células epiteliales alveolares tipo 2
ATP	Adenosín Trifosfato
BH3	Dominio 3 de homología Bcl-2
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa
CAT	Catalasa
CBP	Proteína de unión a CREB
CDK	Ciclina dependiente de quinasa
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
EPID	Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa
FADD	Proteína adaptadora producida por el gen <i>FADD</i> (del inglés Fas-associated Death Domain)
FASR	Receptor Fas
FoxO	Forkhead Box O
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
GADD45α	Proteína que modula el crecimiento y daño al ADN
Gpx	Glutación peroxidasa
H₂O₂	Peróxido de Hidrogeno
HCIO	Ácido hipocloroso
IL-12	Interleucina 12
IMM	Membrana interna mitocondrial
JNK	Quinasa N-terminal c-Jun
MEC	Matriz extracelular
MEM	Membrana externa mitocondrial
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial

MST1	Quinasa involucrada en la fosforilación
NH	Neumonitis por Hipersensibilidad
O⁻²	Anión superóxido
O₂	Oxígeno molecular
O₃	Ozono
OH⁻	Radical hidroxilo
OXPPOS	Genes de fosforilación oxidativa mitocondrial
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PRDX	Peroxiredoxinas
Ptdser	Señal fosfatidilserina
PTM	Modificaciones postraduccionales
PTP	Complejo de poros de transición de permeabilidad mitocondrial
PUMA	Modulador de apoptosis regulado positivamente por p53
Redox	Reacciones de oxidación y reducción
Rho	Hexámeros proteicos de la familia de helicasas
ROOH	Peróxidos lipídicos
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SIRT1	Sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD
SIRT2	Sirtuina-2 desacetilasa dependiente de NAD
SOD	Superóxido dismutasa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-alfa	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRADD	Proteína codificada por el gen <i>TRADD</i> (del inglés TNF receptor- associated Death Domain)
TRAILS	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
VDAC	Canal aniónico de voltaje
Zn- y Mg-SOD	Superóxido dismutasa de zinc y manganeso

1.Introducción.

La EPID, a veces denominada enfermedades parenquimatosas difusas, describe un conjunto heterogéneo de trastornos pulmonares distintivos clasificados en función de factores clínicos, radiográficos, fisiológicos o patológicos compartidos (Antoine & Malika, 2023).

La FPI y la NH forman parte de las EPID. Por un lado, la FPI es una enfermedad crónica y mortal caracterizada por la producción incesante de MEC que provoca cicatrices en el tejido pulmonar con el paso del tiempo. En condiciones fisiológicas normales, los fibroblastos producen MEC para facilitar la cicatrización de heridas y posteriormente, sufren apoptosis después del proceso de reparación del tejido. Sin embargo, los miofibroblastos anormalmente activados mantienen su fenotipo resistente a la muerte celular, produciendo cantidades excesivas de MEC y provocando que el tejido se encuentre engrosado y rígido haciendo que sea más difícil que los pulmones funcionen correctamente. Aunque numerosos estudios se han centrado en la FPI, la etiología y su mecanismo no se han establecido completamente (Nie, et al., 2017; Spagnolo, et al., 2022).

La NH es una enfermedad pulmonar intersticial inmunomediada que se caracteriza por NH fibrótica o NH no fibrótica. La fibrosis se asocia con un mal pronóstico, lo que enfatiza la necesidad de biomarcadores para distinguirlos. Por lo general resulta de una reacción inmunomediada provocada por un antígeno inhalado manifiesto u oculto en individuos susceptibles. El progreso de la enfermedad puede evolucionar hacia una fibrosis pulmonar progresiva similar a la de los pacientes con FPI (Selman, et al., 2024; Churg, 2022).

La subfamilia FoxO de factores de transcripción se caracterizan por un dominio de unión al ADN denominado caja forkhead. Así mismo, se han identificado cuatro isoformas de FoxO: FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX) y FoxO6. Entre ellos, FoxO3a es uno de los factores transcripcionales que está involucrado en diversas patologías como la FPI y la NH. Además, estos factores han demostrado desempeñar un papel esencial en diversos procesos biológicos, incluidos el desarrollo, la proliferación, la apoptosis, el metabolismo, la diferenciación y en la defensa contra el estrés oxidativo al regular un amplio espectro de genes (Al-Tamari, et al., 2018; Klotz, et al., 2015).

La apoptosis es la forma preprogramada de muerte celular de la naturaleza. Ocurre durante todo el desarrollo, cuando se reparan los tejidos dañados y como un evento continuo cuando los tejidos se renuevan en el cuerpo humano. La comprensión clásica de este fenómeno es la existencia de un equilibrio, el cual elimina necesariamente células que ya no son necesarias o bien, que ya no son funcionales (Johnson & Ann, 2013).

Se sabe que FoxO3a regula transcripcionalmente la expresión de varios genes diana, como BIM, Noxa, TRAILS, PUMA y FAS ligando en respuesta a diversos estímulos apoptóticos. Sin embargo, en la fibrogenesis de algunas EPID como FPI y NH se ha encontrado que FoxO3a está regulado negativamente, lo que implica su fisiopatología de estas enfermedades (Tamari, et al., 2018).

El papel crucial de FoxO3a parece ser la integración de información de múltiples señales ascendentes, lo que permite a un organismo mantener la homeostasis de sus tejidos en respuesta a varios factores estresantes. Un estímulo apoptótico de la vía intrínseca es la acumulación de ROS en las mitocondrias. El H₂O₂ es una molécula de vida corta que se genera como subproducto de la respiración mitocondrial. Podrían funcionar como mensajeros específicos modificando moléculas diana o cambiando el estado redox intracelular. Los niveles elevados de ROS también pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y membranas intracelulares, lo que provoca estrés oxidativo y altera las funciones celulares (Hagenbuchner, et al., 2012).

Se ha demostrado que la detención del ciclo celular y la inducción de apoptosis dependientes de FoxO3a son importantes para la regulación de la proliferación y supervivencia celular (Tamari, et al., 2018).

En este trabajo de investigación se evaluará el papel de FoxO3a como un regulador en la expresión de genes de carácter proapoptótico en células controles y células obtenidas de biopsias de pacientes diagnosticados con FPI y NH que se someterán a un estímulo estresante, utilizando peróxido de hidrogeno a una concentración de 650 μ M durante 2 horas para provocarles estrés oxidativo, esperando una respuesta para afirmar la hipótesis planteada.

2.Objetivos.

2.1. Objetivo general.

Mostrar que el factor de transcripción FoxO3a es el mediador central de la respuesta al estrés oxidativo en Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI), Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) y líneas celulares control a través de la activación y expresión de genes y proteínas de carácter pro-apoptotico.

2.2. Objetivos específicos.

- Expandir los cultivos de fibroblastos obtenidos por biopsias de pacientes diagnosticados con FPI, NH, y cultivos primarios.
- Estimular los cultivos celulares con H_2O_2 a una concentración de 650 μ M y extraer y el ARN de líneas celulares estimuladas y no estimuladas mediante la técnica de Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Obtener proteínas de lisado total y núcleo/citoplasma de fibroblastos de FPI, NH y líneas control con el estímulo (H_2O_2) y sin el estímulo.
- Evaluar la expresión a nivel gen de FoxO3a, caspasa-3, Bax, Bim y Puma en q-PCR tiempo real utilizando sondas y primers específicos para su amplificación.
- Identificar la expresión a nivel proteína de caspasa-3, Citocromo C y Mn-SOD en fibroblastos de FPI, NH y líneas control mediante Western blot.

3.Hipótesis

El factor de transcripción FoxO3a participa en la activación de genes y expresión de proteínas de carácter proapoptótico con mayor tendencia en líneas celulares estimuladas con H_2O_2 .

4.Marco teórico

4.1. EPID

Son enfermedades que constituyen un grupo heterogéneo de entidades clínicas y patológicas que tienen en común la afectación del intersticio pulmonar, sin embargo, difieren en los mecanismos celulares y moleculares en su patogenia. Existen EPID en las que la alteración predominante es la inflamatoria, como la sarcoidosis y la neumonitis por hipersensibilidad, mientras que, por otro lado, existen enfermedades en las que predomina la fibrogenia, cuyo principal ejemplo es la FPI.

La respuesta celular pulmonar ante un estímulo es variable dependiendo del tipo de agente inductor, del tejido lesionado y de los mediadores implicados. El equilibrio en el sistema de oxidantes y antioxidantes es crucial en la respuesta celular, dado que los radicales de oxígeno y nitrógeno pueden inducir apoptosis epitelial, síntesis de factores de crecimiento y citocinas que amplifican la respuesta inflamatoria y fibrótica. Este equilibrio en las EPID se encuentra alterado (Xaubet, et al., 2007).

4.2. FPI

La FPI es una forma específica de neumonía intersticial fibrosante, limitada a los pulmones. Se caracteriza por una remodelación difusa y progresiva del parénquima pulmonar y se asocia con daño tisular persistente y/o grave y estrés celular. La falta de contención o eliminación adecuada de los factores desencadenantes puede exacerbar la inflamación y las respuestas crónicas de cicatrización de heridas, lo que resulta en daño tisular continuo y regeneración inadecuada. Aunque su etiología y mecanismos casuales difieren, las diversas enfermedades fibróticas tienen todas una acumulación anormal y exagerada de componentes de la matriz extracelular (Pardo, et al., 2017; Undurraga, 2015).

Las células activadas dentro de los alveolos liberan una gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento que promueven el reclutamiento, la proliferación y la diferenciación de los fibroblastos pulmonares en miofibroblastos, lo que lleva a un depósito excesivo de colágena, cicatrización progresiva del parénquima pulmonar y pérdida irreversible de su función (Spagnolo, et al., 2022).

4.2.1. Epidemiología

La FPI es una enfermedad rara, irreversible y progresiva de los pulmones que afecta aproximadamente 5 millones de personas en todo el mundo y se asocia con una supervivencia media de 3 a 5 años. La FPI está altamente relacionada con la edad avanzada y es más prevalente en hombres con una proporción entre hombres y mujeres que generalmente se acerca a 2:1, así mismo aumenta la prevalencia en individuos con edad avanzada y en pacientes con síndromes que promueven un fenotipo de envejecimiento celular, como las personas con mutaciones en los componentes de la telomerasa (Selman, et al., 2023; Undurraga, 2015).

Casi el 45% de las muertes en el mundo desarrollado son atribuibles a algún tipo de enfermedad fibroproliferativa crónica, incluida la FPI. La naturaleza progresiva de esta enfermedad y la ausencia de tratamientos efectivos hacen necesaria una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que contribuyen al desarrollo de la fibrosis (Pardo, et al., 2017).

4.2.2. Factores de riesgo

La FPI es el resultado de una interacción compleja de factores de riesgo genéticos y ambientales, procesos asociados al envejecimiento y reprogramación epigenética, que resultan cambios profundos en las células epiteliales alveolares y fibroblastos. Muchos fenómenos relacionados con el envejecimiento probablemente desempeñan un papel en el riesgo de enfermedad, incluido el acortamiento de los telómeros la inestabilidad genómica y las mutaciones epigenéticas (Pardo, et al., 2017; Meyer, 2017).

Las células de humanos envejecidos y organismos modelo acumulan mutaciones somáticas en el ADN nuclear. Otras formas de daño, como la aneuploidía cromosómica y las variaciones en el número de copias, también están asociadas con el envejecimiento. Todas estas alteraciones del ADN pueden afectar a genes esenciales y vías transcripcionales, dando como resultado células disfuncionales que pueden finalmente comprometer la homeostasis tisular y del organismo. Esto es especialmente relevante cuando el daño del ADN afecta a las células madre, obstaculizando su papel en la renovación tisular o llevando a su agotamiento, a lo que a su vez promueve al envejecimiento y aumenta la susceptibilidad a patologías relacionadas con la edad. El Daño del ADN en el extremo de los cromosomas (telómeros) contribuye al envejecimiento y a las enfermedades asociadas a la edad. Las polimerasas de ADN replicativas no pueden completar la copia de las regiones teloméricas del ADN eucariota. En consecuencia, después de varias rondas de división celular, los telómeros experimentan un acortamiento sustancial que induce inestabilidad genómica y finalmente conduce a la apoptosis o la senescencia celular. Hay varios ejemplos en los que el desgaste de los telómeros atenúa la carcinogénesis al limitar la vida útil replicativa de las células malignas. Por esta razón, se considera que la atrofia de los telómeros es un sello distintivo del envejecimiento. La deficiencia de la telomerasa en humanos se asocia con el desarrollo prematuro de enfermedades como la fibrosis pulmonar (López, et al., 2023).

En los últimos 10 años, los estudios de secuenciación de todo el genoma se han convertido en una de las herramientas más poderosas disponibles para identificar el *locus* genómico involucrado en la FPI. Variantes codificantes raras, heterocigotas y nocivas de la línea germinal en genes asociados con la biología de los telómeros, como *TERT* (transcriptasa inversa de telomerasa, por sus siglas en inglés), *TERC* (componente de ARN de telomerasa), *RTEL1* (regulador de la helicasa 1 de elongación de telómeros) y *PARN* (RNasa específica de poli A), se han identificado como fuertes factores de riesgo de FPI ya que afectan la longitud de los telómeros (Selman & Pardo, 2024).

4.2.3. Patogenia de la enfermedad

La historia natural de la FPI ha sido explicada como una disminución intrínseca continua de la función pulmonar con alto índice de mortalidad, generada por una insuficiencia respiratoria crónica y/o asociada a comorbilidades (Maliza & Arias, 2023).

La FPI se caracteriza por la presencia de fibroblastos/miofibroblastos hiperproliferativos y un mayor depósito de MEC. Los fibroblastos representan las células efectoras clave en la cicatrización de heridas, donde secretan proteínas de la MEC que proporcionan un soporte tisular para los procesos de reparación normales. La eventual apoptosis de fibroblastos/miofibroblastos es fundamental para la restauración de la arquitectura normal del tejido (Tamari, et al., 2018).

En los pulmones sanos, las células AT1 son los principales mediadores del intercambio de gases y proporcionan la mayor parte de la superficie epitelial. Las células AT2 sirven como progenitores primarios de las células AT1 lesionadas, por ende, la lesión del alveolo requiere de una población sana y funcional de células AT2

regenerativas. En los pulmones con FPI, difícilmente hay una capacidad de renovación por parte de las células AT2. Una combinación de factores extrínsecos e intrínsecos, incluido el envejecimiento, el estrés del retículo endoplásmico, la disfunción mitocondrial y el acortamiento de los telómeros, conduce a una incapacidad de la célula AT2 para contribuir a la reparación eficaz del epitelio lesionado (Moss, et al., 2022).

Por otro lado, se ha demostrado que se producen varios factores de crecimiento que influyen en las funciones de los fibroblastos y miofibroblastos en el tejido pulmonar de pacientes con FPI. El TGF- β ha demostrado que es un mediador crítico de la fibrosis pulmonar en modelos animales, ya que su sobreexpresión conlleva a la producción de fibrosis progresiva. Además, otro de los factores involucrados en la patogénesis de la FPI, es el IGF-1 que promueve la supervivencia de los fibroblastos y miofibroblastos. Se ha demostrado que IGF-1 inhibe la apoptosis activando la vía Akt, lo que puede tener consecuencias importantes para el mantenimiento de un entorno profibrótico (Noble, et al., 2004).

4.2.4. Apoptosis y proliferación de células epiteliales

En los últimos años la literatura sugiere que la lesión y la apoptosis de las células AT2 pueden ser una característica temprana importante en la patogénesis en la FPI. Los estudios de Kuwano y colaboradores demostraron una mayor expresión de proteínas proapoptóticas en células epiteliales alveolares y lavado bronco alveolar de pacientes con FPI. Además de que existe un aumento del estrés oxidativo en el epitelio alveolar en estos pacientes (Kuwano, et al., 2002; Noble, et al., 2004).

La prueba de los experimentos principales que utilizan el modelo de lesión pulmonar y fibrosis inducida por la bleomicina en modelos animales también ha sugerido que la inhibición de la apoptosis de las células epiteliales, incluida la inhibición de la vía del ligando Fas y el bloqueo de la activación de la caspasa, anulan el desarrollo de fibrosis experimental (Kuwano, et al., 2000; Kuwano, et al., 2001).

Además, se ha demostrado un mecanismo adicional propuesto para explicar la apoptosis de las células epiteliales debido al aumento en la producción de oxidantes y una deficiencia de glutatión en la FPI (Noble, et al., 2004).

4.2.5. Angiogénesis y angiostasis

Keane y colaboradores han definido el concepto de que un aspecto importante de la fibrosis progresiva es la actividad angiogénica. Se ha demostrado una mayor actividad angiogénica en el tejido pulmonar de la FPI y la fibrosis experimental. Este aumento de la actividad angiogénica se ha atribuido a un desequilibrio de las quimiocinas proangiogénicas (IL-8, ENA-78) y de las quimiocinas antiangiogénicas de la subfamilia CXC, la IP-10. La IP-10 es inducida por el INF- γ , y diversos estudios han sugerido que el INF- γ inhibe la fibrosis pulmonar progresiva. En contraste, el concepto de que la FPI progresiva se asocia con una mayor angiogénesis, hay informes de una disminución de la expresión del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares en la FPI (Keane, et al., 1997; Noble, et al., 2004).

4.3. NH

La NH es un subtipo de EPID. Es una patología desencadenada por una gran variedad de materiales orgánicos e inorgánicos (“inductores”) en individuos susceptibles. La enfermedad tiene una presentación clínica heterogénea y patrones radiológicos e histopatológicos basados en la interacción de los factores de susceptibilidad del huésped individual, el tipo y grado de exposición y las características biológicas del material inductor. La exposición puede ocurrir desde el lugar de trabajo donde labora hasta los lugares que visite la persona, y cuya duración varía de días a semanas, meses o más (Vasakova, et al., 2019).

4.3.1. Epidemiología de la NH

La prevalencia varía considerablemente en todo el mundo, los métodos de diagnóstico, el tipo y la intensidad de la exposición, las condiciones geográficas, las prácticas agrícolas e industriales y los factores de riesgo del huésped. La prevalencia de la NH es incierta, principalmente porque los casos pueden pasar desapercibidos o diagnosticarse erróneamente. En un estudio general, la incidencia de NH fue de aproximadamente 1 por 100,000 en la población del Reino Unido (Selman, et al., 2012).

4.3.2. Fisiopatología de la NH

La fisiopatología y la progresión de la NH dependen de la duración y el tipo de exposición y de la respuesta inflamatoria del huésped. La predisposición genética, combinada con factores ambientales, puede producir una respuesta inmune sólida y significativa en los pulmones. El aumento de la expresión de citocinas Th1, TNF-alfa, IL-12, interferón gamma y la respuesta de las células dendríticas mediada por el receptor 9 tipo toll, parece estar implicado en la respuesta inmune al antígeno inflamatorio (**Figura 1**). Puede ser difícil identificar el agente etiológico que desencadena la respuesta inmune del huésped (Anwar, et al., 2022).

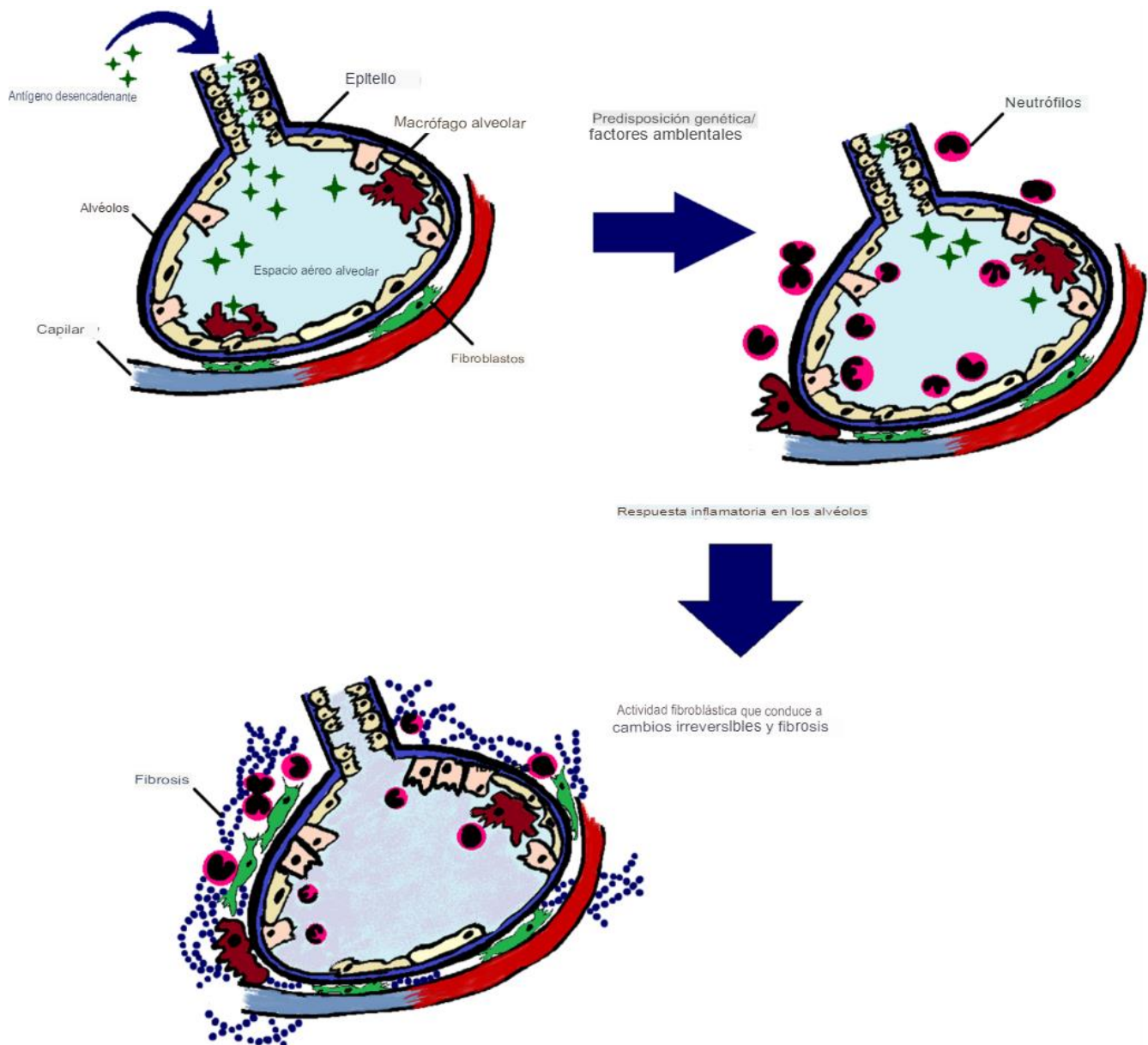


Figura 1. Mecanismos propuestos en la patogénesis de la neumonitis por hipersensibilidad. Esta imagen ilustra la interacción de factores genéticos y ambientales, la respuesta inflamatoria en los alveolos y la actividad fibroblástica que conduce a cambios irreversibles y fibrosis (Anwar, et al., 2022).

4.3.3. Causas de la NH

Los agentes desencadenantes infecciosos, orgánicos e inorgánicos comunes, que van desde los más comunes hasta los menos comunes, se detallan en la **Tabla 1**. La exposición recurrente provoca una inflamación persistente y, en consecuencia, la progresión de la enfermedad conduce hacia la fibrosis pulmonar (Anwar, et al., 2022).

Tabla 1. Agentes desencadenantes de la NH (Anwar, et al., 2022).

<i>Causas</i>	<i>Fuente</i>
<i>Infecioso</i>	<p>-Bacterias: Acinetobacter spp., Klebsiella spp., Pseudomonas spp., Stenotrophomonas spp., Streptomyces spp., endotoxinas del agua de la piscina.</p> <p>-Hongos/mohos: Aspergillus spp., Cyptococcus spp., Fusarium spp., Mucor spp.</p> <p>-Levaduras: Candida spp., Geotrichum candidum, Torulopsis glabrata.</p> <p>-Protozoos: Amebas.</p> <p>-Hongos comestibles: Shiitake, Pleurotus, Pholiota, Agaricus.</p>
<i>Agentes orgánicos</i>	<p>-Proteínas animales: polvo de pieles animales, excrementos/plumas de aves, murciélagos, leche de vaca, harinas para peces, proteínas de conchas (ostras, caracoles marinos, mejillones).</p> <p>-Proteínas vegetales: Harina de cereales (trigo, centeno, avena, maíz), malta, legumbres, pimentón, alginato, espinacas, chufa, madera.</p>
<i>Agentes inorgánicos</i>	<p>-Productos químicos: anhídridos de ácido, compuestos de acrilato, sulfato de cobre, cloroetileno, isocianatos, ácido tetracloroftálico, diazobenceno sódico.</p> <p>-Productos farmacéuticos: Penicilinas, cefalosporinas, metotrexato, interferón alfa, lenalidomida, pravastatina, temozolamida.</p> <p>-Metales: Cobalto, zinc, circonio, berilio.</p>
<i>Predisposición genética</i>	<p>Polimorfismo genético implicado en el procesamiento de moléculas y presentación de antígenos externos.</p> <p>-Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II</p>

-Polimorfismo de genes potencialmente implicados en la homeostasis pulmonar, la reparación de heridas y mutaciones genéticas relacionadas con los telómeros.

4.3.4. Respuesta fibroproliferativa

Los pacientes con NH pueden evolucionar hacia una fibrosis pulmonar progresiva similar a la de los pacientes con FPI. Los mecanismos no se han dilucidado completamente, pero pueden incluir, entre otros, senescencia prematura y la presencia de variantes genéticas, lo que resulta en el reclutamiento de fibrocitos diferenciándose en fibroblastos provocando una excesiva producción de MEC y un desequilibrio de citoquinas reguladoras (Vasakova, et al., 2019).

4.3.5. NH y su relación con el factor de transcripción FoxO3a

El TGF- β es una citocina polipeptídica multifuncional, tiene un papel fundamental en el desarrollo embrionario temprano y la homeostasis del adulto. En los últimos años, los científicos han propuesto que el TGF- β sobre expresado causa una gran cantidad de trastornos y disfunciones metabólicas, y promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT) y el depósito excesivo de MEC, lo que causa disfunción inmune, y es un factor importante de la neumonitis por hipersensibilidad para desencadenar la fibrosis y distintos tipos de cáncer (Peng, et al., 2022).

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).

4.4. FOXO

Los FoxO pertenecen a una familia de reguladores transcripcionales caracterizados por un dominio de unión al ADN conservado denominado “caja forkhead”. En mamíferos, se han identificado cuatro isoformas de FoxO: FoxO1, FoxO2, FoxO3, FoxO4 y FoxO6. Entre ellos, se ha demostrado que FoxO3 desempeña un papel esencial en diversos procesos biológicos, incluidos el desarrollo, la proliferación, la apoptosis, el metabolismo y la diferenciación, al regular un amplio espectro de genes (Seonghun & Herget, 2014).

Recientemente, se ha estudiado a FoxO3a como una proteína crucial que participa en la regulación de varias funciones celulares esenciales. Sin embargo, estudios previos, han demostrado que FoxO3a funciona como un supresor de tumores al regular la expresión de genes implicados en la apoptosis, la detención del ciclo celular y la autofagia (**Figura 2**).

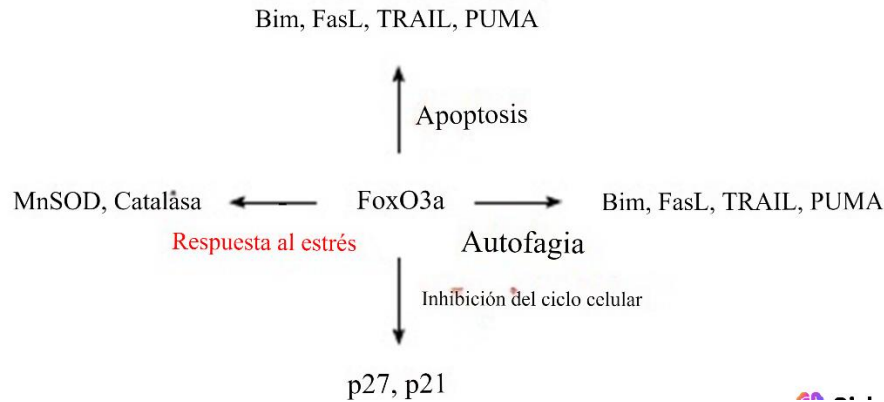


Figura 2. Genes diana del factor de transcripción FoxO3a. FoxO3a se une al promotor de genes inductores de apoptosis, como *Bim*, *FasL* y *TRAIL*, y al promotor de inhibidores del ciclo celular, como *p27* y *p21*. FoxO3a también activa los genes de autofagia *Gabarapl1*, *ATG12*, entre otros más. Un estudio reciente demostró que FoxO3a también participa en la activación de genes de respuesta al estrés oxidativo, como *MnSOD* y *catalasa* (Seonghun & Herget, 2014).

4.4.1 Regulación de FoxO

Las PTM son el proceso fundamental para la regulación de las funciones de las proteínas que provocan cambios en su ubicación subcelular, vida media molecular, afinidad de unión al ADN e interacción con otras proteínas celulares. Los PTM comunes incluyen fosforilación, acetilación, metilación, ubiquitinación, glicosilación, sulfatación, entre otras. El principal mecanismo de regulación de la actividad de FoxO3a y sus genes diana es controlar la translocación de FoxO3a entre el núcleo y el citoplasma, lo que puede lograrse mediante una serie de quinasas. En el núcleo, FoxO3a es acetilado por otras proteínas como p300, la CBP y desacetilado por SIRT1 y SIRT2. Curiosamente, la desacetilación mediada por SIRT1 cambia la afinidad de unión al ADN de FoxO3a, mientras que la desacetilación por SIRT2 aumenta su actividad de unión al ADN (Liu, et al., 2018).

Se ha demostrado que múltiples vías regulan la actividad de FoxO, principalmente mediante la modificación de FoxO y las proteínas 14-3-3 en sitios específicos promueven o no, la relocalización de FoxO desde el núcleo al citoplasma o viceversa. La fosforilación de FoxO por la vía PI3K / Akt es un proceso típico que conduce a la inactivación de FoxO. La fosforilación de FoxO promueve su interacción con 14-3-3, lo que resulta en la translocación de FoxO desde el núcleo al citoplasma y una disminución de actividad transcripcional. En el citoplasma, FoxO es más susceptible a la degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma (Xin, et al., 2018).

En respuesta al estrés oxidativo, FoxO3a es fosforilado por varias quinasas que promueven su acumulación nuclear y la expresión de enzimas eliminadoras de ROS. En particular, MST1 es una quinasa de las vías de señalización JNK y p38 AMPK (quinasa activada por AMP) (**Figura 3**), cuya expresión induce cambios morfológicos proapoptóticos en células estresadas. MST1 promueve dos eventos a través de la activación de caspasas, desencadenando la apoptosis a través de la vía mitocondrial, promoviendo la condensación de la cromatina. Por otra parte, la desacetilación de FoxO3a ejerce un efecto citoprotector dependiente de las células al inhibir los genes proapoptóticos y aumentar la expresión de GADD45 α , MnSOD y p27, que son objetivos de FoxO3a implicados en la detención del ciclo celular, la reparación del ADN y la actividad antioxidante. Cabe destacar que la acetilación de FoxO3a promueve la apoptosis al favorecer la expresión de genes diana proapoptóticos como BIM, p21 y FAS ligando 6 (Fasano, et al., 2019).

ESTRÉS ENERGÉTICO

ESTRÉS OXIDATIVO / GENOTÓXICO

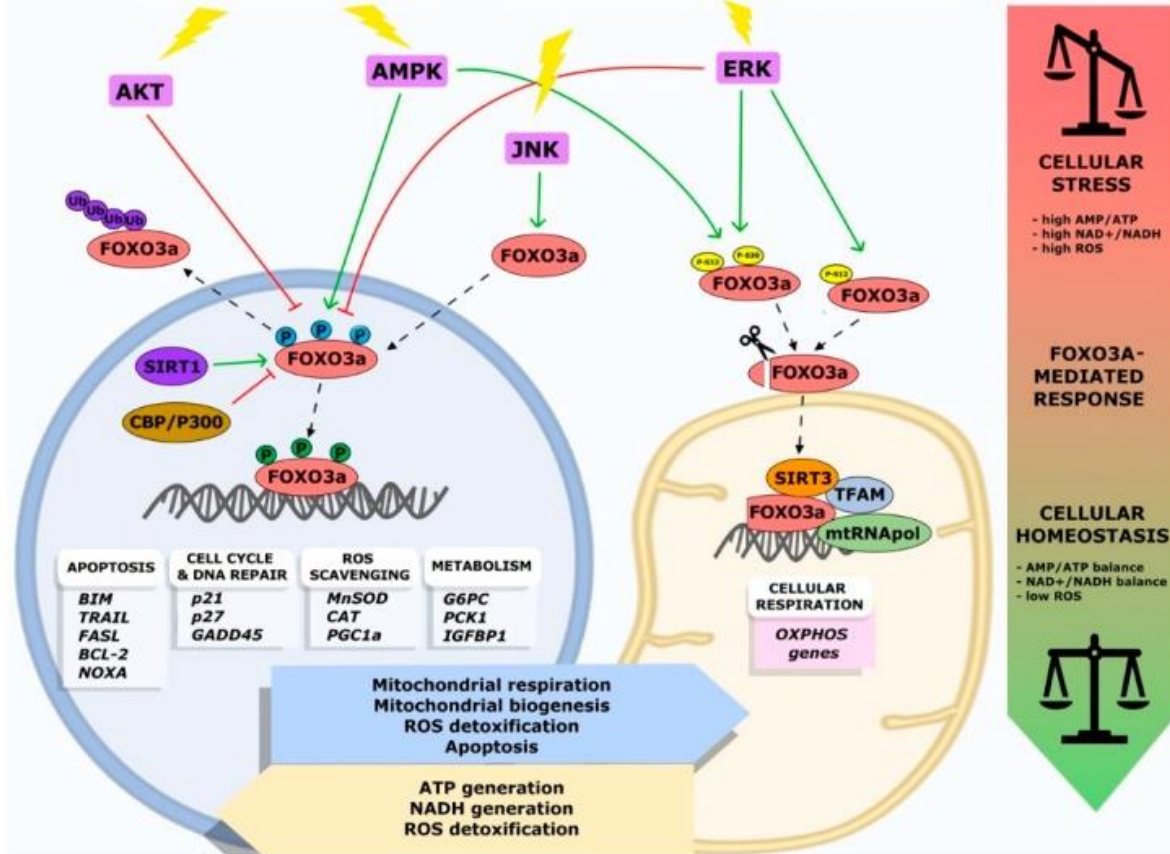


Figura 3. Representación esquemática de la respuesta al estrés mediada por FoxO3a. Las perturbaciones de la homeostasis celular como la escasez de nutrientes, la alta concentración de ROS intracelulares o el estrés genotóxico, activan los sensores de estrés de FoxO3a (cuadros morados), que a su vez modulan la localización y/o actividad subcelular de FoxO3a a través de diversas PTM. (Las flechas verdes representan las señales de activación, mientras que las líneas con barras rojas representan efectos inhibidores). En el citoplasma, FoxO3a está inactivo y es el objetivo de la poliubiquitinación, lo que conduce a su mayor degradación proteosómica. Los OXPHOS implicados en la supervivencia celular (Fasano, et al., 2019).

4.4.2. Función FoxO3a

4.4.2.1. Proliferación celular y apoptosis

Son quizás los dos procesos más importantes regulados por el factor de transcripción FoxO que son la supresión de la progresión del ciclo celular y la promoción de la apoptosis. La activación de FoxO3a aumenta las proteínas inhibitoras del ciclo celular p21 y p27, las cuales posteriormente suprimen la transición del ciclo

celular de G1 a S. Así mismo, FoxO3a también aumenta la expresión de varios genes diana, como *Bim*, *TRAIL*, *PUMA* y el ligando *Fas*, que promueven la apoptosis celular. Por ejemplo, FoxO3a se une directamente a la región promotora *Bim*, provocando la muerte de las células de las neuronas simpáticas (Dickinson & Chang, 2012).

4.5. Estrés oxidativo y ROS

El estrés oxidativo es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la salud y las enfermedades humanas. Las redox controla casi todos los aspectos de la vida aeróbica y de nuestro metabolismo. Por lo tanto, las ROS pueden producirse de forma natural o debido a alguna disfunción biológica, como durante la actividad física intensa, la exposición a infecciones microbianas, etc. Las ROS son a menudo las pequeñas moléculas responsables de mediar las modificaciones redox de diversas biomoléculas y prevalecen en enfermedades que van desde el cáncer hasta las enfermedades neurodegenerativas y la diabetes (Simoès, et al., 2023).

Históricamente se creía que las ROS funcionaban exclusivamente como agentes de daño celular reaccionando indiscriminadamente con lípidos, proteínas y ADN. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha incrementado el estudio sobre el papel de ROS como mediadores de señalización celular, regulando numerosas respuestas fisiológicas (Peng, et al., 2022).

ROS abarcan una familia de moléculas pequeñas, cada una de ellas es a menudo de importancia crítica para determinar tanto su reactividad química como su respuesta biológica. Tales son, O_2^- , H_2O_2 , $HClO$, O_2 , $ROOH$, O_3 y OH^- ; son algunos de los principales ROS en los sistemas vivos. La versatilidad de estas moléculas en cuanto a sus propiedades y movilidad dentro de las células es una de las ventajas significativas que se cree que es responsable de la conservación evolutiva de este tipo de señalización (Dickinson & Chang, 2012).

4.5.1. FoxO3 y estrés oxidativo

FoxO3 tiene un papel bien establecido en la regulación de la expresión de muchos antioxidantes, incluida la CAT, Zn- y Mn-SOD, las PRDX3 y PRDX5 y GPx. Por lo tanto, proteger a las células del estrés oxidativo mediante el aumento de los eliminadores de ROS contribuye a extender la vida útil del organismo. Además, FoxO3 puede actuar promoviendo la inhibición del crecimiento celular (al mejorar la expresión de varios inhibidores de CDK) o la apoptosis (los genes proapoptóticos se activan) cuando se encuentra bajo estrés oxidativo intenso. Por lo tanto, esto demuestra que la activación de la transcripción dependiente de FoxO3a en respuesta al estrés oxidativo depende de la gravedad del estímulo (**Figura 4**) (Simoès, et al., 2023).

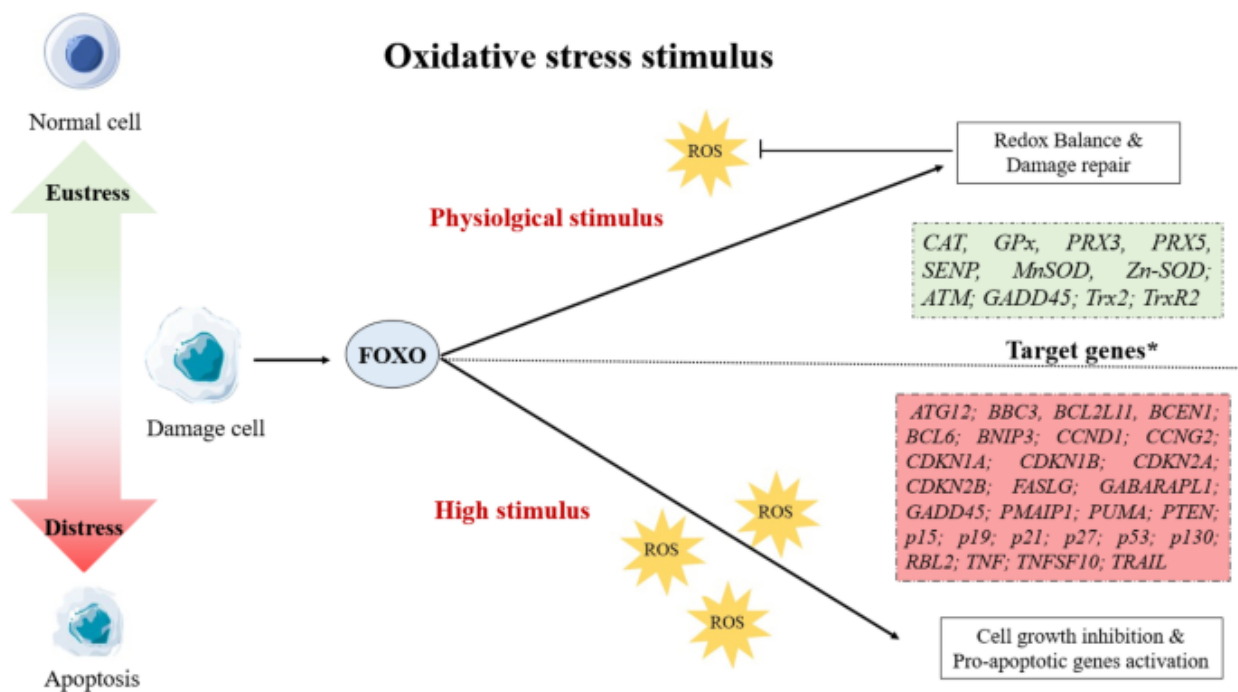


Figura 4. FoxO y estrés oxidativo. La actividad de las proteínas FoxO se controla diferencialmente en tejidos específicos según la intensidad del estrés oxidativo (estímulos externos) mediante la modificación de los niveles de proteínas, la localización subcelular, la unión al ADN y la actividad transcripcional de FoxO. En casos de estímulos de estrés oxidativo medio, las proteínas FoxO median mecanismos celulares protectores al aumentar la expresión de captadores de ROS. Por otro lado, bajo estímulos de estrés oxidativo elevado, FoxO promueve la inhibición del crecimiento celular o la apoptosis.

4.6. Apoptosis

La mayor parte de los tejidos de la economía corporal tienen una capacidad regenerativa para el adecuado mantenimiento de su función. El ciclo celular y la apoptosis son dos mecanismos que regulan la homeostasis dentro del organismo. Este último mecanismo es un proceso indispensable ya que, de manera contraria a la necrosis, es un mecanismo activo dependiente de energía, genéticamente determinado. La apoptosis puede ser mediada por diversas vías de señalización molecular bajo un estricto control regulador, ya que la desregulación de tales señalizaciones se asocia al desarrollo de enfermedades autoinmunes y cáncer (Ramírez, et al., 2014).

4.6.1. Vías de la apoptosis

En los mamíferos, la apoptosis puede ser iniciada por diferentes vías; una de ellas dada por estímulos (promuerte) como la activación excesiva de oncogenes, daño a ADN o liberación de proteínas efectoras. La otra vía se da en respuesta a estímulos extrínsecos, por ejemplo, la unión de los ligandos *Fas* y *TNF-alfa* a los receptores de superficie como parte de la fase efectora de la respuesta inmune (Ramírez, et al., 2014).

Una vez dada la señal hacia muerte, la célula será desintegrada por un grupo de proteasas mantenidas en forma de zimógenos, denominadas caspasas debido a la presencia de cisteína en su sitio catalítico y su

especialidad para escindir residuos de aspartato. Una vez activadas, estas proteínas pueden activar a otras procaspasas, lo que permite el inicio de una cascada de proteasas. Esta cascada proteolítica, en la que una caspasa puede activar a otras caspasas, amplifica la vía de señalización apoptótica y, por tanto, conduce a una rápida muerte celular. Hasta la fecha, se han identificado diez caspasas principales y se han categorizado ampliamente en iniciadoras (caspasa-2,-8,-9,-10), efectoras o ejecutoras (caspasa-3,-6,-7) y caspasas inflamatorias (caspasa-1,-4,-5). Las otras caspasas que se han identificado incluyen la caspasa-11, que regula la apoptosis y la maduración de citoquinas durante shock séptico, la caspasa-12, que media la apoptosis endoplásmica específica; caspasa-13, que se sugiere que es un gen bovino y, caspasa-14, que se expresa altamente en tejidos embrionarios, pero no en tejidos adultos (Elmore, 2007).

4.6.1.1. Vía de apoptosis extrínseca

Es también conocida como apoptosis mediada por receptores de muerte. Es iniciado el mecanismo por esta vía a partir de señales extracelulares, que son reconocidas por dichos receptores en la membrana plasmática (**Figura 4**).

Esta señal iniciadora puede provenir del medio ambiente, el sistema inmunológico o de las células vecinas. Los ligandos de muerte, como el Fas ligando, TNF o el TRAIL son reconocidos por sus respectivos receptores de muerte específicos de la superficie celular, el FasR (receptor de TNF-1 y 2 (TNF 1/2) y receptores TRAIL-DR4 y DR5. Tras la unión al ligando se reclutan proteínas adaptadoras citoplasmáticas que exhiben los dominios de muerte correspondientes que se unen a los receptores. La unión del ligando Fas al FasR da como resultado la unión de la proteína adaptadora FADD y la unión del ligando de TNF al receptor de TNF (TNF-alfa/TNF-1) da como resultado la unión de la proteína adaptadora TRADD con reclutamiento de FADD. Luego, FADD se asocia con la pro-caspasa-8 mediante la dimerización del dominio efector de muerte. En este punto se forma el DISC, que da como resultado la activación autocatalítica de la pro-caspasa-8. Una vez que se activa la caspasa-8, se desencadena la fase de ejecución de la apoptosis (Elmore, 2007).

4.6.1.2. Vía de apoptosis intrínseca

Es también conocida como vía mitocondrial de la apoptosis, la célula detecta factores estresantes intracelulares (es decir, factor de crecimiento o privación de nutrientes, daño en el ADN y estrés en el retículo endoplásmico y se destruye a sí misma mediante un proceso que implica la MOMP (**Figura 4**). Cuando se produce MOMP, las mitocondrias liberan citocromo C desde el espacio intermembrana hacia el citoplasma. El citocromo C se une y promueve la oligomerización del APAF-1 en una forma heptamérica. APAF-1 contiene un CARD que interactúa con el CARD de la pro-caspasa-9 para formar el apoptosoma, un complejo masivo compuesto por citocromo C, APAF-1 y pro-caspasa-9 (Ketelut & Fitzgerald, 2022).

Dentro del apoptosoma, el iniciador de la apoptosis, la pro-caspasa-9 se activa a caspasa-9 y escinde la pro-caspasa-3 y la pro-caspasa-7, desencadenando sus funciones ejecutoras apoptóticas.

La apoptosis intrínseca y extrínseca comparten componentes comunes de la vía: las caspasas efectoras 3 y 7, las cuales se encuentran en el extremo terminal de la cascada de caspasas. La activación de las caspasas-3 y -7

da como resultado los rasgos morfológicos característicos de la apoptosis. Estas caspasas escinden una serie de sustratos, incluidos la poli-ADP ribosa polimerasa, la proteína quinasa I asociada a Rho, la ATPasa 11A/C y el inhibidor de la ADNasa activada por caspasa. La caspasa-3 y la caspasa-7 activan la escramblasa, proteína responsable de la translocación de fosfolípidos entre las dos monocapas de una bicapa lipídica de una membrana celular provocando la exposición de PtdSer (un fosfolípido que actúa como señal de “cómeme”) en la capa externa de la membrana celular (**Figura 5**).

En el paso final de la ejecución apoptótica, se requiere la activación de la caspasa-3 para la formación de ampollas en la membrana plasmática. Finalmente, el ADN y los organelos de la célula se fragmentan en pedazos pequeños.

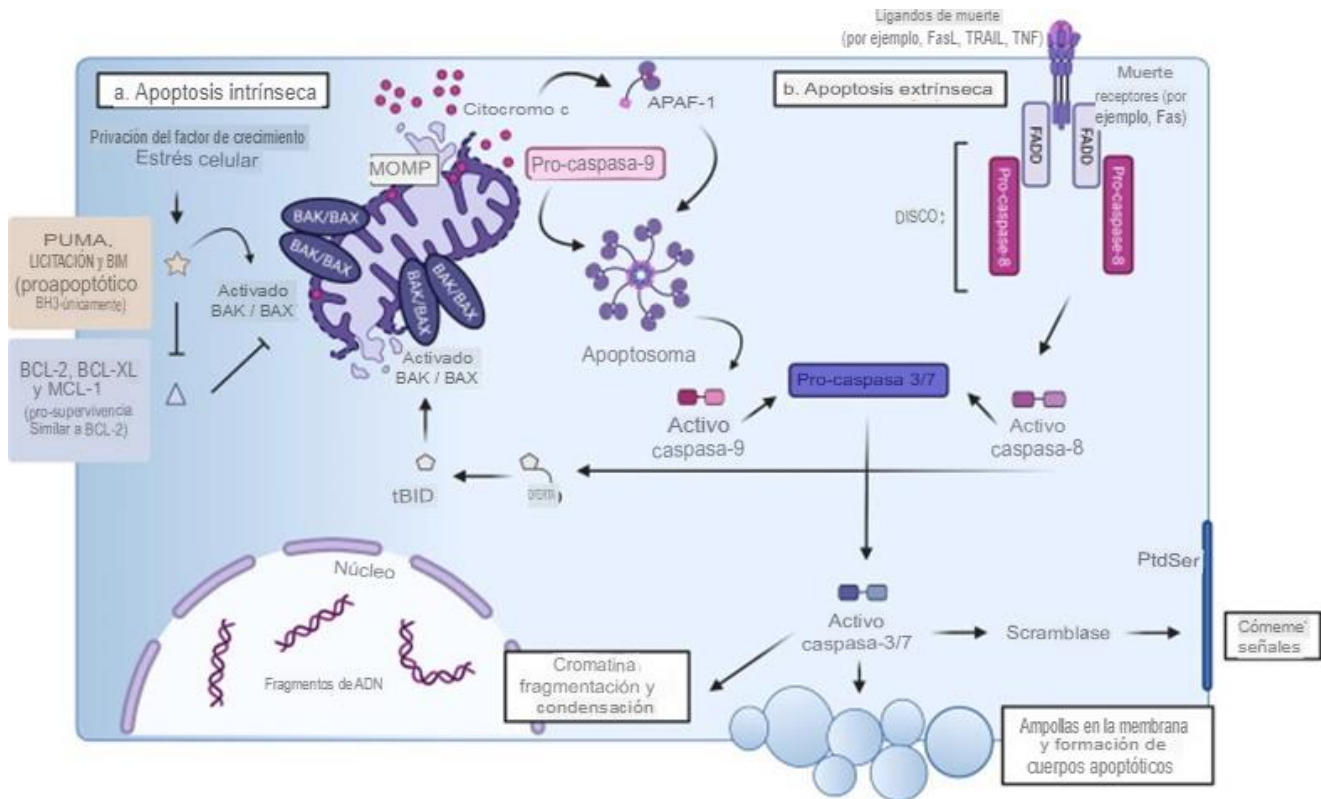


Figura 5. Mecanismos moleculares de muerte celular apoptótica. (a) En la vía de apoptosis intrínseca, iniciada por la privación del factor de crecimiento y el estrés celular, las proteínas BCL-2 prosupervivencia (como BCL-2, BCL-XL y MCL-1) son bloqueadas por PUMA, BID, y BIM, miembros proapoptóticos de la familia BCL-2, llamadas proteínas exclusivas BH3. Esta inhibición libera los efectores críticos de la apoptosis, BAK y BAX, que a su vez se activan y se ensamblan en grandes complejos que provocan la MOMP y la liberación de citocromo C. El citocromo, mediante la unión al APAF-1, forma el apoptosoma, que activan una cascada de caspasas que comienzan con la caspasa-9, que activa las caspasas efectoras -3 y -7. (b) En la vía de la apoptosis extrínseca, el reconocimiento del ligando FAS por parte de FAS, recluta a la pro-caspasa-8 a través de la FADD para formar el DISC. DISC cataliza la activación de caspasa-8. Una vez activada la caspasa-8, induce la muerte celular, ya sea directamente activando las caspasas efectoras -3 y -7 o indirectamente, escindiendo la proteína BID exclusiva de BH3 en tBID y activando la vía apoptótica intrínseca. Las caspasas efectoras activadas por cualquiera de las vías producen la morfología apoptótica típica. Entre estos cambios morfológicos, las caspasas promueven la fragmentación del ADN y la exposición de PtdSer en la capa externa de la membrana celular de una célula moribunda (para actuar como señal de “cómeme” para las células fagocíticas). También reorganizan los filamentos de actina para provocar la formación de ampollas en las membranas y favorecer la formación de cuerpos apoptóticos (Ketelut & Fitzgerald, 2022).

Un estímulo apoptótico de la vía intrínseca es la acumulación de ROS en las mitocondrias. Algunos como el peróxido de hidrogeno, el anión superóxido o los radicales hidroxilo se generan como subproductos de la respiración mitocondrial. Podrían funcionar como mensajeros específicos modificando moléculas diana o cambiando el estado redox intracelular. Los niveles elevados de ROS también pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y membranas intracelulares, lo que provoca estrés oxidativo y altera las funciones celulares. En condiciones normales, los niveles bajos de ROS se eliminan mediante el metabolismo del glutatión, enzimas eliminadoras como SOD2 (Mn-SOD2) y CAT, peroxisomas o por miembros de la familia de las sestrinas. La enzima mitocondrial MnSOD convierte O_2 en H_2O_2 , que luego se convierte en H_2O y O_2 por la catalasa. MnSOD y CAT son objetivos transcripcionales de FoxO3. Una defensa antioxidante insuficiente da como resultado altos niveles de ROS, que dañan gravemente la célula y provocan cambios en los niveles celulares de ATP y Ca^{2+} . Esto eventualmente conduce a la liberación de citocromo C y a la inducción de apoptosis (Dickinson & Chang, 2012).

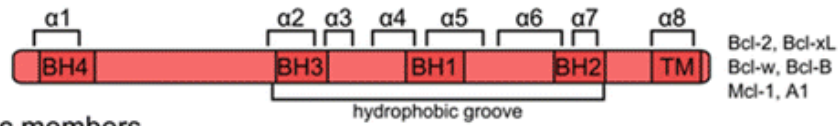
4.7. Familia de proteínas Bcl-2

Bcl-2 es una familia de proteínas encargada de que una célula muera o sobreviva controlando la apoptosis mitocondrial. Bcl-2 se identificó por primera vez en 1984 como una proteína oncogénica que se sobre expresaba en linfomas de células B. Posteriormente, los análisis de secuencia indicaron que BCL-2 fue el primer miembro descubierto de una gran familia de proteínas que desempeñan un papel importante en la regulación de la muerte celular. De hecho, las alteraciones de su función están implicadas en importantes problemas relacionados con el cáncer, como la tumorigénesis o la quimio resistencia, y apuntar a estas proteínas es un enfoque prometedor para la terapia contra el cáncer (Dejean & Manon, 2017).

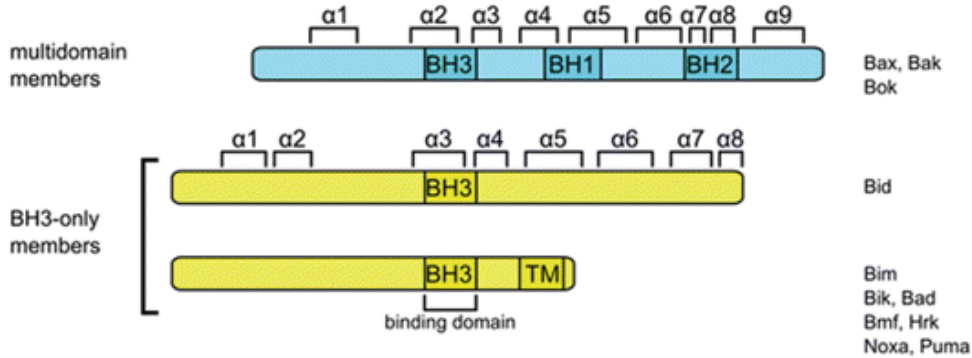
Los miembros de la familia Bcl-2 están presentes en todo el reino animal. A continuación, se presenta un resumen de las principales características estructurales de las proteínas de la familia Bcl-2 (**Figura 6**)

Functional/structural classification

Antiapoptotic members

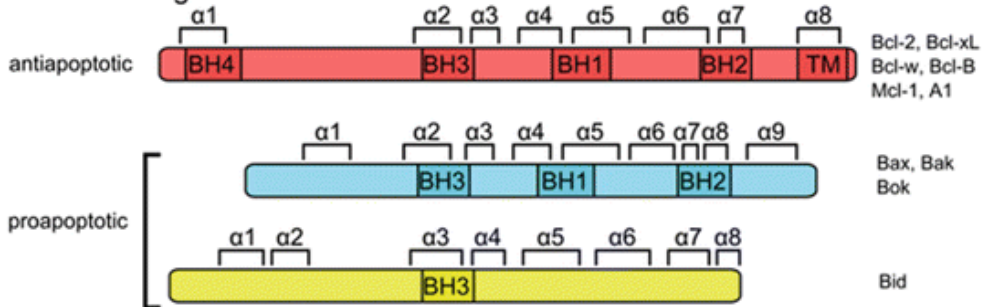


Proapoptotic members



Phylogenetic classification

Bcl-2 homologs



Canonical BH3-domain



Non-canonical BH3-domain

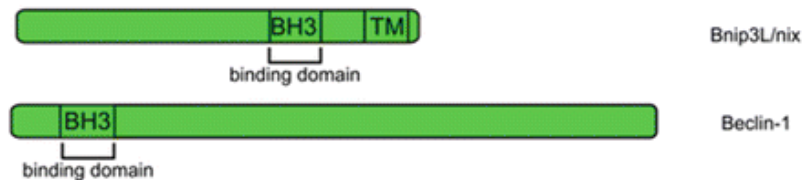


Figura 6. Clasificaciones de miembros de la familia Bcl-2. Se caracterizaron por la presencia de dominios BH y se subcaracterizaron por su función. Las proteínas antiapoptóticas contienen un surco hidrofóbico que pueden interactuar con los dominios BH3 de las proteínas proapoptóticas. Las proteínas proapoptóticas multidominio comparten características estructurales con las proteínas antiapoptóticas. Las proteínas exclusivas de BH3 pueden interactuar con proteínas antiapoptóticas, inhibiéndolas (Bad, Noxa), o con proteínas proapoptóticas, activándolas (tBid, Bim, Puma). Las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas, incluida Bid, se han generado a partir de la duplicación de genes y la evolución divergente, y todas juntas forman un grupo de homólogos de Bcl-2. El dominio canónico BH3 es un dominio de interacción

proteína-proteína que se puede encontrar en estos homólogos de Bcl-2 y en otras proteínas que regulan su función. Se pueden encontrar dominios BH3 no canónicos muy parecidos en una gran cantidad de proteínas, lo que las hace potencialmente capaces de modular la actividad de los homólogos de Bcl-2. Es poco probable que estos dominios no canónicos se hayan generado a través de la duplicación del dominio canónico BH3: de hecho, también están presentes en organismos donde el dominio canónico está ausente (Dejean & Manon, 2017).

Como la desregulación de la apoptosis mitocondrial es una característica común de las células implicadas en la fibrosis pulmonar idiopática, apuntar hacia la activación de genes de proteínas proapoptóticas dentro de la familia de proteínas Bcl-2 es una estrategia clave para tomar el control de la apoptosis en este tipo de enfermedades (Dejean & Manon, 2017).

4.7.1. Clasificación

La familia de proteínas Bcl-2 se divide en tres subgrupos según su función pro o antiapoptótica y se clasifican por su número de dominios BH (del inglés *Bcl-2 Homology domain*). Las proteínas de supervivencia BCL-2, BCL2L1 (BclxL), MCL1, BCL2L2 (Bcl-w) y A1 comparten cuatro dominios BH, mientras que las proteínas multidominio BAX y BAK1 (BAK) contienen tres dominios BH y son proapoptóticas (“BH3”), por ejemplo, PMAIP1 (Noxa), BCL2L11 (Bim), BID y BBC3 (PUMA), que contienen solo un dominio BH. La proporción de las proteínas pro y antiapoptóticas determina el destino celular a nivel de las mitocondrias (Hagenbuchner, et al., 2012).

Las proteínas efectoras proapoptóticas BAK y BAX son ejecutoras de la vía apoptótica, sus cambios conformacionales y oligomerización en respuesta a factores estresantes apoptóticos provocan la MOMP. Este paso fundamental libera citocromo C y otros factores apoptogénicos de las mitocondrias para desencadenar la activación de proteasas y caspasas celulares para comprometer completamente a la célula a la apoptosis (Hagenbuchner, et al., 2012).

La familia de proteínas BCL-2 comparte homología de secuencia en hasta cuatro motivos conservados llamados dominios de homología BCL-2 (BH), de los cuales BAK y BAX contienen los cuatro. Estructuralmente BAK y BAX constan de nueve hélices alfa (α 1-9), incluido un dominio transmembrana (α 9) y exhiben un pliegue típico de BCL-2. La unión de un dominio BH3 a cualquiera de los sitios desencadena la activación y despliegue de BK y BAX BCL-2. Este evento de desarrollo hace que BAK y BAX pasen de sus monómeros inertes a homodímeros activados que luego se oligomerizan y causan MOMP (Warren, et al., 2019).

4.7.2. Proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2

4.7.2.1. BAK y BAX

Las proteínas efectoras proapoptóticas BAK y BAX son ejecutoras de la vía apoptótica, sus cambios conformacionales y oligomerización en respuesta a factores estresantes apoptóticos provocan la MOMP. Este paso fundamental libera citocromo C y otros factores apoptogénicos de las mitocondrias para desencadenar la activación de proteasas y caspasas celulares para comprometer completamente a la célula a la apoptosis (Warren, et al., 2019).

Estructuralmente BAK y BAX constan de nueve hélices α (α 1-9) incluido un dominio transmembrana. Se ha sugerido que BAK y BAX funcionan de forma redundante a pesar de las posibles diferencias en los niveles de expresión tisular y localización subcelular. BAX se encuentra en un equilibrio dinámico entre el citosol y las mitocondrias, y se encuentra predominantemente en el citosol en su estado inactivo. Por el contrario, BAK esta constitutivamente localizado en las mitocondrias a través de su dominio TM y donde forma complejos con un canal iónico, llamado VDAC2 (Yuan, Dewson, Czabotar, & Birkinshaw, 2021).

Los VDAC, también conocidos como porinas mitocondriales, son una familia de proteínas de membrana, que son las proteínas más abundantes en la MEM. Los VDCA permiten el paso de iones cargados tanto negativa como positivamente; NADH, ATP/ADP y otros metabolitos. Comparten la responsabilidad en la función del flujo de metabolitos y han sido implicados en muchas vías, incluida la glucólisis y liberación de ROS. Se ha pensado que VDAC2 forma parte del PTP que permite la liberación de citocromo C durante la apoptosis (**ver figura 7**).

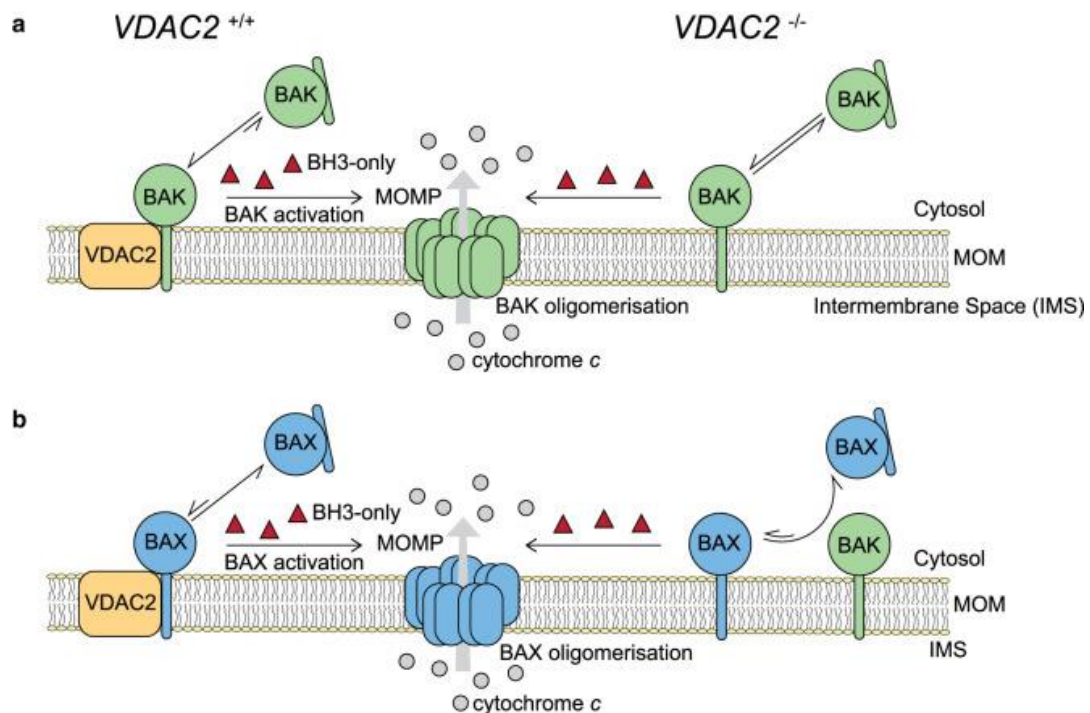


Figura 7. Los efectores proapoptóticos BAK y BAX interactúan con VDAC2 en la MEM. La inducción de la apoptosis mediante la regulación positiva de proteínas exclusivas de BH3 activa BAK y BAX independientemente de su localización inicial, y se disocian de VDAC2 para provocar la MOMP y la liberación de citocromo C. **a)** BAK aún puede migrar a las mitocondrias en un entorno deficiente en VDAC2 ($VDAC2^{-/-}$). **b)** Sin embargo, en ausencia de VDAC2, BAX se vuelve independiente de BAK para su orientación mitocondrial. Nota: Las flechas indican movimiento entre la localización y conformación de BAK y BAX y la longitud de la flecha indica la preferencia por la localización (cuanto más pequeña es menos prominente) (Yuan, et al., 2021).

Si bien, la apoptosis mediada por BAK aún puede ocurrir en ausencia de VDAC2, por el contrario, BAX requiere de VDAC2 para mediar la apoptosis (Yuan, et al., 2021).

4.7.2.2 BIM

Es una proteína codificada por el gen *BCL2L11*, que pertenece a la familia **Bcl-2**. Los miembros de esta familia de proteínas forman heterodímeros y homodímeros y actúan como reguladores antiapoptóticos y

proapoptóticos participando en una amplia variedad de actividades celulares. La proteína contiene un dominio 3 de homología **Bcl-2** (BH3). Se ha demostrado que interactúa con otros miembros de la familia de proteínas BCL-2 actuando como un activador de la apoptosis. Activa directamente efectores proapoptóticos como BAX (Malishev, et al., 2020).

4.7.2.3. PUMA

Proteína codificada por el gen *PUMA*, miembro de la familia de proteínas BCL-2. Pertenece a la subclase proapoptótica exclusiva de BH3; coopera con proteínas activadoras directas para inducir la permeabilización y apoptosis de la membrana externa mitocondrial. Puede unirse a miembros de la familia Bcl-2 antiapoptóticos para inducir disfunción mitocondrial (Gene Cards, s.f.).

Puma se clasificó originalmente como sensibilizador y de acuerdo con esta clasificación, estudios adicionales demostraron que PUMA requiere la cooperación del activador directo BIM o Bid para inducir la apoptosis. Una línea de investigación sugirió que PUMA se une a la hélice α N-terminal de BAX, ya sea promoviendo la translocación de BAX a las mitocondrias o interactuando con BAX en la membrana externa mitocondrial (Dai, et al., 2014).

4.7.3. Otras proteínas de interés que no forman parte de la familia Bcl-2

4.7.3.1 Caspasa-3 (Gen *Casp3*)

La proteína codificada por este gen es una proteasa de ácido cisteína-aspártico que desempeña un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis celular (Gene Cards, s.f.).

Es responsable de las alteraciones nucleares en la apoptosis y se considera la principal caspasa efectora ya que tanto las vías extrínsecas como las intrínsecas conducen a la activación de Caspasa 3. La caspasa 3 se escinde en un residuo de aspartato para producir una subunidad p12 y p17 para formar la caspasa 3 escindida (estado activo), que es responsable de los cambios morfológicos y bioquímicos de la célula (Vieira, et al., 2022).

4.7.3.2. Citocromo C (Gen *CYCS*)

Este gen codifica a una pequeña proteína multifuncional que es una macromolécula globular que consta de unos 100 residuos de aminoácidos, según la especie. En el humano, es una macromolécula de cadena sencilla compuesta por 104 aminoácidos. Su conformación nativa está formada por tres hélices α mayores y dos menores interconectadas por motivos de estructura secundaria no regulares (denominadas bucles). Como proteína de la membrana periférica mitocondrial, actúa entre la membrana mitocondrial interna (IMM) y MEM de las células sanas, donde funciona como componente central de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. La proteína codificada se asocia con la membrana interna de la mitocondria donde acepta electrones del **citocromo C** y los transfiere al complejo de citocromo oxidasa. Esta proteína también participa

en el inicio de la apoptosis liberándose en el citosol. La proteína se une a APAF-1, activa la procaspasa 9 y desencadena una cascada enzimática que conduce a la muerte celular (Gene Cards, s.f.; Santucci, et al., 2019).

4.7.3.3. Mn-SOD (Gen *SOD2*)

La familia SOD abarca tres miembros, SOD1, SOD2 y SOD3. SOD1 se localiza en el citoplasma y el espacio intermembrana mitocondrial, mientras que SOD2 está presente predominantemente en la matriz mitocondrial y SOD3 está presente extracelularmente. *SOD2* codifica Mn-SOD, una proteína que forma un homotetrámero y se une a un ion manganeso por subunidad (Gene Cards, s.f.; Alateyah & Gupta, 2022).

Mn-SOD se sintetiza en el citoplasma y se dirige a las mitocondrias mediante un péptido señal donde participa en la regulación del estrés oxidativo en la célula mediante la dismutación de radicales superóxidos (O_2^-) a H_2O_2 y oxígeno molecular o bien, generados por la cadena respiratoria de enzimas (Fukai & Ushio, 2011).

5. Materiales y métodos

5.1. Obtención de fibroblastos

Los cultivos primarios de fibroblastos fueron obtenidos de biopsias de pacientes diagnosticados con Fibrosis Pulmonar Idiopática y Neumonitis por Hipersensibilidad y, por otra parte, controles sanos (líneas celulares adquiridas por ATCC). En el caso de las líneas control, se crecieron en cajas de 25 cm² en medio EMEM enriquecido con suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL) al 10% y antibiótico Primocin. Posteriormente, una vez que el cultivo alcanzó la confluencia entre el 70-80% se dividieron y crecieron en cajas de 100 cm². Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Las líneas celulares de FPI y NH crecieron en medios F-12 al 10% enriquecido de SFB y en medio Advance al 5% de SFB, ambos con antibiótico Primocin.

5.2. Estimulo con H₂O₂

Los cultivos primarios al alcanzar una confluencia de crecimiento del 80% se estimularon con peróxido de hidrogeno a una concentración de 650 μM durante 2 horas de incubación a 37°C.

5.3. Extracción de ARN

El ARN total de las células se extrajo con el reactivo de TRIZOL (Life Technologies). Esta técnica consiste en añadirles 1 mL del reactivo a cada caja, las muestras se incubaron de 2-3 minutos a temperatura ambiente, se les adicionó 200 μL de cloroformo a cada una y luego se vortexearon los tubos vigorosamente por 15 segundos; se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 9,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa que contiene el ARN se transfirió a un tubo nuevo evitando transferir la fase orgánica. El ARN se precipitó añadiendo 500 μL de isopropanol; los tubos se almacenaron a -80°C durante toda la noche. Al

continuar con la extracción, se dejó incubando la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 9,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó, y el pellet se lavó con 1 mL de etanol (EtOH) al 75% para un primer lavado. Se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos. Se realizó un segundo lavado con EtOH al 75% se centrifugaron con las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante, y el pellet se dejó secar durante 10 minutos. Finalmente, se resuspendió con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

5.4. Cuantificación de ARN

Las muestras fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, a una longitud de onda de 260 nm. Para esto, se evaluó la pureza del mismo ARN mediante la relación 260/280 y 260/230.

5.5. RT-PCR y q-PCR en tiempo real

A partir de la obtención de ARN se realizó la retrotranscripción de ARN a cDNA utilizando el kit Verso cDNA synthesis (Thermo Scientific cat.AB-1453/A) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y utilizando un termociclador de punto final.

Una vez sintetizado el cDNA (concentración final de 2 ng/μL) se utilizaron sondas y primers específicos para la amplificación de los genes de interés, los cuales fueron FOXO3a, caspasa-3, Bim, Bax, Puma y SOD2 mediante PCR en tiempo real, utilizando HPRT como gen endógeno.

5.6. Obtención de lisados totales

Los lisados totales fueron obtenidos utilizando el buffer lisis RIPA (Invitrogen) y un coctel de inhibidores de Los lisados totales fueron obtenidos utilizando el buffer lisis RIPA (Invitrogen) adicionándole un coctel de inhibidores de proteasa (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

Los fibroblastos control fueron cultivados en cajas T-25, se tripsinizaron y se transfirieron a un tubo de 15 mL. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos para obtener el botón celular, se aspiró el medio por vacío dejando el pellet y se realizó un lavado con 1 mL de PBS 1X. Se transfirieron las células en un tubo eppendorf de 1,5 mL, se centrifugaron en una nanofuga durante 5 minutos para obtener de nuevo el pellet. A cada tubo se le colocaron 60 μl de buffer RIPA (preparado 1:100) y se almacenaron a -70°C hasta continuar con la extracción.

Posteriormente, las muestras se sonicaron 10 veces, 20 segundos por cada ciclo y se dieron descansos de 1 minuto en hielo.

Finalmente, las muestras se vortexearon 10 segundos, se dejaron incubando 5 minutos en hielo y se centrifugaron a 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante el cual es el lisado total proteico y se transfirió a tubos nuevos realizando alícuotas para evitar ciclos de congelación descongelación almacenándose a -70°C hasta su uso.

5.7. Preparación de extractos citosólicos y nucleares

Los extractos citosólicos y nucleares fueron obtenidos usando el kit de extracción NE-PER (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los pellets celulares fueron obtenidos de la misma forma mencionada anteriormente, y se resuspendieron en 150 μ l de CER I frío, se vortexeó vigorosamente 30 segundos y se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente se le adicionaron 10 μ l de CER II frío y se vortexeó por 10 segundos más, se incubó en hielo 1 minuto.

Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min, el sobrenadante (fracción citoplásmica) se transfirió a un tubo nuevo y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La fracción insoluble, la cual es la fracción nuclear, fue resuspendida en 73.33 μ l de CER frío y se vortexeó durante 15 segundos. Las muestras se colocaron en hielo y se vortexearon continuamente por 30 segundos cada 10 minutos hasta completar 40 minutos.

Finalmente se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante (fracción nuclear) se colectó en un tubo nuevo. Ambas fracciones se guardaron a -80°C hasta su uso.

5.8. Curva estándar de BSA

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva estándar utilizando la proteína albumina de suero bovino (solución stock de BSA [1 mg/mL]) como referencia. Mediante el método de Bradford se establecieron concentraciones desde 0.05 mg/mL hasta 0.5 mg/mL.

Para la cuantificación, se utilizó un equipo Accuris™ Instruments SmartReader™ 96T lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm.

5.9. Western Blot

Los lisados celulares totales y extractos proteicos citoplasmáticos (10 μ g) fueron separados en geles SDS-PAGE al 12.5%, considerando el tamaño de las proteínas de interés. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham). Posteriormente se llevó a cabo el bloqueo durante 1 hora con BSA al 5%. Después se siguió con la incubación con los anticuerpos primarios específicos a 4°C , anti-citocromo C (1:1000), anti-caspasa-3 (1:1000) y anti-SOD 2 (1:2000) (Enzo). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-rabbit y anti-mouse, la marca fue revelada con el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences,UK). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti GAPDH (1:1000). Los resultados se analizaron utilizando un fotodocumentador ChemiDoc™XRS+(BIO-RAD), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.Resultados

6.1.PCR

Se evaluó la expresión a nivel de gen de FoxO3a, utilizando sondas TaqMan, y en el caso de Caspasa-3, Bax, Bim, PUMA y SOD2 se utilizaron primers específicos para su amplificación (ver figuras 7, 8, 9, 10, 11 y 12). Para todos los casos se utilizó como gen de referencia HPRT.

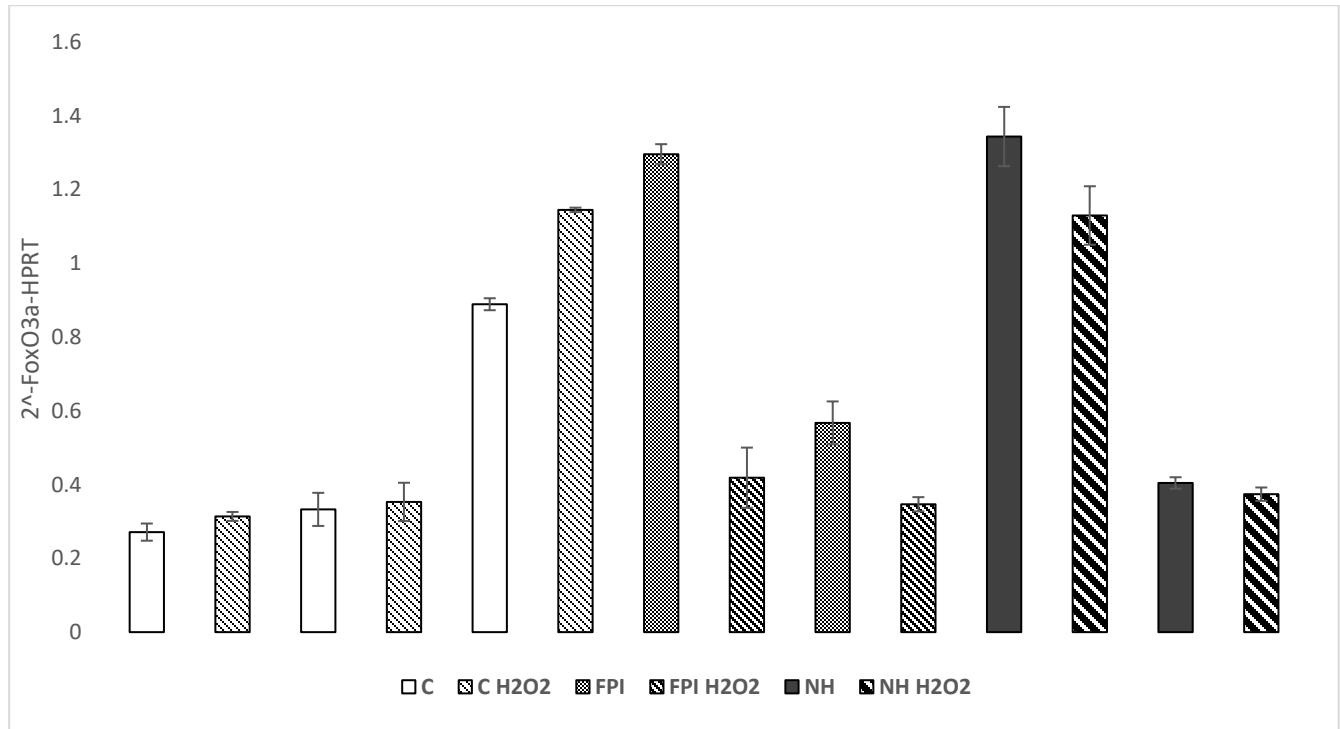


Figura 7. Expresión de FoxO3a a nivel gen en líneas celulares control (C), de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) con y sin el estímulo (H₂O₂) a una [650 μM] durante 2 horas.

En la **figura 7** se observa que en solo una de las tres líneas control hubo un incremento en la expresión de FoxO3a, al ser estimulada con el peróxido de hidrógeno a diferencia de su control sin el estímulo. Por otro lado, las líneas patológicas FPI y de NH presentaron una disminución del gen FoxO3a en las que fueron tratadas con H₂O₂.

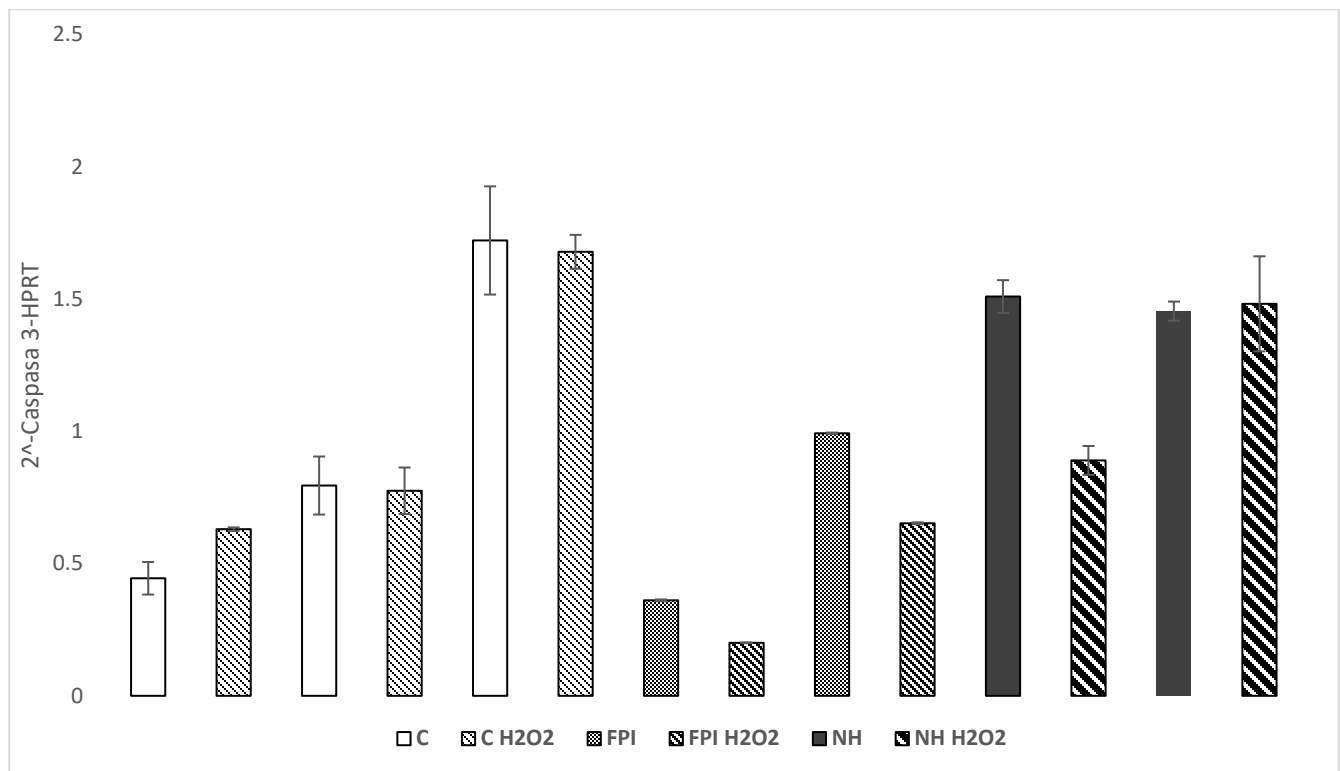


Figura 8. Expresión de *CASP-3* (Caspasa-3) a nivel gen en líneas celulares control (C), de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) con y sin el estímulo (H₂O₂) a una [650 µM] durante 2 horas.

En la **figura 8** se analizó la expresión a nivel de gen *CASP-3* que codifica para la proteína caspasa 3. Como se observa en la figura solo una de las tres líneas control tuvo respuesta al tratamiento con H₂O₂ en la expresión del gen *CASP-3*. Para las líneas patológicas de FPI, ambas líneas estudiadas, presentan una disminución en la expresión del gen cuando fueron sometidas al estímulo en comparación con sus controles. Por otra parte, la expresión en las líneas de NH fue heterogéneo al recibir el estímulo, versus sus controles, sugiriendo que debido a la fisiopatología de la enfermedad puede haber cierta resistencia para que se logre la expresión de dicho gen o bien, el peróxido de hidrogeno no fue lo suficientemente eficaz para lograr evidenciar otra respuesta celular.

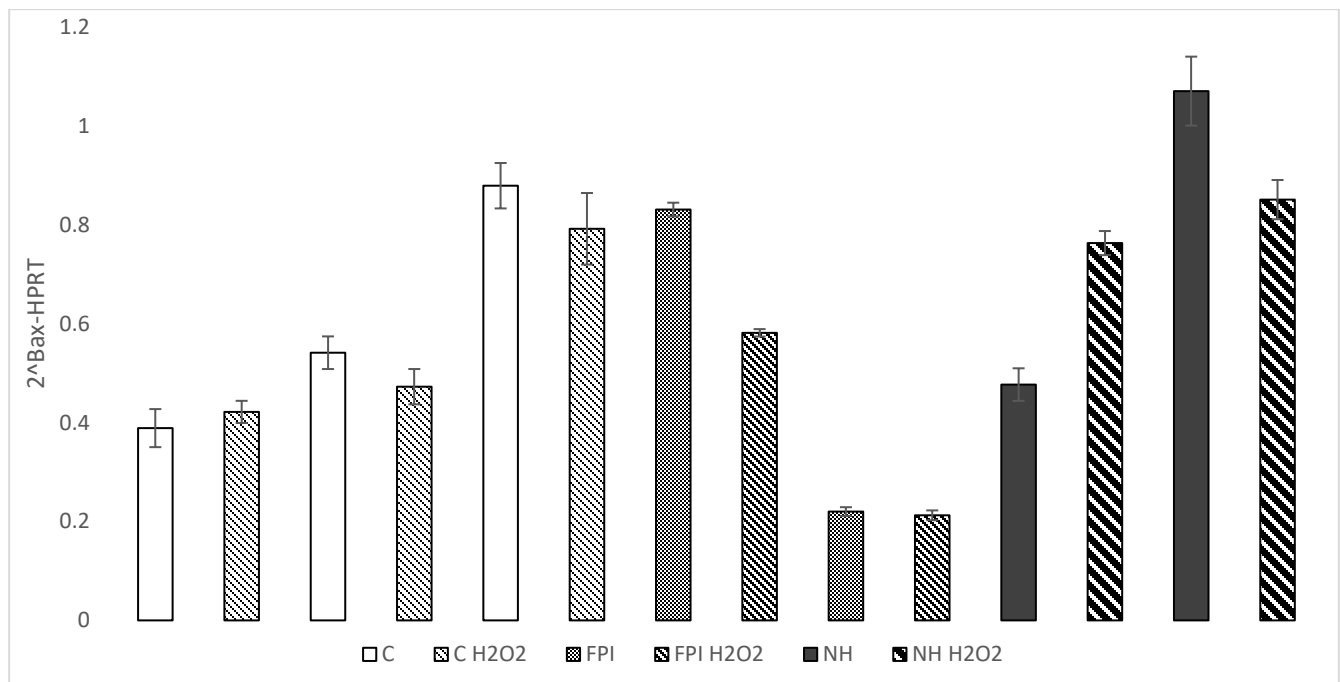


Figura 9. Expresión de BAX a nivel gen en líneas celulares control (C), de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) con y sin el estímulo (H₂O₂) a una [650 μM] durante 2 horas.

Otro gen evaluado, *Bax* (ver figura 9) que codifica para la proteína Bax perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2. Las líneas control no presentaron diferencia en la expresión de Bax con o sin el estímulo. En las líneas patológicas de FPI hubo una disminución en la expresión del gen a estudiar y otra línea no tuvo respuesta al recibir el estímulo. Las líneas patológicas de NH presentaron un comportamiento heterogéneo en el cual, la primera línea estudiada evidencia una mayor expresión al someterse al estímulo a diferencia de la no estimulada. Sin embargo, la segunda línea mostró una disminución en la expresión de *Bax* versus su control. Este estudio debería ser evaluado más veces para determinar si se repite el comportamiento de todas las líneas.

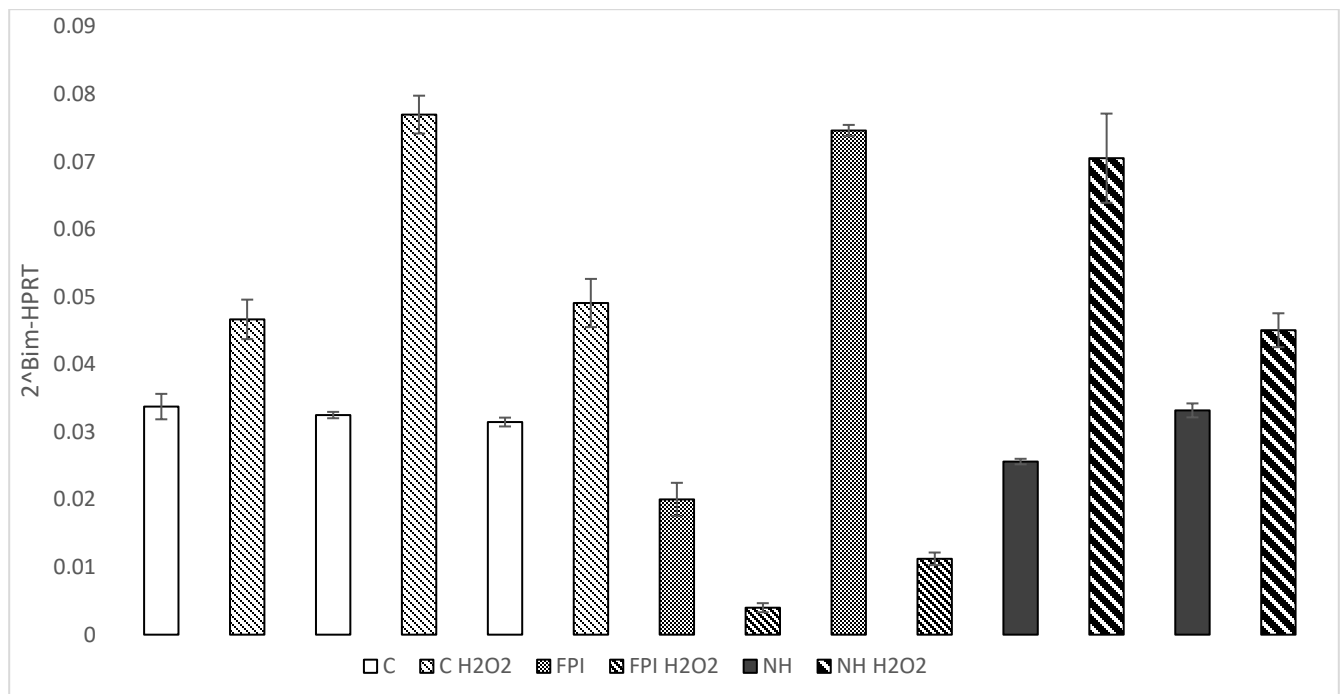


Figura 10. Expresión de BIM a nivel gen en líneas celulares control (C), de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) con y sin el estímulo (H₂O₂) a una [650 μM] durante 2 horas.

Los resultados obtenidos para la expresión de *BIM* a nivel gen (**ver figura 10**) en las tres líneas control evaluadas es un incremento cuando se sometieron al estímulo con peróxido de hidrógeno. Lo que indica una respuesta por parte de las células al estímulo, evidenciando por este resultado que a través del estrés oxidativo la regulación de este gen fue positivamente. En el caso de las líneas patológicas de FPI, se mostraron una disminución en la expresión de *Bim* en ambas líneas sometidas al estímulo (H₂O₂) en comparación con sus controles. Demostrando que si hubo respuesta por parte de los fibroblastos a consecuencia de la presencia del peróxido de hidrógeno, así mismo deduciendo que dicho estímulo alcanza a ser un “regulador negativo” para la expresión a nivel de gen de *BIM*.

Por otra parte, ambas líneas patológicas de NH se comportaron diferente a las de FPI, al presentar una respuesta positiva para la expresión de *BIM* cuando son sometidas al estímulo en comparación de las que no lo estuvieron.

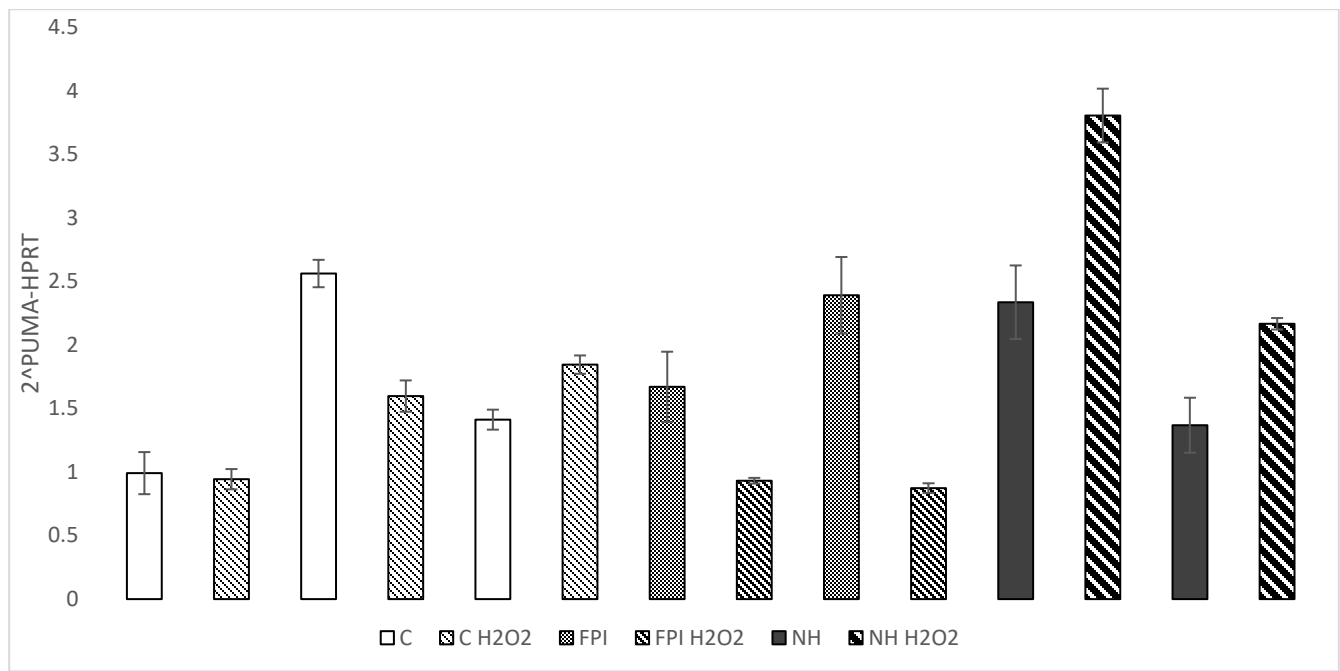


Figura 11. Expresión de PUMA a nivel gen en líneas celulares control (C), de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) con y sin el estímulo (H₂O₂) a una [650 μM] durante 2 horas.

PUMA es otro de los genes evaluados (ver figura 11) en este trabajo de investigación, donde se observa un comportamiento heterogéneo entre las líneas control puesto que, en la primera línea no existe alguna diferencia entre la estimulada con el H₂O₂ y la que no fue estimulada, ambas presentan la misma expresión de *PUMA* a nivel genético. En la segunda línea control no tuvo un efecto o no hubo una respuesta por parte de esta ante la exposición del estímulo. Caso contrario de la última línea control evaluada, la cual si tuvo mayor expresión del gen *PUMA* cuando se sometió al estímulo a diferencia de la no estimulada. Como se ha mencionado, es un comportamiento heterogéneo entre líneas control, esto se puede deber, a que son distintas poblaciones y subpoblaciones de células, lo cual su comportamiento y/o respuesta puede ser distinta. Por otra parte, en ambas líneas patológicas de FPI los controles presentan una mayor expresión de *PUMA* en comparación cuando se sometieron al estímulo (H₂O₂), lo cual quiere decir que no tuvo efecto el peróxido de hidrogeno, ya sea por la misma patología o algún mecanismo de resistencia por parte de la célula para sobreexpresar el gen. Caso contrario en las líneas patológicas de NH mostraron mayor expresión de *PUMA* en las líneas estimuladas versus su control, lo cual este estudio indica que, si respondieron ante el estímulo de el H₂O₂. De igual forma, como en el caso de *BIM*, se recomendaría realizar más repeticiones de este estudio para evaluar de forma más precisa el comportamiento obtenido para esta última línea patológica.

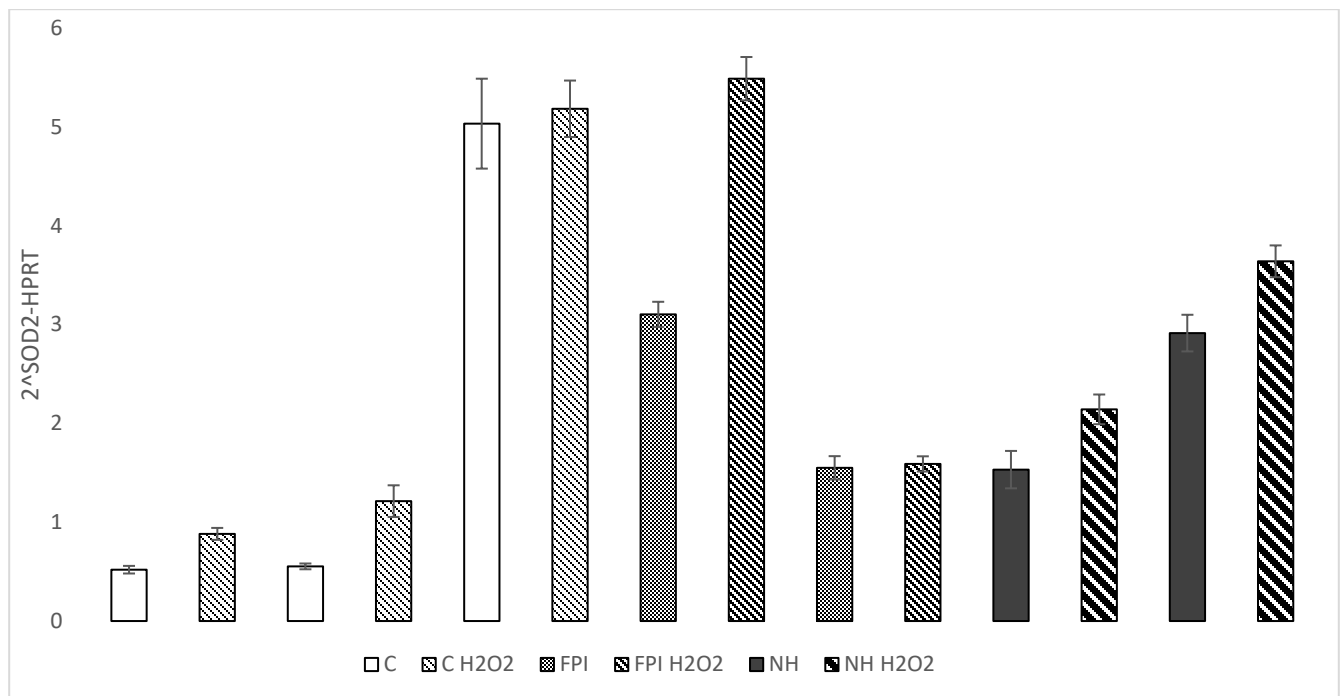


Figura 12. Expresión de SOD2 a nivel gen en líneas celulares control (C), de Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) y Neumonitis por Hipersensibilidad (NH) con y sin el estímulo (H₂O₂) a una [650 μM] durante 2 horas.

En la **figura 12** se presenta la evaluación de *SOD2* a nivel de gen, observando que en dos de tres líneas control (C y C2) presentan un aumento en la expresión génica de *SOD2* cuando estas se estimularon con peróxido de hidrogeno. En el caso de las dos líneas de FPI, solo una de ellas respondió al tratamiento con peróxido (H₂O₂). Para las líneas patológicas de NH, ambas presentan mayor expresión cuando se exponen al estímulo versus su control. Lo cual pudiera indicar por este resultado, que hay una respuesta favorable ante el estímulo de peróxido de hidrogeno para regular positivamente la expresión de *SOD2* a nivel de gen. Considerando que *SOD2* es el gen que codifica para la proteína peróxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD o SOD2), una proteína de carácter antioxidante.

6.2. Western Blot

El análisis se llevó a cabo evaluando dos proteínas involucradas en el mecanismo de apoptosis, las cuales se consideraron a caspasa 3 en su estado inactivo (32 kDa), y citocromo C (15 kDa) (**ver figuras 13 y 14**) utilizando anticuerpos de origen murino y de conejo respectivamente, a una concentración 1:1000, (Santa Cruz Biotechnology). Para ambos casos se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH (Santa Cruz) (1:1000) como control de carga.

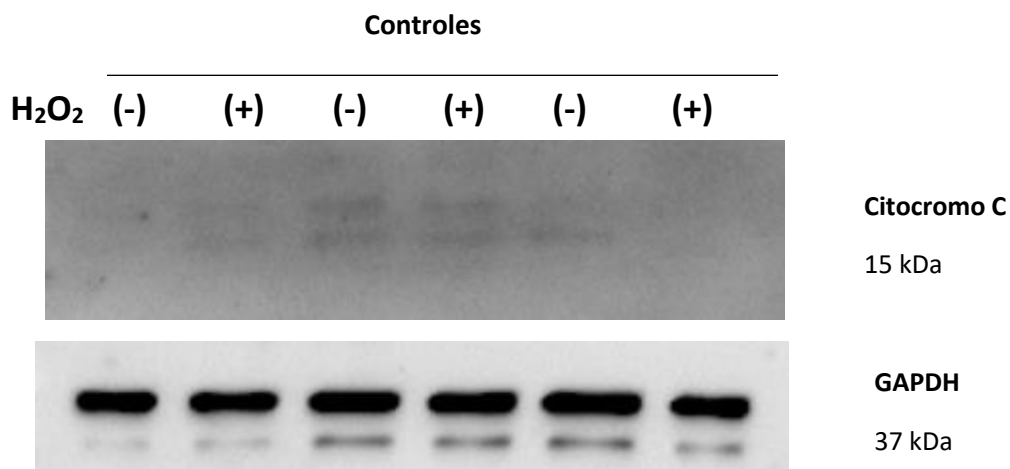


Figura 13. Expresión de Citocromo C a nivel proteína en líneas celulares control (cargando 10 µg de proteína), en gel SDS-PAGE al 12.5 % con (+) y sin el estímulo (-) H₂O₂ a una [650 µM] durante 2 horas. GAPDH utilizado como control de carga.

En la **figura 13**, se analiza la expresión de Citocromo C a nivel de proteína en líneas control, en gel SDS-PAGE al 12.5%.

En este análisis se logró obtener una marca positiva para la proteína de interés, las marcas que se alcanzaron a ver fueron ténues por lo que no se pudo deducir nada concreto de esta imagen, y se recomendaría repetir el experimento para poder concluir algo con respecto a Citocromo C.

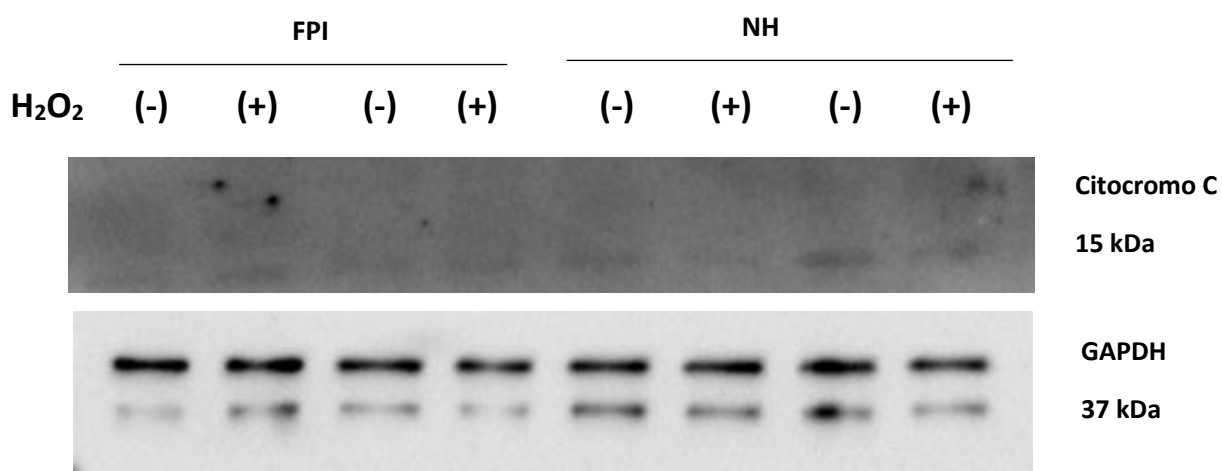


Figura 14. Expresión de Citocromo C a nivel proteína en membrana 2 fibroblastos de FPI y NH (cargando 10 µg de extracto citoplasmático), en gel SDS-PAGE al 12.5 % con (+) y sin el estímulo (-). Estímulo: H₂O₂ a una [650 µM] durante 2 horas. GAPDH utilizado como control de carga.

En la **figura 14** no se logró apreciar la presencia de bandas alrededor de los 15 kDa para ninguna de las líneas a estudiar por lo que no se pudo concluir nada.

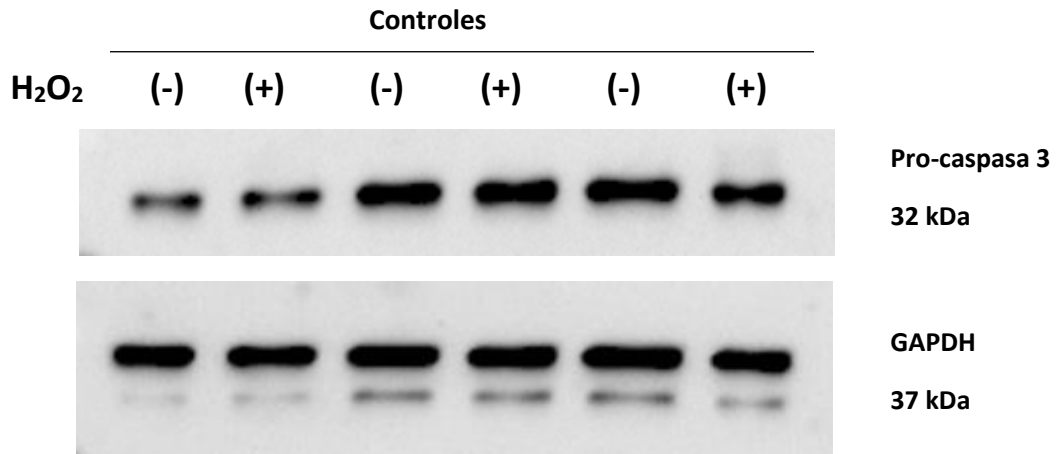


Figura 15. Expresión de Pro-caspasa 3 a nivel proteína en líneas celulares control (se cargó 10 µg de proteína), en gel SDS-PAGE al 12.5 % con (+) y sin el estímulo (-). Estímulo: H₂O₂ a una [650 µM] durante 2 horas. GAPDH utilizado como control de carga.

Para la expresión de caspasa 3 a nivel proteína se reveló utilizando un anticuerpo anti-caspasa 3 (Santa cruz; diluido 1:1000) que detecta a caspasa 3 en su estado inactivo (procaspasa 3). En la figura 15 se muestran las tres líneas control (carriles 1, 2, 3 y 4, lisados totales; carriles 5 y 6, extracto citoplasmático). Se puede observar que sólo una de las tres líneas de las que recibieron el estímulo de peróxido de hidrógeno tuvieron una disminución de la proteína pro-caspasa. Lo que nos lleva a pensar que las otras muestras se debieron analizar de igual forma los extractos citoplásmicos.

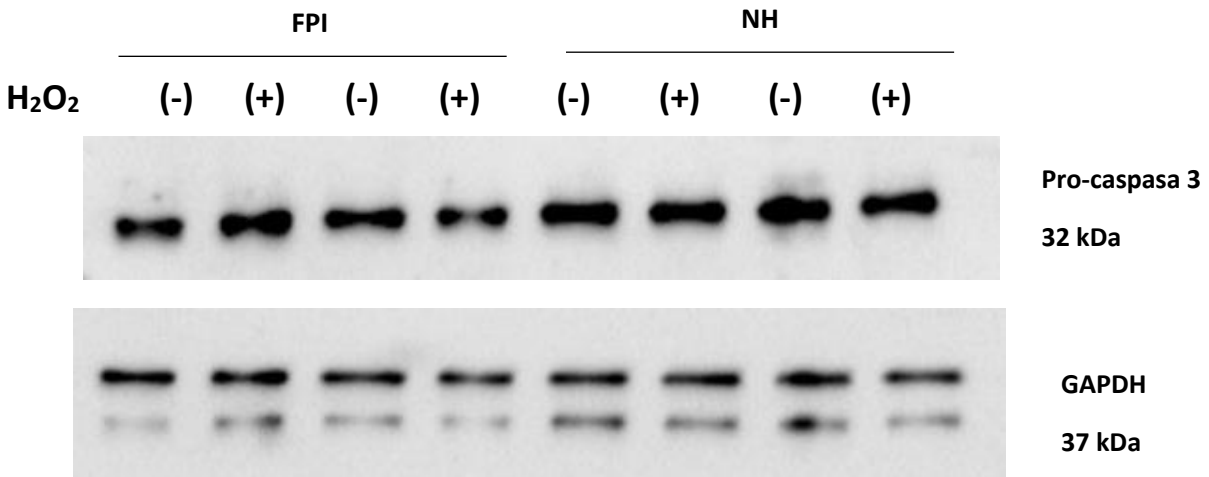


Figura 16. Expresión de Pro-caspasa 3 a nivel proteína en fibroblastos de FPI y NH (cargando 10 µg de extracto proteico), en gel SDS-PAGE al 12.5 % con (+) y sin el estímulo (-). Estímulo: H₂O₂ a una [650 µM] durante 2 horas. GAPDH utilizado como control de carga.

En la **figura 16** para las líneas patológicas de FPI; en el caso de los primeros carriles (1 y 2) se observan bandas alrededor de los 32 kDa, con mayor intensidad en presencia del estímulo a diferencia de la banda en ausencia de H₂O₂. Para los carriles 3 y 4, representativo a una segunda línea patológica de FPI; se muestra que la banda en ausencia del estímulo (-) exhibe una intensidad mayor en comparación con la presencia del estímulo. Para los extractos citoplasmáticos de las líneas patológicas de NH; en los carriles 5 y 6 se aprecia la misma intensidad de ambas muestras. Lo que quiere decir, que no se evidenció alguna diferencia con respecto a la exposición frente al peróxido de hidrogeno entre esta línea de NH. Para los carriles 7 y 8, se observa ligeramente una mayor intensidad en la banda que representa a la línea que no fue estimulada (-) con respecto a la presencia del H₂O₂ (+). Así mismo, indicando mayor expresión de caspasa 3 en su forma inactiva en ausencia del estímulo. Por otra parte, no se observó alguna diferencia con la presencia del H₂O₂ como estímulo, ya que, por ejemplo, en la última línea control (figura 15), y las líneas patológicas de los carriles 3 y 4 de FPI y, 7 y 8 de NH, en ausencia del estímulo o en condiciones basales, se aprecia una mayor expresión de la proteína, interpretando que no tuvo un efecto positivo a alguna respuesta celular, el estímulo estresante para provocar la sobreexpresión de procaspasa 3 o bien, la activación de esta proteína.

Controles

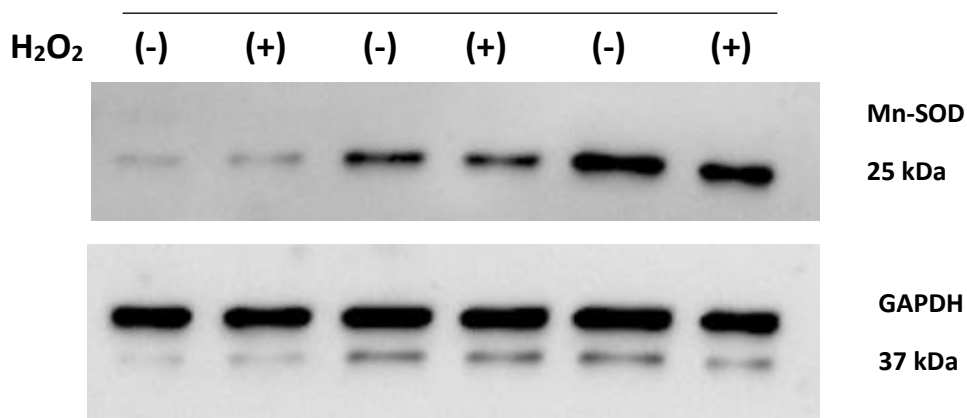


Figura 17. Expresión de Mn-SOD a nivel proteína en líneas celulares control (cargando 10 µg de lisados proteicos), en gel SDS-PAGE al 12.5 % con (+) y sin el estímulo (-). Estímulo: H₂O₂ a una [650 µM] durante 2 horas. GAPDH utilizado como control de carga.

En la **figura 17** se muestra que, para las líneas control, las bandas con mayor intensidad se aprecian en los carriles correspondientes a las muestras que no recibieron el estímulo de H₂O₂. Ligeramente en los dos primeros carriles apenas logran distinguirse estas bandas características de Mn-SOD a nivel de proteína, mientras que en las otras dos líneas control la marca es más evidente. Estos resultados obtenidos dan por hecho que aun con la presencia del estímulo no se logró obtener una diferencia marcada en comparación de aquellas líneas control que no se sometieron al H₂O₂. Recordando que el H₂O₂ es una molécula que tiene un poder oxidativo a nivel celular. A nivel proteico no se logró evidenciar una diferencia, tal vez por diversos factores como la concentración o el tiempo de exposición al estímulo.

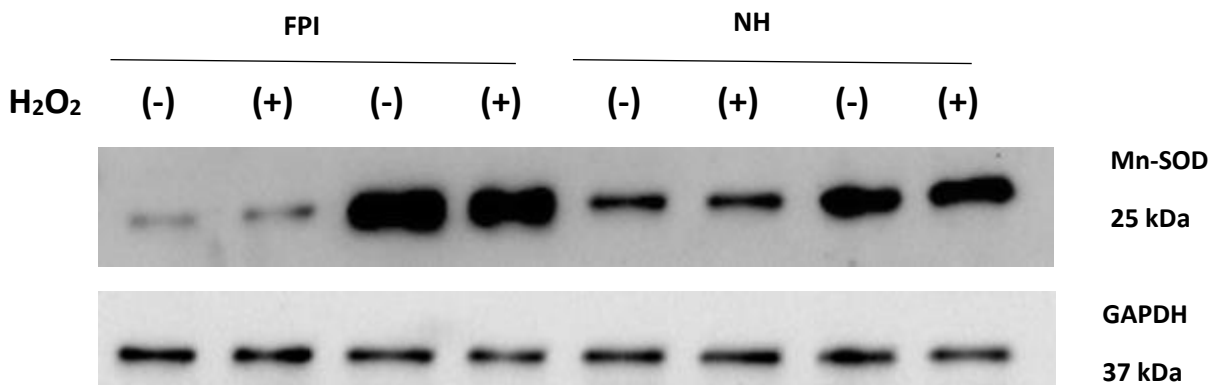


Figura 18. Expresión de Mn-SOD a nivel proteína en fibroblastos de FPI y NH (cargando 10 µg de extracto proteico), en gel SDS-PAGE al 12.5 % con (+) y sin el estímulo (-). Estímulo: H₂O₂ a una [650 µM] durante 2 horas. GAPDH utilizado como control de carga.

A continuación, en la **figura 18** se observa la expresión de Mn-SOD a nivel de proteína en extractos citoplasmáticos de líneas patológicas de FPI y NH. En el caso de las líneas celulares de FPI, en la primera

evaluada se observan bandas muy tenues (carriles 1 y 2), ligeramente con más distinción la banda que se encuentra en el carril 2 perteneciente a la línea fibrótica que fue estimulada con H_2O_2 . Mientras que en la segunda línea fibrótica evaluada se presentaron bandas más intensas en comparación de la primera. Y entre sí, se logra distinguir una mayor intensidad de la banda en ausencia del H_2O_2 con respecto a la línea que fue estimulada. Mismo comportamiento de expresión a nivel de proteína para las líneas celulares de NH, en los carriles 5 y 6 representativos de la primera línea alveolítica evaluada se observa una ligera diferencia y mayor intensidad de la banda en ausencia del H_2O_2 con respecto a la línea de NH que si fue estimulada. Así mismo, para la segunda línea alveolítica de NH (últimos dos carriles) se apreció una mayor intensidad de la banda en ausencia del H_2O_2 a diferencia de la línea de NH estimulada. Esto nos dice que al igual que en los resultados anteriores de la **figura 17**, parece ser que el H_2O_2 a nivel proteico no mostro alguna diferencia en cuanto al incremento en la intensidad de la banda con respecto a aquellas líneas que no se estimularon. En este caso, fueron evaluadas líneas celulares de FPI y NH, dos patologías con mecanismos fisiológicos distintos, que pudieron ser uno de los factores por los cuales no hubo gran diferencia de expresión a nivel de proteína, ya que con el H_2O_2 se esperaba una mayor expresión. Por otra parte, también hay que tener en cuenta el mayor porcentaje de residencia de la proteína en las células.

7. Discusion

Según Fasano, Candida y colaboradores (2019); la evolución de los organismos procariontes y eucariotes (unicelulares y multicelulares) ha ido en incremento puesto que, las células han desarrollado una extraordinaria capacidad para adaptarse a los cambios adversos de su entorno. Los organismos y sus células están expuestos a un amplio espectro de eventos dañinos o de estrés que surgen de procesos fisiológicos y/o estímulos externos. Los cambios estresantes y las fluctuaciones en las condiciones extracelulares pueden provocar daños en la estructura y función de las macromoléculas (ADN, ARN, lípidos y proteínas). Un estímulo apoptótico es la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias, para este estudio se utilizó el H_2O_2 , como un estímulo externo a una concentración de 650 μM durante 2 horas, esperando que tanto las células control, como los fibroblastos de FPI y NH entraran en un proceso de estrés oxidativo activando ciertos mecanismos como es la apoptosis a través de la expresión de genes y proteínas de carácter proapoptótico, como fueron Caspasa-3, BAX, BIM, PUMA y Citocromo C, que juegan un papel importante en la muerte celular programada. Así mismo, se decidió evaluar a FoxO3a, ya que, como se ha mencionado participa en la regulación de genes involucrados en la apoptosis celular.

En el caso de FoxO3a únicamente se evaluó a nivel gen (**Figura 7**). En términos generales, las líneas control evaluadas no presentaron mucha diferencia entre las estimuladas y las no estimuladas con H_2O_2 , lo cual se interpreta que el peróxido de hidrogeno como una molécula ROS, no fue lo suficientemente capaz para provocar una respuesta más favorable a la sobreexpresión de FoxO3a. Por otro lado, las líneas celulares patológicas de FPI y NH presentaron en general mayor expresión de FoxO3a sin el estímulo que cuando se expusieron a este, y siendo los fibroblastos de FPI con mayor expresión a diferencia de las líneas patológicas de NH. Esto, probablemente debido ciertos mecanismos de resistencia que impidan la regulación positiva de FoxO3a mediante sus modificaciones postraduccionales que conducen a su localización y posterior activación o inhibición. Tal es el caso de Lehtinen María y colaboradores (2006) señalan que a través del estrés oxidativo una vía de señalización, MST-FOXO. MST1 fosforila a las proteínas FoXO en un sitio conservado dentro del dominio forkhead que interrumpe su interacción con las proteínas 14-3-3, promoviendo la translocación

nuclear de FoxO, por lo tanto, induciendo la muerte celular en neuronas. Por otra parte, sería factible que en fibroblastos de FPI y NH, y líneas control se evaluaran para determinar cómo se encuentra FoxO y que modificaciones postraduccionales ocurren mediando el mecanismo de apoptosis, en este caso la fosforilación. Shukla Shatrunajay y colaboradores (2016) demostraron que también la acetilación de FoxO3a, aumenta su actividad transcripcional en células de hepatocarcinoma (HepG2) provocando disfunción mitocondrial mediada por BIM y PUMA, y apoptosis. Y así mismo, años atrás Brunet Anne y colaboradores (2004), demostraron que, en células de mamíferos FoxO3a en condiciones de estrés oxidativo, se encuentra acetilado trasladándose al núcleo, donde puede interactuar con SIRT1 para desacetilarse. En la mayoría de los casos, la actividad transcripcional de FoxO se eleva tras la desacetilación. En este trabajo no se pudo evaluar el estado de FoxO3a, aunque sería interesante para próximos trabajos de investigación, analizar las modificaciones postraduccionales de FoxO3a durante una exposición crónica de H₂O₂.

Por otro lado, como se ha reportado en la literatura científica, FoxO3a es el principal participante en la activación de genes destinados al mecanismo de apoptosis en situaciones de estrés oxidativo, donde la célula se ve comprometida a programar su muerte. Los genes evaluados en este trabajo fueron *Casp-3*, *BAX*, *BIM* y *PUMA*. La respuesta obtenida para la expresión de los genes *Casp-3* y *BAX*, no fue exactamente la misma, sin embargo, el comportamiento fue similar puesto que en las líneas control no existió mucha diferencia entre las estimuladas y las no estimuladas con el peróxido de hidrogeno, prácticamente tuvieron a la par, la misma expresión génica. Y de cierta forma, analizando que para FoxO3a también se observó el mismo comportamiento de estas tres líneas control, a excepción de la tercera línea control, la cual obtuvo mayor expresión con el H₂O₂. Pero, de forma general el peróxido de hidrogeno a la concentración de 650 µM durante 2 horas de exposición, no logro evidenciar una diferencia entre la expresión de una línea control cuando esta se somete al estímulo en comparación de la ausencia de este. Justo tiene que ver con la duración y/o con la misma concentración del estímulo ya que, por otro lado, en las líneas patológicas de FPI tanto para *Casp-3* como para *BAX* (**Figuras 8 y 9**), incluso se observa disminuida la expresión en presencia del estímulo. En un trabajo reportado por Fu Xiaohui y colaboradores (2019) reportaron que a bajas concentraciones de H₂O₂, para inducir estrés oxidativo en células madre del ligamento periodontal (PDLASC, por sus siglas en inglés) aun con un tiempo prolongado de exposición se activan ciertos mecanismos de protección contra la citotoxicidad, aumentando la expresión de algunos reguladores críticos antiapoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 como Creb; habrá que analizar la respuesta en fibroblastos de FPI y NH. Por otra parte, para las líneas patológicas de NH, hay un comportamiento heterogéneo en donde una de las líneas de NH, sobreexpresa el gen *BAX* con la presencia del H₂O₂. Mientras que para el gen *Casp-3*, no se vio efecto por parte del estímulo en ninguna de las dos líneas de NH. Esto debido a diversos factores, uno de ellos, puede ser la misma fisiopatología de la enfermedad que impide la sobreexpresión de *Casp-3* aún ante la exposición de un estímulo como lo es el peróxido de hidrogeno.

Por otra parte, para la expresión a nivel de gen de BIM, para las líneas control se obtuvo un resultado que se esperaba, dado que en las tres líneas control evaluadas, la sobreexpresión de BIM se vio en las líneas estimuladas en comparación con las que no. Así mismo, las líneas patológicas de NH tuvieron la misma respuesta. Dando por hecho que si tuvo un efecto el peróxido de hidrogeno para la sobreexpresión de este gen, tanto para las líneas control como para las líneas patológicas de NH. Sin embargo, en las líneas de FPI se obtuvo lo contrario. Hay que entender que son distintas patologías, y la regulación de un gen se ve implicada por su fisiopatología y/o bajo cierta resistencia para sobreexpresar un gen en condiciones de estrés. En el caso de la expresión de *PUMA* las primeras dos líneas control evaluadas no presentaron una gran diferencia en la expresión a nivel de gen con el estímulo en comparación a la ausencia de este. La misma situación ocurrió para las líneas patológicas de FPI, dado que la sobreexpresión de *PUMA* fue favorecida para aquellas que no fueron estimuladas. Esto demuestra que ante la diversidad de mecanismos que regulan a ciertos genes, las distintas

líneas control y patológicas, pueden responder de diferente manera aun siendo de la misma “categoría” (controles y patológicas), en este caso respondiendo de manera que BIM se sobreexpresó en ausencia del estímulo en controles y en líneas de FPI. Sin embargo, el comportamiento fue distinto en líneas patológicas de NH, las cuales si evidenciaron tener un efecto cuando fueron estimuladas con el peróxido de hidrogeno, observando la sobreexpresión de *BIM* a nivel de gen. Esto implica que deben realizarse muchas más evaluaciones de este tipo para tener definido el comportamiento y respuesta ante la exposición aguda de un estímulo estresante. Según Pickering Andrew y colaboradores (2013) a niveles nanomolares, el H₂O₂ es un estimulante del crecimiento y la proliferación celular mientras que, los niveles micomolares provocan una detención transitoria del crecimiento e indican alteraciones adaptativas protectoras en la expresión génica. A niveles milimolares y superiores, el H₂O₂, es claramente un oxidante tóxico que causa estrés oxidativo franco, que posteriormente activan los mecanismos de apoptosis o necrosis celular. Por esta razón, en la **Figura 12**, que presenta los resultados obtenidos en la expresión a nivel de gen para *SOD2*, que codifica para la peróxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD), una proteína de carácter antioxidante, capaz de disminuir la alta capacidad oxidante que tienen las ROS en las células. Lo cual en líneas control se vio ligeramente con mayor expresión en presencia del estímulo (H₂O₂). Para las líneas patológicas de FPI y NH fue todavía mayor la expresión cuando estas se sometieron al estímulo, demostrando la regulación positiva de este gen en condiciones de estrés oxidativo a niveles moderados de peróxido de hidrogeno.

En cuanto a los resultados que se obtuvieron del Western Blot para Citocromo C no se observó ninguna banda evidente, demostrando que por ciertos mecanismos de resistencia o de fisiopatología, en el caso de las líneas de FPI y NH, y en líneas control la proteína no está presente en el citosol, es decir, no se liberó el citocromo C de la mitocondria lo que podría estar indicando que el mecanismo de apoptosis se encuentre inactivo.

Por otra parte, en la expresión de caspasa 3 a nivel proteína, se apreció que hubo una mayor expresión en extracto citoplasmático y lisados totales de líneas control que en los extractos citoplasmáticos de líneas patológicas de FPI y NH, así mismo observando una mayor intensidad para las bandas representativas de líneas patológicas NH en comparación con las de FPI. Sin embargo, hay que tomar en cuenta al control de carga (GAPDH). Cabe recalcar, que las bandas que se evidenciaron son características de caspasa 3 en su estado inactivo, es decir, cuando aún no ha sido escindida por otras proteínas para iniciar la cascada de reacciones que catalizan y dan el comienzo de la muerte celular programada.

Mediante este estudio, se hizo presente que a través de la expresión génica y de algunas proteínas, existen moléculas de señalización sensibles a ROS que se activan y traducen el aumento del estrés oxidativo en la inducción de vías de señalización protectoras o apoptóticas así como lo establece Storz en 2011. Asaki y colaboradores en 2014, establecen que una función clave de los factores de transcripción FoxO es controlar la resistencia al estrés oxidativo mediante la regulación de los antioxidantes y el control de la calidad de las proteínas. Esto da comparativa a la teoría de la “hormesis” (del griego “poner en movimiento”) o respuesta adaptativa publicada por Zimmermann y colaboradores en 2014; indica que ante la exposición leve y periódica (pero no grave, ni crónica) a factores específicos característicos de condiciones perjudiciales como el envejecimiento y las enfermedades asociadas debería mejorar la capacidad de un organismo para hacer frente de manera estable a tales circunstancias adversas.

Sin embargo, los resultados obtenidos en las **Figuras 17 y 18** demostraron que aun con la exposición del H₂O₂ tanto en líneas control como en líneas de FPI y NH la expresión de Mn-SOD se vio menos favorecida, caso contrario a los resultados obtenidos en PCR donde a nivel de gen *SOD2* se sobre expresó favorablemente en aquellas líneas estimuladas tanto en controles como en células de FPI y NH. Diversos factores influyentes pudieron interferir en la expresión de la proteína para diferenciar y demostrar que efectivamente el H₂O₂ si es

una molécula que participa como un mensajero al intervenir en el estado de estrés de las células y por consiguiente favorecer la expresión de proteínas de carácter antioxidante como lo es la Mn-SOD.

Por otra parte, hay que considerar que Mn-SOD es una proteína que predominantemente se localiza en la mitocondria, pudiera ser que su expresión a nivel de proteína se evaluara y se visualizara de mejor forma en cierto organelo celular.

8. Conclusión

De acuerdo con lo discutido y analizado en este proyecto, se concluye que en gran medida la exposición con el H_2O_2 a las células control y de FPI y NH de alguna manera repercute en la expresión de FoxO3a a nivel de gen, además ante este estímulo se obtuvieron respuestas que se esperaban en cuanto a la expresión a nivel de gen de *SOD2*, gen que codifica a una de las proteínas de carácter antioxidante. Lo cual quiere decir que a nivel genético las células respondieron ante el H_2O_2 a una [650 μ M] durante 2 horas de exposición. De la misma forma para los genes Bax, BIM, PUMA se observó en algunos casos favorablemente su expresión en presencia del H_2O_2 .

Aunque, por otro lado, no se pudieron cumplir ciertos objetivos, ya que la expresión tanto de Citocromo C como de caspasa 3 fueron desfavorables, indicando que el mecanismo de apoptosis tanto en líneas control como en líneas de FPI y NH podría encontrarse inactivo, y aun cuando estas se estimularon con H_2O_2 la respuesta siguió siendo la misma a nivel de proteína.

Aunado a lo anterior, la respuesta por parte de las líneas analizadas, control y, de FPI y NH a nivel de gen su comportamiento se vio un poco favorecido de acuerdo con el objetivo general propuesto, concluyendo de alguna manera que FoxO3 puede favorecer la expresión de ciertos genes de carácter proapoptótico y además a uno de los genes evaluados que codifican para una proteína de carácter antioxidante como lo es la Mn-SOD. No obstante, cabe señalar que faltó analizar si su expresión se observa en las demás proteínas involucradas en el mecanismo de apoptosis o alguna otra proteína antioxidante, ya que a nivel proteico no se evidenció una respuesta favorable o diferencia ante el uso de una molécula oxidante como el H_2O_2 .

Ante este análisis, podemos aceptar la hipótesis propuesta ya que los resultados obtenidos en este estudio fueron favorables en ciertos casos a nivel de expresión genética con el H_2O_2 .

Cabe mencionar que, para futuras investigaciones, sería razonable llevar a cabo un análisis más amplio utilizando diferentes niveles de concentración y tiempo de exposición al estímulo e incluso repetir experimentos para obtener resultados estadísticos y con mayor certeza, para que finalmente se concluya si existe esta conjunción entre FoxO3a y ciertos genes en la activación del mecanismo de apoptosis u otros mecanismos relacionados y estudiados previamente en la literatura científica.

9. Referencias

- ❖ Akasaki, Y., Alvarez, O., Saito, M., Caramés, B., Iwamoto, Y., & Lotz, M. (2014). FOXO transcription factors support oxidative stress resistance in human chondrocytes. *Arthritis & Rheumatology*, *66*(12), 3349-3358.
- ❖ Alateyah, N., & Gupta, I. (2022). SOD2, a Potential Transcriptional Target Underpinning CD44-Promoted Cancer Progression. *Molecules*, *27*(811), 1-15.
- ❖ Al-Tamari, H., Dabral, S., Schmall, A., Sarvari, P., Ruppert, C., Paik, J., . . . Savai, R. (2018). FoxO3a an important player in fibrogenesis and therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(2), 276-293.
- ❖ Antoine, M., & Malika, M. (2023). *Interstitial Lung Disease*. StatPearls Publishing LLC.
- ❖ Anwar, J., Tai, W., & Balakrishnan. (2022). Updates in Hypersensitivity Pneumonitis: A Narratve Review. *Current Pulmonology Reports*, *11*, 106-115.
- ❖ Brunet, A., Sweeney, L., Fitzhung, J., Chua, K., Greer, P., Lin, Y., . . . Greenberg, M. (2004). Stress-dependend regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5666), 2011-2015.
- ❖ Churg, A. (2022). Hypersensitivity pneumonitis: new concepts and classifications. *Modern Pathology*, *35*(1), 15-27.
- ❖ Dai, H., Ping, Y., Ramirez, M., & Kaufmann, S. (2014). Evaluation of the BH3-only Protein Puma as a Direct Bak Activator. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(1), 89-99.
- ❖ Dejean, L., & Manon, S. (2017). New Insights on the Regulation of Programmed Cell Death Bcl-2 Family Proteins at the Mitochondria: Physiological and Pathophysiological Implications. En T. Rostovtseva (Ed.), *Molecular Basis for Mitochondrial Signaling* (págs. 253-283). Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Springer.
- ❖ Dickinson, B., & Chang, C. (2012). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol*, *7*(8), 504-511.
- ❖ Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, *35*(4), 495-516.
- ❖ Fasano, C., Disciglio, V., Bertora, S., Lepore, M., & Simone, C. (2019). FoxO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells*, *8*(1110), 1-28.
- ❖ Fu, X., Feng, Y., Shao, B., & Zhang, Y. (2019). Activation of the ERK/Creb/Bcl-2 phathway protects periodontal ligament stem cells against hydogen peroxide-induced oxidative stress. *Molecular Medicine Reports*, *19*(5), 3649-3657.
- ❖ Fukai, T., & Ushio, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(6), 1583-1606.
- ❖ Hagenbuchner, J., Kuznetsov, A., Herman, M., Hausott, B., Obexer, P., & Ausserlechner, M. (2012). FoxO3-induced reactive oxygen species are regulated by BCL2L11 (Bim) and SESN3. *Journal of Cell Science*, *125*(5), 1191-1203.

- ❖ Johnson, A., & Ann, L. (2013). Apoptosis and Angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)*, 27(10), 3893-3901.
- ❖ Keane, M., Arenberg, D., & Lynch III, J. (1997). The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulated angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 3(159), 1437-1443.
- ❖ Ketelut, N., & Fitzgerald, K. (2022). Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis-Oh My! The Many ways a Cell Can Die. *Journal of Molecular Biology*, 434(4), 1-24.
- ❖ Klotz, L., Sánchez, C., Prieto, I., Ubánek, P., Steinbrenner, H., & Monsalve, M. (2015). Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biology*, 6, 51-72.
- ❖ Kuwano, K., Hagimoto, N., & Kawasaki, M. (2000). Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, 1(104), 13-19.
- ❖ Kuwano, K., Hagimoto, N., & Maeyama, T. (2002). Mitochondria-mediated apoptosis of lung epithelial cells in idiopathic interstitial pneumonias. *Lab Invest*, 82(12), 1695-1706.
- ❖ kuwano, K., Kunitake, R., & Maeyama, T. (2001). Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2(280), 16-25.
- ❖ Lehtinen, M., Yuan, Z., Boag, P., Yang, Y., Villén, J., Becker, E., . . . Bonni, A. (2006). A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress Responses and Extends Life Span. *987-1001*, 125(5).
- ❖ Liu, Y., Ao, X., Ding, W., Ponnusamy, M., Wu, W., Hao, X., . . . Wang, J. (2018). Critical role of FOXO3A in carcinogenesis. *Molecular Cancer*, 17(104), 1-12.
- ❖ Lopez, O. C., Blasco, M., Patridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell Press*, 186(2), 243-278.
- ❖ Malishev, R., Ben-Zichri, S., Oren, O., Shauloff, N., Peretz, T., Taube, R., & Papo, N. (2020). The pro-apoptotic domain of BIM protein forms toxic amyloid fibrils. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 2145-2155.
- ❖ Maliza, O., & Arias, W. (2023). Actualización en el Diagnóstico y Tratamiento de la Fibrosis Pulmonar Idiopática: Revisión Bibliográfica. *Ciencia Latina Internacional Revista Científica Multidisciplinar*, 7(2), 4385-4404.
- ❖ Meyer, K. (2017). Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Expert Review of respiratory medicine*, 11(5), 343-359.
- ❖ Moss, B., Ryter, S., & Rosas, I. (2022). Pathogenic Mechanisms Underlying Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Annual Review of Pathology. Mechanisms of Disease*, 17(2), 515-546.
- ❖ Nie, Y., Sun, L., Wu, Y., Yang, Y., Wang, J. H., Hu, Y., . . . Qian, F. (2017). AKT2 Regulates Pulmonary Inflammation and Fibrosis via Modulating Macrophage Activation. *The Journal of Immunology*, 198(11), 4470-4480.
- ❖ Noble, P., Homer, R., & MD, P. (2004). Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis. *Clin Chest Med*, 25, 749-758.
- ❖ Pardo, A., Selman, M., Rojas, M., & Mora, A. (2017). Emerging therapies for Idiopathic Pulmonary Fibrosis, a progressive age-related disease. *Nature Reviews*, 16(11), 755-772.

- ❖ Peng, D., Fu, M., Wang, M., Wei, Y., & Wei, X. (2022). Targeting TGB-B signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Molecular Cancer*, 21(1), 1-20.
- ❖ Pickering, A., Vojtovich, L., Tower, J., & Davies, K. (2013). Oxidative Stress Adaptation with Acute, Chronic and Repeated Stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 55, 109-118.
- ❖ Ramírez, M., Márquez, H., Barranco, G., & López, J. (2014). Bcl-2: su papel en el ciclo celular apoptosis y cáncer. *El Residente*, 9(3), 84-94.
- ❖ Santucci, R., Sinibaldi, F., Cozza, P., Polticelli, F., & Fiorucci, L. (2019). Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136(1), 1237-1246.
- ❖ Selman, M., & Pardo, A. (2024). Idiopathic Pulmonary Fibrosis: From Common Microscopy to Single-Cell Biology and Precision Medicine. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 209(9), 1074-1081.
- ❖ Selman, M., Alarcon, D., Ruiz, A., Chavez, L., & Roldan, B. (2024). GDF15 as a potential biomarker to distinguish fibrotic from non-fibrotic hypersensitivity pneumonitis. *Scientific Reports*, 14(859), 1-6.
- ❖ Selman, M., Pardo, A., E, T., & King, J. (2012). Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *American Journal of respiratory and critical care medicine*, 186(4), 314-324.
- ❖ Selman, M., Pardo, A., Peljto, A., Blumhagen, R., Walts, A., Cardwell, J., . . . Kennedy, M. (2023). Idiopathic Pulmonary Fibrosis Is Associated with Common Genetic Variants and Limited Rare Variants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 5(9), 1194-1202.
- ❖ Seonghun, R., & Herget, P. (2014). FoxO3a and disease progression. *World Journal of Biological Chemistry*, 5(3), 346-354.
- ❖ Shukla, S., Sharma, A., Kumar, V., Raisuddin, S., & Kakkar, P. (2016). Concurrent acetylation of FoxO1/3a and p53 due to sirtuins inhibition elicit Bim/PUMA mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in berberine-treated HepG2 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 291, 70-83.
- ❖ Simoes, V., Felix, F., & Humberto da Silva, D. (2023). FoxO3 and oxidative stress: a multifaceted role in a cellular adaptation. *Journal of Molecular Medicine*, 101, 83-99.
- ❖ Spagnolo, P., Kropski, J., Jones, M., Joyce, L., Rossi, G., Karampitsakos, T., . . . Ryerson, C. (2022). Idiopathic pulmonary fibrosis: disease mechanisms and drug development. *Pharmacol Ther*, 222, 1-24.
- ❖ Storz, P. (2011). Forkhead Homeobox Type O Transcription Factors in the Responses to Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(4), 593-605.
- ❖ Tamari, H., Dabral, S., Schmall, A., Sarvari, P., Ruppert, C., Paik, J., . . . Pullamseti, S. (2018). FoxO3 an important player in fibrogenesis and therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis. *EMBO Molecular Medicine*, 10(2), 276-293.
- ❖ Undurraga, Á. (2015). Fibrosis Pulmonar Idiopática. *Rev. Med. Clin.*, 26(3), 292-301.
- ❖ Vasakova, M., Selman, M., Morell, F., Sterclova, M., Molina, M., & Raghu, G. (2019). Hypersensitivity Pneumonitis: Current Concepts of Pathogenesis and Potential Targets for Treatment. *American Journal of Respiratory and Critical care Medicine*, 200(3), 301-308.

- ❖ Vieira, F., Padín, M., Alberto, V., Lorenzo, A., Saavedra, P., Chamorro, C., . . . Pérez, M. (2022). Caspase 3 and Cleaved Caspase 3 Expression in Tumorigenesis and Its Correlations with Prognosis in Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11937), 1-16.
- ❖ Vivar, R., Humeres, C., Anfossi, R., Bolivar, S., Catalán, M., Hill, J., . . . Diaz, G. (2020). Role of FoxO3a as a negative regulator of the cardiac myofibroblast conversion induced by TGF-B1. *BBA-Molecular Cell Research*, 1867(7), 1-13.
- ❖ Warren, C., Wong, M., & Bowden, N. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death & Disease*, 10(3), 1-12.
- ❖ Xaubet, A., Molina, M., & Sánchez, M. (2007). Enfermedades pulmonares intersticiales difusas. *Arch Bronconeumol*, 43(2), 24-30.
- ❖ Xin, Z., Ma, Z., Hu, W., Jiang, S., Yang, Z., Li, T., . . . Yang, Y. (2018). FOXO1/3: Potential suppressors of fibrosis. *Ageing Research Reviews*, 41, 42-52.
- ❖ Yuan, Z., Dewson, G., Czabotar, P., & Birkinshaw. (2021). VDAC2 and the BCL-2 family of proteins. *Biochemical Society Transactions*, 49(6), 2787-2795.
- ❖ Zimmermann, A., Bauer, M., Kroemer, G., Madeo, F., & Carmona, D. (2014). When less is more: hormesis against stress and disease. *Microbial cell*, 1(5), 150-153.

10.Apéndice

Anticuerpo primario	Dilución de anticuerpo primario	Empresa y número de catalogo
Anti-procaspasa 3	1: 1000	Santa Cruz sc-56053
Anti- GAPDH	1: 1000	Santa Cruz sc-47724
Anti-Mn SOD	1: 2000	Enzo Life Sciences ADI-SOD-111
Anti-citocromo C	1: 1000	Santa Cruz Sc-7159

Tabla 1. Información y detalles de anticuerpos primarios utilizados.