

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- UNIDAD XOCHIMILCO  
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL LLEVADO A CABO EN INSTITUTO  
NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO  
VILLEGAS”**

**INTERACTOMA DE FOXO3a EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON  
FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA Y SUJETOS CONTROL Y SU  
ASOCIACIÓN CON EL ENVEJECIMIENTO**

**ASESORES:**

**Interno:** Dra. Julia Pérez Ramos

*Julia Pérez R.*

**Externo:** Dra. Iliana Herrera Fuentes

*Iliana*

**Nombre de la alumna:** Jaqueline Rosas Barrera

**Fecha de realización:** 14 de marzo de 2022 al 14 de septiembre de 2022

Ciudad de México a 11 de noviembre de 2022

## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	3
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	5
<b>3. Hipótesis</b> .....	5
<b>4. Objetivos</b> .....	6
<b>4.1 Objetivo General:</b> .....	6
<b>4.2 Objetivos Específicos:</b> .....	6
<b>5. Marco teórico</b> .....	6
<b>5.1 Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)</b> .....	6
<b>5.1.1 Incidencia y prevalencia</b> .....	7
<b>5.1.2 Fenotipos clínicos de la FPI</b> .....	7
<b>5.1.3 Patogénesis</b> .....	8
<b>5.1.3.1 Interacciones ambientales y genéticas</b> .....	8
<b>5.1.4 Terapias</b> .....	11
<b>5.2 FOXO</b> .....	13
<b>5.2.1 Estructura</b> .....	13
<b>5.2.2 Propiedades de las proteínas FOXO de mamíferos</b> .....	15
<b>5.2.3 Genes blanco</b> .....	16
<b>5.2.4 Regulación</b> .....	17
<b>5.2.5 Modificaciones postraduccionales</b> .....	19
<b>5.2.5.1 Fosforilación de FOXO</b> .....	19
<b>5.2.5.2 Proteínas quinasas Akt/SGK</b> .....	20
<b>5.2.5.3 Acetilación de FOXO</b> .....	21
<b>5.2.5.4 Poliubiquitinación</b> .....	22
<b>5.2.5.5 Metilación de arginina</b> .....	22
<b>5.2.5.6 Glicosilación de FOXO</b> .....	23
<b>5.2.6 Su relación con la longevidad</b> .....	25
<b>5.2.7 FOXO: una posible diana terapéutica</b> .....	27
<b>5.3 Técnicas moleculares empleadas para el análisis de expresión de FOXO3a</b> ...	29
<b>5.3.1 Western Blot (inmunotransferencia)</b> .....	29
<b>5.3.1.1 Factores que interfieren en el diseño experimental</b> .....	30

5.3.1.2 Aplicaciones científicas de Western Blot .....	31
5.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) .....	31
5.3.2.1 Los elementos importantes en la reacción .....	32
5.3.2.2 Etapas principales de las que se compone la PCR .....	32
5.3.2.3 PCR en tiempo real: fundamentos .....	33
5.3.2.4 Métodos para detectar los productos amplificados .....	34
5.3.3 Determinación de la viabilidad celular .....	37
5.3.3.1 Reactivo de proliferación celular WST-1 .....	38
6. Metodología .....	39
6.1 Materiales y Métodos .....	39
7. Resultados .....	44
8. Discusión .....	49
9. Conclusiones .....	51
10. Referencias .....	52

# INTERACTOMA DE FOXO3a EN FIBROBLASTOS DE PACIENTES CON FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA Y SUJETOS CONTROL Y SU ASOCIACIÓN CON EL ENVEJECIMIENTO

Dra. Julia Pérez Ramos<sup>1</sup>, Dra. Iliana Herrera Fuentes<sup>2</sup> y Jaqueline Rosas Barrera<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Sistemas Biológicos, CBS.

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma Metropolitana, CBS.

Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco

Calz. de Tlalpan 4502, 14080 Ciudad de México, México.

G-mail: [jperez@correo.xoc.uam.mx](mailto:jperez@correo.xoc.uam.mx)/[iliany23@yahoo.com.mx](mailto:iliany23@yahoo.com.mx)/[rosj0489@gmail.com](mailto:rosj0489@gmail.com)

---

## 1. Introducción

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad crónica progresiva de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de focos fibroblásticos y la generación incontrolada de matriz extracelular, las cuales son respuestas tisulares primarias a la lesión (Tomasek et al., 2002; Wynn, 2007; Hardie et al., 2009; Liu et al., 2010). La FPI pertenece a un subgrupo de enfermedades pulmonares del parénquima difuso (DPLD) de origen desconocido, representadas por las neumonías intersticiales idiopáticas (II). La progresión de la enfermedad es muy variable en la FPI. Si bien la mortalidad de 3 a 5 años es del 50%, siendo muy variable con algunos pacientes que viven hasta 10 años después del diagnóstico (KING et al., 2001). El curso de la enfermedad también es variable, desde pacientes que permanecen estables durante períodos prolongados de tiempo hasta otros que experimentan una progresión rápida y gradual con mortalidad acelerada (Boon et al., 2009). Los factores de transcripción juegan un papel clave en la orquestación de una gran cantidad de mecanismos celulares y el control de la homeostasis celular (Spreitzer et al., 2022). La información codificada en el genoma es interpretada por factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) para decidir el destino celular y establecer planes corporales complejos (Lambert et al., 2018; Spitz & Furlong, 2012). Además de funcionar en el desarrollo y la diferenciación, los TF controlan vías específicas en respuesta a diversos estímulos, como la respuesta inmune, la



respuesta al estrés o el censo de nutrientes (Singh et al., 2014; Estruch, 2000; Hart, 2019). Por lo general, los TF reconocen pequeñas secuencias de ADN degenerado de 6-12 pb de largo en regiones reguladoras, pero la forma en que los TF impactan la transcripción sobre la unión al ADN varía considerablemente (Lambert et al., 2018; Wingender et al., 2015). Muchos TF albergan pequeños dominios discretos, que les permiten unirse al ADN (Harrison, 1991). Sobre la base de las relaciones de secuencia de aminoácidos y las estructuras tridimensionales de los dominios de unión al ADN, los TF se pueden agrupar en familias (Harrison, 1991). Las familias TF incluyen proteínas de dominio hélice-giro-hélice (HTH) (Brennan & Matthews, 1989), proteínas de dominio de dedos de zinc (Klug & Rhodes, 1987), la bobina enrollada con cremallera de leucina (Landschulz et al., 1988) o la hélice alada, que también se conoce como Forkhead (FH) (Weigel & Jackle, 1990).

Los TF FOXO, se consideran supresores tumorales debido a sus funciones en la detención del ciclo celular (Katayama et al., 2008; Medema y otros, 2000; Tran et al., 2002; Dansen y Burgering, 2008), apoptosis (Brunet et al., 1999; Essafi et al., 2005), senescencia (de Keizer et al., 2010), diferenciación, reparación del daño del ADN (Tran et al., 2002) y eliminación de especies reactivas de oxígeno. La familia FOXO en mamíferos está conformada por cuatro miembros; FOXO1, FOXO3a, FOXO4 y FOXO6 (Spreitzer et al., 2022). Se ha demostrado que la familia de proteínas de los factores de transcripción de la subfamilia O de Forkhead Box, o FOXO, desempeña un papel importante en la longevidad (Greer & Brunet, 2005). Las funciones de las proteínas de la familia FOXO, en particular sus actividades transcripcionales, están moduladas por modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés), que incluyen fosforilación, acetilación, ubiquitinación, metilación y glicosilación. Estas PTM son catalizadas por enzimas con varios mecanismos y ocurren en respuesta a diferentes estímulos celulares, que a su vez regulan la localización subcelular de las proteínas de la familia FOXO, así como su vida media, unión al ADN, actividad transcripcional y capacidad para interactuar con otras proteínas celulares (Zhao et al., 2011). En el presente trabajo de investigación se realizó una revisión bibliográfica referente a la fibrosis pulmonar idiopática y a los

factores de transcripción FOXO, de manera experimental se llevó a cabo un análisis de FOXO3a en muestras fibróticas provenientes de pacientes con FPI; a nivel proteico y genético, para determinar su expresión y su relación con el envejecimiento.

## **2. Planteamiento del problema**

Han surgido algunas propuestas para esclarecer los mecanismos patogénicos respecto a la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la hipótesis predominante sostiene que la fibrosis es precedida y provocada por un proceso inflamatorio crónico que lesiona el pulmón y modula la fibrogénesis pulmonar, dando lugar a la cicatriz fibrótica terminal (Selman, 2001), sin embargo, aún se encuentran vertientes por aclarar, es por ello que se han realizado diversos esfuerzos en el estudio de los factores de transcripción de la familia FOXO y sus modificaciones postraduccionales implicadas para los diversos procesos celulares entorno a la FPI, con el objetivo en común de encontrar posibles dianas terapéuticas, y como consecuencia surge el interés de estudiar y analizar a nivel celular y genético la expresión del factor de transcripción FOXO3a; el cual está implicado en la longevidad y la regulación positiva de los genes diana involucrados en la resistencia al estrés, el metabolismo, la detención del ciclo celular y la apoptosis, con la finalidad de encontrar la relación que existe entre de dicho factor de transcripción con la FPI y el envejecimiento, y así, de esta manera, contribuir a la investigación entorno a discernir sobre las posibles dianas terapéuticas en esta patología para encontrar nuevas terapias efectivas.

## **3. Hipótesis**

Debido a que el factor de transcripción FOXO3a está asociado a múltiples funciones celulares; reparación del ADN dañado, arresto del ciclo celular, supervivencia, desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS), apoptosis, entre otras más, se cree que puede encontrarse sobre expresado en fibroblastos de

pulmón de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y modificar la expresión de genes blanco asociados a envejecimiento.

## 4. Objetivos

**4.1 Objetivo General:** Evaluar la expresión de FOXO3a y su localización celular para comprender su función en la regulación de genes que están involucrados con el fenotipo fibrótico de fibroblastos provenientes de pacientes con FPI y pacientes control.

### 4.2 Objetivos Específicos:

- Evaluar la expresión de FOXO3a a nivel de gen con sondas Taqman específicas en fibroblastos provenientes de pacientes con FPI y pacientes control, mediante técnica de PCR en tiempo real.
- Examinar la expresión de genes blanco de FOXO3a asociados al envejecimiento, mediante técnica de PCR en tiempo real.
- Analizar si existe diferencia en la expresión de FOXO3a en extractos totales, nucleares y citoplasmáticos de fibroblastos provenientes de pacientes con FPI y pacientes control, mediante técnica de Western Blot.
- Realizar un estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel celular y determinar si bajo dicho estímulo se modifica la expresión y localización celular de FOXO3a.

## 5. Marco teórico

### 5.1 Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la forma más común de neumonía intersticial idiopática, es una enfermedad pulmonar crónica, progresiva, irreversible y generalmente letal de causa desconocida. La FPI ocurre en adultos de mediana edad y ancianos (edad mediana al diagnóstico de 66 años, rango 55-75 años), se limita al pulmón y se asocia con un patrón histopatológico o radiológico típico de la neumonía intersticial habitual (King, Pardo & Selman, 2011). Los pacientes con FPI tienen una supervivencia estimada de sólo 3 a 5 años. La mortalidad es causada

por insuficiencia respiratoria progresiva debido a un proceso fibrótico incesante que no responde a los agentes terapéuticos (van Moorsel et al., 2010).

La historia natural de la FPI se ha caracterizado como un trastorno pulmonar constante o de progresión lenta, y la mayoría de los pacientes siguen este patrón. Sin embargo, hallazgos recientes indican que la FPI es una enfermedad heterogénea y se están describiendo nuevos fenotipos clínicos con distintos patrones de supervivencia. Los mecanismos patogénicos no son claros, pero una creciente evidencia indica que la enfermedad es el resultado de un comportamiento anormal de las células epiteliales alveolares que provocan la migración, proliferación y activación de las células mesenquimales, con la formación de focos de fibroblastos y miofibroblastos. Los miofibroblastos activados secretan cantidades exageradas de moléculas de matriz extracelular con la consiguiente destrucción de la arquitectura pulmonar (Selman et al., 2010; King, Pardo & Selman, 2011).

### **5.1.1 Incidencia y prevalencia**

Según una declaración de consenso llevada a cabo por American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS); se desconoce la incidencia y prevalencia precisas de la FPI. Las estimaciones de prevalencia previas para la FPI variaron de 3 a 6 casos por 100.000 en la población general. Un estudio poblacional más reciente para todas las enfermedades pulmonares intersticiales en la población del condado de Bernalillo, Nuevo México, reveló una prevalencia de 20.2 casos por 100,000 para los hombres y 13.2 casos por cada 100,000 para las mujeres con FPI (ATS & ERS, 2000).

### **5.1.2 Fenotipos clínicos de la FPI**

La enfermedad tiene un largo período asintomático (de meses a años). Los pacientes consultan cuando la gravedad de las lesiones pulmonares alcanza un umbral suficiente para provocar síntomas. La mayoría de los pacientes siguen un declive clínico y funcional relativamente lento (lentamente progresivo) después del diagnóstico. Alrededor del 10% de estos pacientes presentan episodios de deterioro clínico agudo (exacerbaciones agudas) que preceden y posiblemente inician la fase

terminal de su enfermedad. Unos pocos pacientes tienen una enfermedad de corta duración con un curso clínico rápidamente progresivo. Los fumadores empedernidos pueden desarrollar fibrosis pulmonar combinada con enfisema, con una supervivencia más corta en comparación con los pacientes con FPI sola (King, Pardo & Selman, 2011).

### **5.1.3 Patogénesis**

La reacción fibrótica progresiva en la FPI se ha asociado con un proceso activado por fibroblastos dependiente del epitelio y una respuesta deficiente a la terapia antiinflamatoria. Sin embargo, los mecanismos inmunitarios adaptativos desregulados y la inflamación posterior podrían tener un papel en el inicio o la progresión de la enfermedad en un subgrupo de pacientes con FPI. Por lo tanto, al menos dos vías celulares diferentes, la vía inflamatoria y la vía epitelial, podrían conducir a la fibrosis pulmonar (King, Pardo & Selman, 2011).

#### **5.1.3.1 Interacciones ambientales y genéticas**

Varios factores ambientales pueden contribuir a la lesión epitelial y la apoptosis, incluido el tabaquismo y la microaspiración silenciosa crónica. Además, la infección viral crónica, principalmente la infección por el virus del herpes podría contribuir a la patogénesis de la FPI. No existen factores genéticos asociados consistentemente con la FPI esporádica, sin embargo, en la investigación se ha mostrado cierto interés por la proteína surfactante C; una proteína hidrofóbica expresada exclusivamente por AEC tipo II (células epiteliales alveolares tipo II), ya que, las mutaciones sin sentido o de delección corta de esta proteína dan como resultado la producción de proteína mal plegada que, por acumulación o formación de complejos, puede causar daño a las células epiteliales. Por otro lado, polimorfismos presentes en genes reguladores de algunas proteínas se ven involucrados con la patogénesis de FPI, como es el caso de MUC5B; es una mucina formadora de gel expresada por las células epiteliales bronquiales. La expresión desregulada de MUC5B se asocia con enfermedad crónica de las vías respiratorias y estos hallazgos sugieren un papel en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática (King, Pardo & Selman, 2011).

Los ligandos Wnt comprenden una gran familia de glicoproteínas (ricas en cisteína y altamente hidrofóbicas) esenciales secretadas para los procesos morfogénicos. Los resultados de varios estudios indican que el epitelio alveolar y los fibroblastos sobreexpresan miembros de la vía Wnt/wingless en los pulmones afectados por la FPI. Además, hay una gran acumulación nuclear de  $\beta$  catenina en AEC y fibroblastos, lo que sugiere que la vía Wnt- $\beta$ -catenina está activada en ambos tipos de células (King, Pardo & Selman, 2011).

El homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) es crucial para el desarrollo. En adultos, PTEN participa en la regulación de procesos fisiológicos como la polaridad celular, la proliferación y la apoptosis. En pacientes con FPI, la expresión de PTEN está disminuida en miofibroblastos dentro de focos fibroblásticos, lo que podría explicar su supuesta resistencia a la apoptosis. La interacción colágena-integrina  $\beta 1$  en fibroblastos normales activa PTEN, que también es un regulador de crecimiento negativo, mientras que este mecanismo de retroalimentación negativa es defectuoso en fibroblastos (King, Pardo & Selman, 2011).

El erizo sónico (Shh) es un morfógeno esencial para la formación de patrones durante la embriogénesis. Este ligando de desarrollo permite que las células eviten la apoptosis y la detención del ciclo celular, lo que les confiere una ventaja proliferativa. En los pulmones afectados por la FPI, se notificó una fuerte expresión de Shh, principalmente en las células epiteliales en forma de panal en los bordes de los quistes (King, Pardo & Selman, 2011).

Las proteínas morfogénicas óseas pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y tienen un papel fundamental en el desarrollo embrionario y postnatal. En adultos, la reactivación de la expresión de antagonistas de proteínas morfogénicas óseas puede contribuir a la progresión de algunas enfermedades crónico-degenerativas. Se ha notificado un aumento de la expresión de gremlin 1 (Grem1), un potente antagonista de la proteína morfogénica ósea, en los fibroblastos de los pulmones afectados por la FPI. El aumento de las concentraciones de gremlin 1 (Grem1) podría atenuar la fosforilación mediada por la señalización de proteínas morfogénicas óseas en los pulmones, lo que lleva a

un aumento de la transición epitelio mesénquima (EMT) inducida por  $TGF\beta_1$  y a una disminución de la apoptosis de los miofibroblastos (King, Pardo & Selman, 2011). De acuerdo con King, Pardo & Selman, la regulación positiva de Wnt, Shh y gremlin 1 (Grem1) y la regulación negativa de PTEN son pruebas importantes que indican que la FPI podría ocurrir como parte de la recapitulación de las vías de desarrollo, contribuyendo así a un proceso de reparación inadaptado, algunos mecanismos propuestos involucrados en la patogenia de la fibrosis pulmonar idiopática se pueden observar esquematizados en la figura 1.

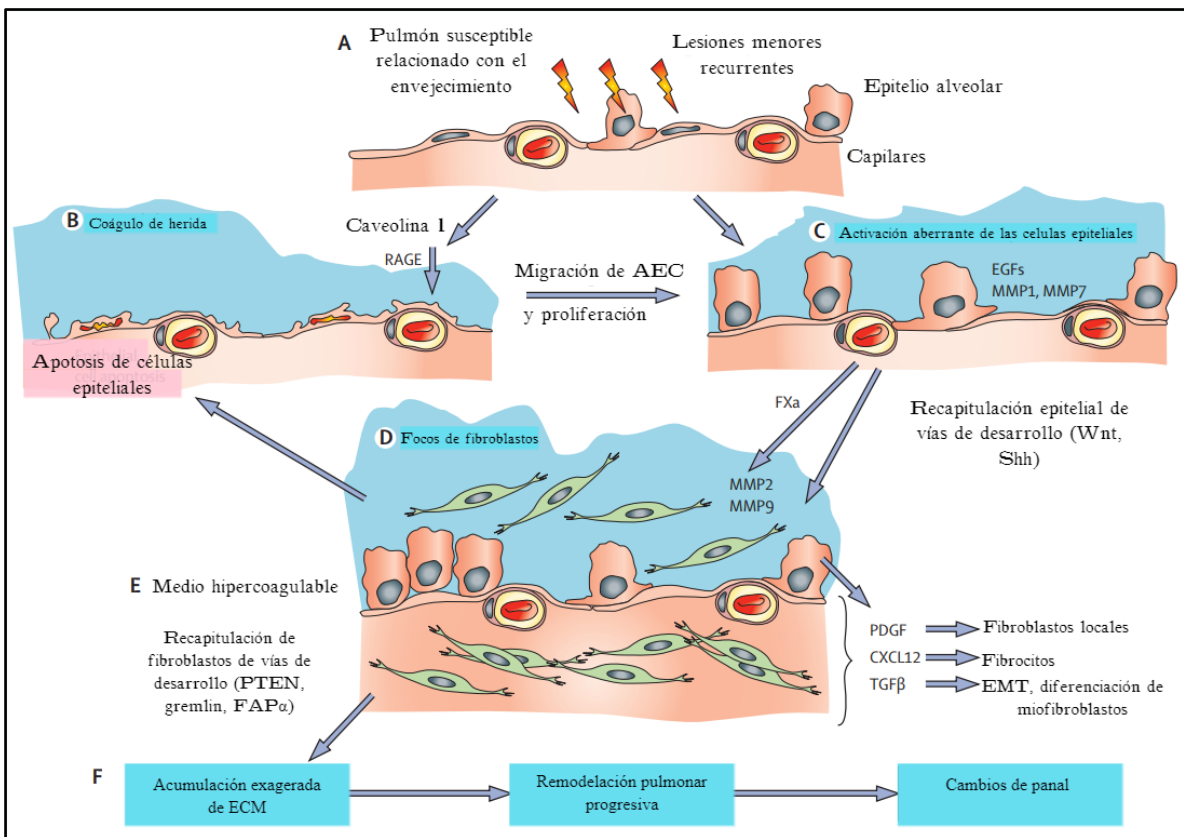


Figura 1. Mecanismos propuestos involucrados en la patogenia de la fibrosis pulmonar idiopática (adaptación de King, Pardo & Selman, 2011). Abreviaturas: AEC = células epiteliales alveolares. CXCL12 = ligando de quimiocina CXC 12. ECM = matriz extracelular. EGF = factor de crecimiento epitelial. EMT=transición epitelial-mesenquimatoso. FVIIa=Factor VIIa. FX=Factor X. FXa=Factor X activado. FAPα = proteína de activación de fibroblastos α. MMP = metaloproteinaso de matriz. PDGF = factor de crecimiento derivado de plaquetas. PTEN = homólogo de fosfatasa y tensina. RAGE=receptor para productos finales de glicación avanzada. Shh = erizo sónico. TF=factor tisular.  $TGF\beta$ =factor de crecimiento transformante.



(A) En el paso inicial, el pulmón susceptible relacionado con el envejecimiento (p. ej., por cambios genéticos o epigenéticos, acortamiento anormal de los telómeros, capacidad regenerativa deficiente) es objeto de microlesiones repetitivas (es decir, virus, humo de cigarrillo, microaspiración) que provoca la muerte de células epiteliales tipo I y tipo II. (B) Después de las microlesiones y la apoptosis de las células epiteliales, el aumento de la permeabilidad vascular a las proteínas (p. ej., fibrinógeno, fibronectina) provoca la formación de una matriz provisional (coágulo de herida). (C) Este proceso patológico es seguido por la migración y proliferación bronquiolar y AEC en un esfuerzo frustrado de reparación pulmonar (es decir, activación aberrante de células epiteliales). Varios factores de crecimiento epidérmico (p. ej., factor de crecimiento de hepatocitos y factor de crecimiento derivado de hepatoma) participan en la respuesta proliferativa. Además, MMP1 y MMP7 contribuyen a la migración de células epiteliales. En este microambiente, las células epiteliales se activan de manera anormal (recapitulación epitelial de las vías de desarrollo) y producen diversos factores de crecimiento y quimiocinas, lo que induce la migración de fibroblastos residentes y progenitores de fibroblastos derivados de la médula ósea (fibrocitos) a los sitios donde se produjeron las microlesiones. Además, secretan y activan el TGF $\beta$ 1 latente, que promueve la EMT y la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos. (D) Juntas, y en proporciones desconocidas, estas células (fibrocitos, células mesenquimales locales y miofibroblastos derivados de EMT) participan en la formación del foco de fibroblastos y miofibroblastos. Las metaloproteinasas de matriz, como MMP2 y MMP9, contribuyen a la activación de TGF $\beta$  y a la ruptura de las membranas basales. (E) En el epitelio alveolar se ensambla el complejo TF-FVIIa-FX, con la subsiguiente activación de FX a FXa. Este estado de procoagulación provoca un medio hipercoagulable que evita la degradación de la matriz provisional y potencia un medio fibrogénico. Los fibroblastos y los miofibroblastos también son indicativos de la recapitulación de las vías de desarrollo. (F) En los focos, los miofibroblastos secretan cantidades excesivas de proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágenos fibrilares, y también pueden provocar una apoptosis epitelial adicional a través del peróxido de hidrógeno y otras moléculas. En esta remodelación pulmonar anormal progresiva, varias cicatrices vecinas, junto con la secreción desproporcionada de algunas enzimas (p. ej., MMP1) pueden provocar la formación de quistes en panal por fuerzas mecánicas.

#### 5.1.4 Terapias

El tratamiento de la FPI se ha basado en el concepto de que la inflamación conduce a lesiones y fibrosis, a pesar de la extensa investigación sobre la patogenia de la FPI, no se ha demostrado que alguna terapia mejore definitivamente la supervivencia o la calidad de vida, por lo que la terapia óptima para la FPI es polémica (Egan & Woodcock, 1996; McAnulty & Laurent, 1995). En 2011, la



American Thoracic Society, la European Respiratory Society, la Japanese Respiratory Society y la Latin American Thoracic Association publicaron directrices conjuntas para el tratamiento de la FPI basado en la evidencia (Raghu et al., 2011). La provisión de la "mejor terapia de apoyo" es uno de los enfoques principales para el manejo de la FPI y se recomienda a pesar de la fuerza variable en la evidencia de apoyo. Dichas terapias incluyen oxígeno suplementario para la hipoxemia en reposo, rehabilitación pulmonar y trasplante de pulmón en candidatos apropiados. La segunda categoría de tratamiento incluye el uso de agentes farmacológicos con intención terapéutica. Los medicamentos estudiados van desde agentes dirigidos a condiciones médicas comórbidas hasta aquellos destinados a detener la proliferación de fibroblastos (Loomis et al., 2013). Las opciones de tratamientos convencionales incluyen; corticosteroides, agentes inmunosupresores/citotóxicos (p. ej., azatioprina, ciclofosfamida) y agentes antifibróticos (p. ej., colchicina o d-penicilamina) solos o en combinación (Peters et al., 1993; Johnston et al., 1993; Panos et al., 1990; Douglas et al., 1998; Rennard et al., 1998).

De acuerdo con Talmadge et al., (2011); para varias terapias nuevas, existe evidencia que sugiere un beneficio clínico en pacientes con FPI de la N-acetilcisteína, un antioxidante, utilizada en combinación con prednisona y azatioprina, reduce la tasa de disminución de la capacidad vital forzada y difiere la capacidad de uso de monóxido de carbono después de 12 meses de tratamiento. Sin embargo, los cambios observados tienen un significado clínico incierto. La pirfenidona, un compuesto novedoso que inhibe el TGF $\beta$  in vitro, disminuyó la tasa de disminución de la capacidad vital y aumentó el tiempo de supervivencia libre de progresión durante 52 semanas.

Las células madre mesenquimales son una perspectiva prometedora para la regeneración de tejidos. Estas células migran al pulmón, adoptan un fenotipo similar al epitelio y reducen la fibrosis en pulmones de ratones lesionados por bleomicina. Se ha estudiado el potencial terapéutico de AEC tipo II derivadas de células madre embrionarias humanas en el modelo de ratón de lesión. Estas células se

diferenciaron en neumocitos tipo I y anularon la respuesta inflamatoria y fibrótica (Talmadge et al., 2011).

Las posibles estrategias terapéuticas futuras (y completamente no probadas) incluyen: agentes que inhiben citoquinas, proteasas, oxidantes o factores de crecimiento de fibroblastos; agentes antifibróticos; modificaciones dietéticas; administración intrapulmonar más eficiente de medicamentos a través de liposomas; difosfonatos; antioxidantes; inhibidores de las integrinas leucocitarias; y terapia génica (Hunninghake & Kalica, 1995; Loomis, 2013).

## 5.2 FOXO

FOXO es una subfamilia de factores de transcripción forkhead, que se conserva desde *Caenorhabditis elegans* hasta mamíferos. Los invertebrados tienen un gen FOXO, mientras que los mamíferos tienen cuatro miembros de la familia FOXO: FOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHRL1), FOXO4 (AFX) y FOXO6. En los mamíferos, los factores FOXO tienen una amplia gama de funciones orgánicas: promueven la supresión de tumores, el metabolismo de la glucosa, el metabolismo de los lípidos, la resistencia al estrés oxidativo, la detención del ciclo celular, la reparación del daño del ADN, la homeostasis energética, la autofagia y la apoptosis (Du & Zheng, 2021). La detención del ciclo celular y la apoptosis, dependientes de FOXO pueden ser críticas para el efecto supresor de tumores de estos factores de transcripción, mientras que la resistencia al estrés oxidativo inducida por FOXO puede participar en la extensión de la vida útil dependiente de FOXO. Las proteínas FOXO también regulan la diferenciación celular en la sangre, el músculo y el tejido adiposo, lo que puede contribuir a su papel en el desarrollo (Calnan & Brunet, 2008).

### 5.2.1 Estructura

Las proteínas FOXO tienen un dominio de unión al ADN (DBD) de hélice alada conservado conocido como dominio de Forkhead. Se unen a la doble cadena ADN como monómeros y reconocen dos secuencias de consenso, el elemento de unión a miembros de la familia DAF-16 (DBE) 5'-GTAAA(T/C)AA-3' y el elemento sensible a la insulina (IRE) 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3'. Además de la DBD, las proteínas

FOXO también llevan una señal de localización nuclear (NLS), una señal de exportación nuclear (NES) y un dominio de transactivación (TAD) C-terminal. Todas las isoformas (con excepción de FOXO6) comparten dos sitios de fosforilación dependientes de Akt conservados, que se encuentran carboxiterminal al dominio de unión al ADN de Forkhead, pero tienen sitios únicos en su extremo amino terminal (T. Murphy & J. Hu., 2013). Estas estructuras funcionales (ver figura 2), junto con numerosas modificaciones postraduccionales (PTM) en los dominios NLS y NES, controlan estrechamente la localización subcelular de FOXO y la actividad de transcripción y permiten su sofisticada regulación de diversos procesos biológicos (Cheng 2019; Du & Zheng, 2021).

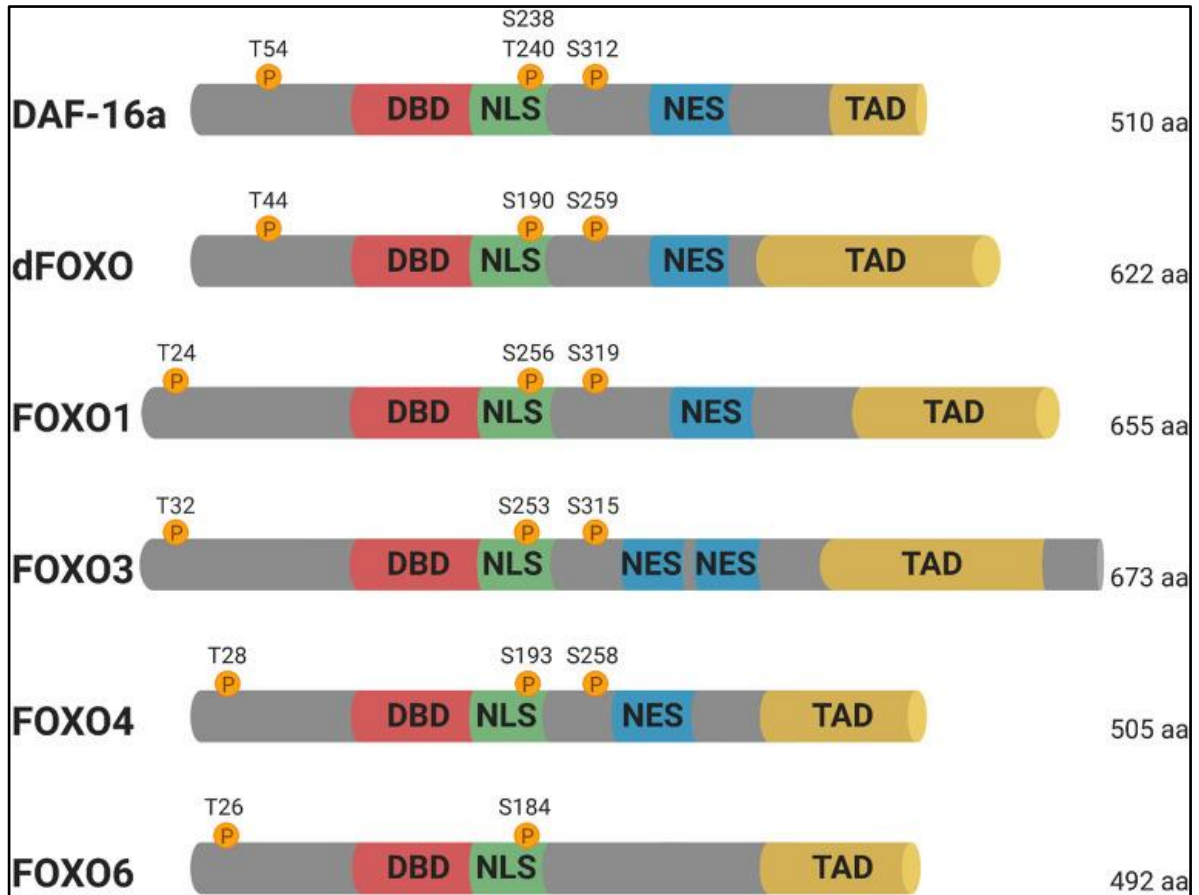


Figura 2. Dominios estructurales de las proteínas FOXO entre especies. Los miembros de la familia FOXO comparten un dominio de unión al ADN (DBD) de forkhead altamente conservado, una señal de localización nuclear (NLS), una o dos señales de exportación nuclear (NES) y un dominio de transactivación (TAD). FOXO6 no tiene una NES funcional. Las posiciones de los sitios de

fosforilación de Akt están indicadas por círculos. Los dos primeros sitios de fosforilación también sirven como motivos de unión para la proteína 14-3-3 (Du & Zheng, 2021).

### 5.2.2 Propiedades de las proteínas FOXO de mamíferos

Los genes FOXO humanos codifican proteínas con una longitud similar y un peso molecular predicho entre 54 y 72 kDa. Las proteínas FOXO constan de cuatro dominios, un dominio de unión a ADN de cabeza de horquilla altamente conservado que comprende 100 residuos de aminoácidos, una señal de localización nuclear (NLS) ubicada justo debajo del dominio de unión de ADN, un dominio de cabeza de horquilla de secuencia de exportación nuclear en el N terminal. Las isoformas de la familia FOXO; FOXO 1, 3a y 4 tienen mecanismos reguladores ascendentes superpuestos y específicos de la isoforma y muestran preferencias diferenciales para los genes diana. Cada vez se reconoce más que diferentes isoformas de FOXO desempeñan funciones no redundantes en diferentes tejidos. FOXO1, 3 y 4 se expresan en casi todos los tejidos. La expresión de FOXO 6 está restringida al sistema nervioso central y su localización subcelular no cambia significativamente por la señalización de PI3K/AKT (Link, 2019). Algunas propiedades de las isoformas de FOXO 1,3a, 4 y 6 se muestran en la Tabla 1.

	FOXO1	FOXO3a	FOXO4	FOXO6
Cromosoma	13	6	X	1
Aminoácidos	655	673	505	492
Peso Molecular (kDa)	70	72	54	61
Expresión	Ubicua	Ubicua	Ubicua	Sistema Nervioso
Localización	Núcleo/Citoplasma	Núcleo/Citoplasma	Núcleo/Citoplasma	Núcleo
Fenotipo de	Letal	Viable	Viable	Viable

ratones knock-out FOXO				
------------------------------	--	--	--	--

Tabla 1. Propiedades de las proteínas FOXO de mamíferos: ubicación en los cromosomas humanos, número de aminoácidos, peso molecular predicho en kDa, expresión en tejidos humanos, localización subcelular predominante y fenotipo de ratones knock-out FOXO, embrionarios letales o viables (adaptación de Link, 2019).

### 5.2.3 Genes blanco

Los factores FOXO se unen a un gran conjunto de promotores de genes diana y se ha demostrado que regulan la transcripción de genes incluso en ausencia de unión directa al ADN. La lista de genes diana de FOXO (ver Tabla 2) incluye genes implicados en el ciclo celular, la apoptosis, la autofagia, el mantenimiento y la diferenciación terminal de las células madre, la reparación del ADN, el metabolismo de la glucosa y los lípidos, la resistencia al estrés, la pluripotencia, la respuesta inmunitaria y otros procesos celulares (Link, 2019).

Gen blanco	Proceso celular	Gen blanco	Proceso celular
Bim	Apoptosis	Catalasa	Resistencia al estrés
Fasl	Apoptosis	Gadd45	Reparación de DNA
TRAIL	Apoptosis	LC3	Autofagia
PINK	Apoptosis	BNIP3	Autofagia
TNF	Apoptosis	IL7R	Sistema inmune
p27	Ciclo celular	CITED 2	Angiogénesis
p21	Ciclo celular	Caveolina 1	Señalización
Ciclina G2	Ciclo celular	InsR	Señalización

Plk	Ciclo celular	PI3K $\alpha$	Señalización
MnSOD	Resistencia al estrés	SESN3	Señalización
RICTOR	Señalización	KLF2	Diferenciación
PEPCK	Metabolismo	OCT4	Pluripotencialidad
G6PC	Metabolismo	SOX2	Pluripotencialidad
SOD2	Metabolismo	FBXO32,TRIM63	Proteostasis
IL-1 $\beta$	Inflamación	MDR1	Resistencia a las drogas
TLR4	Inflamación	RAG1	Respuesta inmune
C/EBP $\beta$	Diferenciación	RAG2	Respuesta inmune

Tabla 2. Genes blanco de proteínas FOXO de mamíferos (adaptación de Link, 2019; Morris et al.,2015; Link et al., 2017).

## 5.2.4 Regulación

Dado que las funciones celulares de FOXO son diversas y, en algunos casos, antagónicas, es probable que la actividad de estos factores de transcripción esté controlada de forma diferencial en tejidos específicos. Los factores de transcripción FOXO están regulados por una amplia gama de estímulos externos, como la insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), otros factores de crecimiento, neurotrofinas, nutrientes, citoquinas y estímulos de estrés oxidativo. Estos estímulos controlan los niveles de proteína FOXO, la localización subcelular (ver Tabla 3; figura 3), la unión al ADN, la estabilidad y la actividad transcripcional. La regulación de FOXO se logra mediante modificaciones postraduccionales (PTM), que incluyen fosforilación, acetilación, mono y poliubiquitinación y posiblemente otras modificaciones aún por identificar (Calnan & Brunet, 2008). Por otro lado, cada vez hay más pruebas de que los miARN (pequeños ARN reguladores que controlan la expresión de un gran número de genes) son reguladores clave de los genes implicados en la fibrosis en órganos, como el corazón, el riñón y el hígado. Se ha

demostrado la participación de Let-7 y miR-21 en la fibrosis pulmonar mediante la regulación de la EMT y la actividad de señalización del factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ , respectivamente (Cushing et al., 2011)

<b>Relocalización de FOXO del núcleo al citoplasma</b>	
<b>Estímulo</b>	Insulina y factores de crecimiento
<b>Enzimas</b>	Akt y SGK (fosforilan a FOXO)
<b>Consecuencia</b>	La fosforilación provoca el secuestro de factores FOXO en el citoplasma, lo que evita que los factores FOXO transactiven sus genes diana.
<b>Unión a proteínas</b>	La proteína chaperona 14-3-3 se une al primer y segundo sitio de fosforilación de FOXO en el núcleo y permite su exportación activa.
<b>Relocalización de FOXO del citoplasma al núcleo</b>	
<b>Estímulo</b>	Estrés oxidativo
<b>Enzimas</b>	Fosfatasas (desfosforilan FOXO en los sitios Akt/SGK) Quinasas MST1 y JNK1 (fosforilan a FOXO)
<b>Consecuencia</b>	La fosforilación de MST1 de FOXO3a interrumpe la unión de 14-3-3, lo que desencadena la relocalización de FOXO3a del citoplasma al núcleo. JNK fosforila a FOXO4 y a 14-3-3; lo que ayuda a liberar los factores FOXO de sus anclajes.
<b>Excepción</b>	El estrés oxidativo puede permitir que FOXO ingrese al núcleo incluso en ausencia de desfosforilación de FOXO en los sitios Akt/SGK.

Tabla 3. Relocalización subcelular de FOXO (adaptación de Calnan & Brunet, 2008).



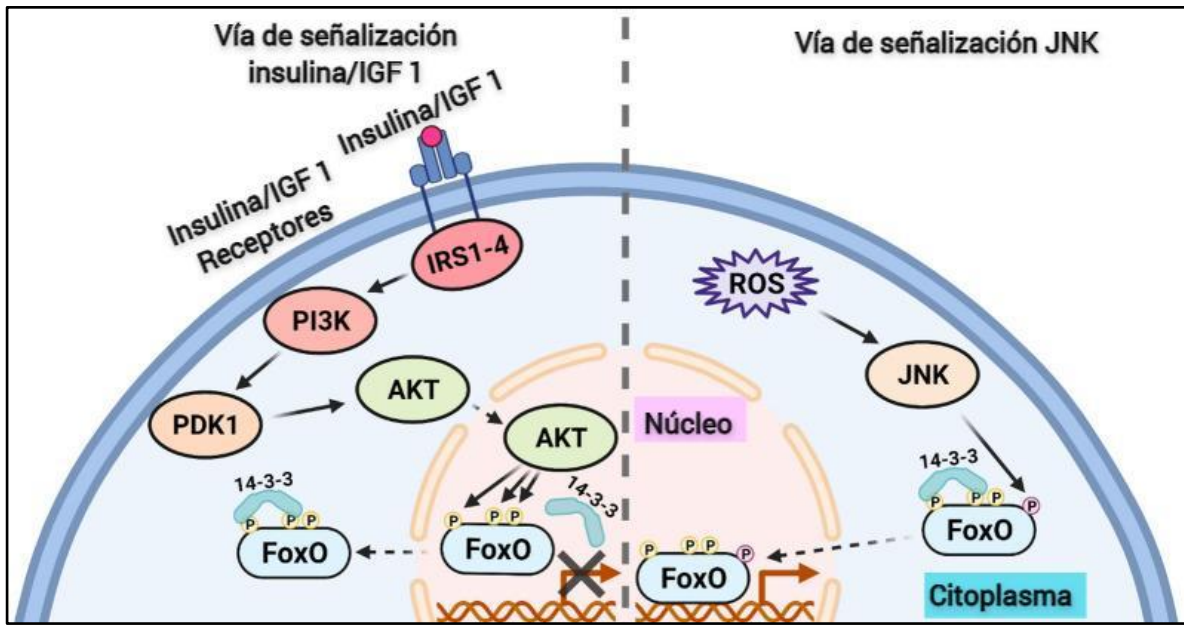


Figura 3. Vía de señalización de insulina/IGF-1 conservada evolutivamente y vía de señalización JNK para la regulación de FOXO. La unión de insulina o IGF-1 a los receptores desencadena una cascada de quinasas, lo que resulta en fosforilación de FOXO, unión 14-3-3 y exportación nuclear (izquierda). Las ROS celulares estimulan JNK, que fosforila y activa FOXO, lo que lleva a su transporte nuclear (derecha) (adaptación de Du & Zheng, 2021).

## 5.2.5 Modificaciones postraduccionales

En la Tabla 4 se puede observar un listado de las modificaciones postraduccionales para las proteínas FOXO y en la figura 4 se pueden observar las modificaciones postraduccionales de acetilación y fosforilación específicas para FOXO3a .

### 5.2.5.1 Fosforilación de FOXO

Las proteínas FOXO están sujetas a la fosforilación por parte de un panel de proteínas quinasas en diferentes sitios, lo que conduce a la alteración de su ubicación subcelular, la estabilidad de las proteínas y la actividad de unión al ADN (Xie, et al., 2012).



### **5.2.5.2 Proteínas quinasas Akt/SGK**

La vía de la fosfoinositida 3 quinasa (PI3/K) es un importante regulador de la actividad de FOXO. Tanto la serina-treonina-quinasa proteína quinasa B (también llamada Akt) como la quinasa inducible por glucocorticoides séricos (SGK) son importantes componentes posteriores de la señalización de PI3/K. Estas dos quinasas reconocen el mismo motivo de fosforilación del sustrato, RRXXS/T (R significa arginina, X significa cualquier aminoácido y S/T significa serina/treonina), y se han identificado como las principales enzimas para la fosforilación de FOXO3a; Thr32, Ser253 y Ser315. La fosforilación de estos sitios clave aumenta la asociación con las proteínas 14-3-3, lo que da como resultado la translocación de las proteínas FOXO desde el núcleo al citoplasma, lo que conduce a su inactivación transcripcional (Xie, et al., 2012).

### **Hippo/MST quinasas**

La quinasa tipo 20 estéril de mamíferos (MST), que comparte un alto grado de homología con el ortólogo Hippo de *Drosophila*, desempeña un papel importante en la regulación del control del tamaño celular y la apoptosis. Tras el estrés oxidativo, MST1 se une a FOXO3a y fosforila Ser207 dentro de su dominio Forkhead. La fosforilación de FOXO3a mediada por MST1 interrumpe su unión a las proteínas 14-3-3, promueve su acumulación nuclear y, por lo tanto, induce la expresión de genes proapoptóticos que inducen la muerte celular neuronal (Xie, et al., 2012).

### **Quinasas dependientes de ciclina**

La quinasa 1 dependiente de ciclina (Cdk1) puede fosforilar FOXO1 en Ser249 y bloquear la interacción de FOXO1 con las proteínas 14-3-3, lo que lleva a FOXO1 al núcleo para activar un programa de muerte celular en las neuronas (Xie, et al., 2012).

### **Proteína quinasa activada por AMP**

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética en las células. Se ha demostrado que AMPK fosforila FOXO3a en seis sitios. La fosforilación por AMPK conduce a la

activación de la actividad de FOXO3a sin alterar su localización subcelular (Xie, et al., 2012).

### **Proteínas quinasas ERK e IKK**

Se ha demostrado que ERK fosforila FOXO3a en Ser294, Ser344 y Ser425, lo que da como resultado su exclusión nuclear. Más importante aún, la fosforilación de FOXO3a en estos sitios lo vuelve inestable debido a la mayor interacción con la ubiquitina E3-ligasa, MDM2. De manera similar, se ha demostrado que la activación de IKK induce la fosforilación de Ser644 en FOXO3a. La fosforilación en este residuo conduce tanto a la exclusión nuclear como a la degradación de las proteínas FOXO3a. Tanto ERK como IKK se identifican como oncogenes en la tumorigénesis, lo que respalda la hipótesis de las proteínas FOXO como supresores de tumores (Xie, et al., 2012).

### **5.2.5.3 Acetilación de FOXO**

De manera similar a la fosforilación, se ha demostrado que la acetilación regula la actividad transcripcional y media en diferentes funciones biológicas de FOXO. El efecto de la acetilación en FOXO está controlado por la histona acetiltransferasa y la histona desacetilasa (HDAC) (Xie, et al., 2012).

#### **Histona acetiltransferasa**

Las CBP/P300 son las enzimas esenciales para la acetilación de FOXO. Entre los numerosos sitios informados, la lisina 242 y la lisina 245 de FOXO3a (lisina 245, lisina 248 de FOXO1) son de gran importancia: su acetilación disminuyó gravemente la capacidad de unión al ADN de FOXO. Además, es más probable que FOXO acetilado se localice en el citoplasma (Xie, et al., 2012).

#### **HDACs (histonas desacetilasas)**

Las proteínas FOXO se han caracterizado como el sustrato esencial de Sirt1. Sirt1 es el primer miembro de la familia Sir2 en mamíferos que ha demostrado desempeñar un papel crítico en la longevidad a través de su actividad desacetilasa. Sirt1 y FOXO3 forman un complejo en las células en respuesta al estrés oxidativo. Sirt1 tiene un efecto doble en la regulación de FOXO: aumenta la capacidad de FOXO para inducir la detención del ciclo celular y la resistencia al estrés oxidativo,

pero inhibe la capacidad de inducir la apoptosis celular. Recientemente, HDAC3 ha sido reportado como una nueva desacetilasa de FOXO (Xie, et al., 2012).

#### **5.2.5.4 Poliubiquitinación**

La degradación de FOXO está determinada por la vía del proteasoma de ubiquitina. Se ha demostrado que varias ligasas de ubiquitina E3 son necesarias para la ubiquitinación de FOXO. Por ejemplo, la ligasa E3 MDM2 se une a FOXO3a para promover su degradación. La proteína quinasa ERK es necesaria para este proceso. Skp2, otra ligasa E3, puede reconocer el FOXO1 fosforilado en Ser256 y degradarlo mediante poliubiquitinación. El extremo C de la proteína que interactúa con Hsc70 (CHIP) promueve la ubiquitinación y degradación de FOXO1 en las células del músculo liso (Xie, et al., 2012).

#### **Mono Ubiquitinación**

Se ha demostrado que FOXO4 es monoubiquitinado por MDM2 tras el estrés oxidativo. La mono ubiquitinación de FOXO induce su localización nuclear y mejora la actividad transcripcional dependiente de FOXO. Una enzima desubiquitinante llamada USP7 puede inhibir la actividad de FOXO4 mediante la eliminación de la mano ubiquitina (Xie, et al., 2012).

#### **5.2.5.5 Metilación de arginina**

Se ha informado que FOXO1, como muchas otras proteínas, también puede ser metilado por la proteína arginina metiltransferasa PRMT1. PRMT1 metila FOXO1 en Arg248 y Arg250 conservados, lo que bloquea directamente la fosforilación de FOXO1 mediada por Akt en Ser253, dando como resultado su retención duradera en el núcleo, lo que lleva a la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Xie, et al., 2012).

#### **Metilación de lisina**

Se ha demostrado que la metilación de lisinas por diferentes metiltransferasas juega un papel importante en la regulación tanto de las proteínas histonas como de las proteínas no histonas. Recientemente, se demostró que la metiltransferasa Set9

metila FOXO3a en la lisina 270. La metilación de FOXO3a conduce a la inhibición de su actividad de unión al ADN y transactivación (Xie, et al., 2012).

### 5.2.5.6 Glicosilación de FOXO

La glicosilación es el proceso enzimático que une los glicanos a proteínas, lípidos u otras moléculas orgánicas. Las proteínas se pueden glicosilar en diferentes cadenas laterales de aminoácidos, y estas modificaciones se denominan N-glicosilación y O-glicosilación. Se ha informado que FOXO1 puede ser O-glicosilado y conducir a la regulación positiva de la glucosa-6-fosfatasa y la expresión de otros genes gluconeogénicos (Xie, et al., 2012).

Modificación	Enzima	Sitio	Efecto en la actividad de FOXO
Fosforilación	Akt/SGK	T32, S253, S315 (FOXO3a)	Regulado a la baja
Fosforilación	Casein kinase 1	S318, S321 (FOXO3a)	Regulado a la baja
Fosforilación	MST1	S207 (FOXO3a)	Regulado al alza
Fosforilación	Cyclin-dependent kinase 1	S249 (FOXO1)	Regulado al alza
Fosforilación	Cdk2	S249 (FOXO1)	Regulado a la baja
Fosforilación	ERK	S294, S344, S425(FOXO3a)	Regulado a la baja
Fosforilación	IKK	S544 (FOXO3a)	Regulado a la baja
Fosforilación	AMPK	T179, S399, S413, S555, S588, S626 (FOXO3a)	Regulado al alza

Acetilación	P300/CBP	K245, K248, K262 (FOXO1)	Regulado a la baja
Poliubiquitinación	MDM2, COP1, Skp2, CHIP	ND	Regulado a la baja
Mono Ubiquitinación	MDM2	ND	Regulado al alza
Metilación de arginina	PRMT1	R248, R250 (FOXO1)	Regulado al alza
Metilación de lisina	Set9	K270 (FOXO3)	Regulado a la baja
Glicosilación	ND	ND	Regulado al alza

Tabla 4. Resumen de las modificaciones postraduccionales en las proteínas FOXO (adaptación de Xie, et al., 2012). ND, no determinado.

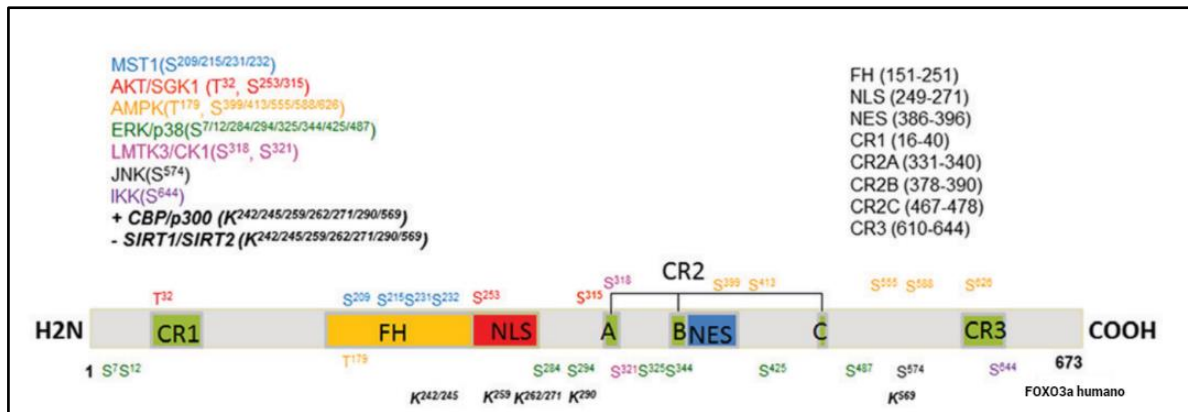


Figura 4. Sitios de aminoácidos de fosforilación y acetilación de FOXO3a humano (adaptación de Wang et al., 2017). Los diferentes colores representan diferentes quinasas para la modificación de FOXO3a y diferentes regiones de la proteína FOXO3a. A, B y C representan diferentes secciones de CR2. MST1, cinasa 1; AKT, proteína quinasa B; SGK, suero y quinasa inducida por glucocorticoides; AMPK, proteína quinasa activada por AMP; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; LMTK, tirosina quinasa de lémur; CK1, caseína quinasa-1; JNK, quinasa N-terminal c-Jun; IKK, quinasa IκB; CBP, proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico; SIRT, regulador de información silenciosa; CR,

*región conservada; FH, horquilla; NLS, señal de localización nuclear; NES, señal de exportación nuclear; S, serina; T, treonina; K, lisina.*

### **5.2.6 Su relación con la longevidad**

Los factores de transcripción FOXO (FOXO) son reguladores de la longevidad evolutivamente conservados (Webb et al., 2016). La contribución de los cuatro miembros de la familia FOXO de mamíferos (FOXO1, 3a, 4 y 6) a la longevidad en mamíferos no se ha investigado completamente, pero según la evidencia se requiere FOXO3a para la extensión de la vida útil en respuesta a la restricción dietética en el ratón (Shimokawa et al., 2015). Además, de acuerdo con Morris et al., (2015) existe evidencia que ha relacionado a FOXO con la esperanza de vida en humanos, ya que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el locus *FOXO3a* se han asociado con una longevidad excepcional en varias cohortes independientes. En los seres humanos, FOXO3a contiene alrededor de 40 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) no codificantes (Link, 2019).

El papel de FOXO3a en la longevidad puede implicar la regulación positiva de los genes diana implicados en la resistencia al estrés, el metabolismo, la detención del ciclo celular y la apoptosis. El control efectivo de FOXO3a en respuesta a estímulos ambientales es probablemente crítico para prevenir el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad, incluidas las enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo 2, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas (Morris et al., 2015).

FOXO regula la red de homeostasis de proteínas, que está involucrada en el control de calidad celular. Esto puede ser la base del papel de las proteínas FOXO en la longevidad. El sistema ubiquitina-proteosoma y la autofagia ayudan a eliminar las proteínas dañadas y agregadas de la célula. La autofagia disminuye con la edad, y una reducción en la autofagia se asocia con el envejecimiento prematuro y la enfermedad (Webb et al., 2014). Los FOXO se unen a las regiones promotoras y transactivan la expresión de los genes de autofagia para inducir la autofagia, lo que representa la función típica de los FOXO como factores de transcripción. Por otro lado, los FOXO pueden funcionar independientemente de la regulación

transcripcional al interactuar directamente con las proteínas de autofagia (p. ej., Atg7) en el citoplasma para regular la autofagia, además, se ha reconocido que los FOXO emplean mecanismos epigenéticos (p. ej., modificaciones de histonas y microARN) para controlar la actividad de la autofagia. Los cambios epigenéticos reflejan interacciones alteradas entre factores ambientales y genes, lo que se suma a la noción de que la autofagia sirve como un proceso adaptativo en respuesta a estímulos externos (Cheng, 2019).

La inhibición del principal regulador de la homeostasis de proteínas, mTORC1, es otra forma en que FOXO controla la autofagia. La capacidad de la proteostasis inducida por FOXO para promover la supervivencia en las neuronas, pero la degeneración en el músculo esquelético, podría ser el resultado de la expresión específica del tipo celular, FOXO3a y FOXO6 están altamente enriquecidos en el cerebro, mientras que el músculo está enriquecido en FOXO4 (Webb et al., 2014). La restricción calórica está asociada con la longevidad ya que ayuda a mantener el estado redox de la célula mediante el ciclo de calorías a través de las mitocondrias para restaurar NAD<sup>+</sup>. La restricción calórica da como resultado la activación de las sirtuinas, lo que lleva a la activación de FOXO, mejora de la autofagia, el reciclaje de aminoácidos a través de la inhibición de la actividad mTOR y otros mecanismos que conducen a un fenotipo de envejecimiento saludable. Por otro lado, el exceso de calorías, particularmente de carbohidratos, aumenta la relación NADH / NAD<sup>+</sup> y conduce a la lipogénesis, la sobreproducción de ROS por las mitocondrias, la autofagia deficiente y la activación de mTOR como resultado de un exceso de ingesta de proteínas (ver figura 5).







cambios genéticos o epigenéticos, la inactivación de los FOXO se produce principalmente debido a la sobreactivación de sus entradas inhibitorias. Eso ofrece una amplia gama de posibilidades para restaurar la actividad de FOXO con inhibidores de moléculas pequeñas. Aunque no se han realizado campañas de cribado en busca de fármacos que se dirijan directamente a los factores FOXO con el objetivo de retrasar el envejecimiento, se ha realizado un esfuerzo importante dirigido a los FOXO para identificar moléculas anticancerígenas (ver Tabla 5).

Agente	Efecto	Acción en FOXO
Galato de epigallocatequina	Inhibición de DYRK1a	Acumulación nuclear/unión al ADN
Aspirina	Activación de AMPK	Fosforilación y activación
Resveratrol	Activación SIRT1	Translocación nuclear
Rifampicina	Vías JNK/IIS	Translocación nuclear
ETP-45658	Inhibidor de PI3K	Translocación nuclear
MDN-0105	Inhibidor de exportación nuclear	Translocación nuclear
Ratjadona A	Un inhibidor de la exportación nuclear	Translocación nuclear
Calmidazolio	Antagonista de CaM	Translocación nuclear
GSK690693	Inhibidor 14-3-3	Translocación nuclear

Tabla 5. Lista de algunos compuestos utilizados para activar las proteínas FOXO (Link, 2019).

### **5.3 Técnicas moleculares empleadas para el análisis de expresión de FOXO3a**

De acuerdo con la literatura algunas de las técnicas que se llevan a cabo para poder analizar la expresión de diferentes factores de transcripción, entre ellos a FOXO3a se hace uso de Western Blot, PCR, viabilidad celular, entre otras;

#### **5.3.1 Western Blot (inmunotransferencia)**

Western blot fue introducido por Towbin et al. en 1979 y desde entonces se ha convertido en una técnica común utilizada en laboratorios de investigación a nivel mundial para la inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas en homogeneizados celulares complejos. En las últimas tres décadas, la sensibilidad, robustez y flexibilidad de los sistemas de indicadores correspondientes han aumentado significativamente. Además, el desarrollo continuo de medios de detección y reactivos ha proporcionado a la comunidad científica sistemas de imágenes ultrasensibles que brindan un amplio rango dinámico de detección que permite una cuantificación precisa y exacta de señales de proteínas de baja y alta expresión del mismo blot (Taylor & Posch, 2014).

La transferencia Western (WB), también conocida como transferencia de proteínas o inmunotransferencia, evolucionó a partir de la transferencia de ADN y la transferencia de ARN. WB permite la transferencia de proteínas desde un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS) a una membrana adsorbente. Las proteínas transferidas forman una réplica exacta del gel y han demostrado ser el paso inicial para una variedad de experimentos. El empleo posterior de sondas de anticuerpos dirigidas contra las proteínas unidas a nitrocelulosa ha revolucionado el campo de la inmunología (KURIEN & SCOFIELD, 2006).

WB ofrece las siguientes ventajas específicas: (a) las membranas húmedas son flexibles y fáciles de manejar, (b) las proteínas inmovilizadas en la membrana son fácilmente accesibles a diferentes ligandos, (c) solo se requiere una pequeña cantidad de reactivos para la transferencia análisis, (d) es posible múltiples réplicas de un gel, (e) se hace posible el almacenamiento prolongado de patrones

transferidos, antes de su uso, y (f) la misma transferencia de proteína puede usarse para múltiples análisis sucesivos (KURIEN & SCOFIELD, 2006).

En resumen, las proteínas nativas o desnaturalizadas se separan mediante electroforesis en gel, luego se transfieren a una membrana de unión a proteínas, después de eso y un anticuerpo específico detecta una proteína diana (ver figura 6) (Meftahi et al., 2021).

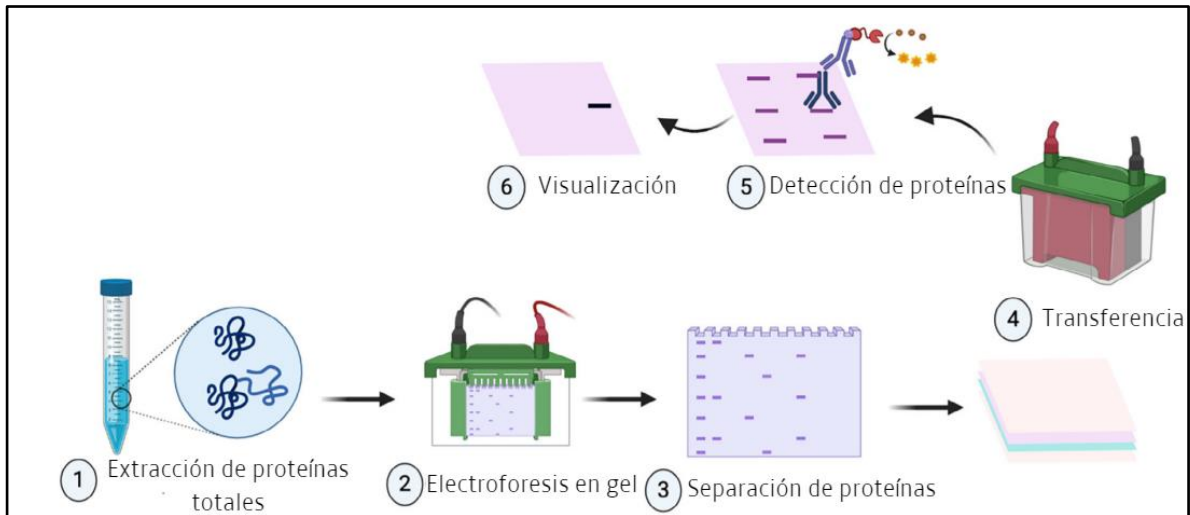


Figura 6. Flujo de trabajo de un ensayo de Western blot (adaptación de Meftahi et al., 2021). Las proteínas aisladas se separan primero por tamaño mediante electroforesis en gel (1 y 2). Luego, las proteínas separadas se transfieren a una membrana de transferencia de nitrocelulosa o PVDF (3 y 4). A continuación, la membrana transferida se incuba con anticuerpos primarios y secundarios conjugados (5). Finalmente, según el anticuerpo secundario utilizado, la proteína diana se detecta mediante métodos colorimétricos, fluorescentes o luminiscentes (6).

### 5.3.1.1 Factores que interfieren en el diseño experimental

A diferencia de los ensayos basados en ADN que miden un tipo predecible de molécula que es típicamente estable en una variedad de condiciones, las proteínas pueden variar significativamente en su expresión, estabilidad, conformación y actividad bajo diferentes condiciones tampón y experimentales. Además, la presencia de proteínas contaminantes en un homogeneizado puede afectar en gran medida la integridad y la actividad de las proteínas diana. Por lo tanto, se debe tener cuidado en el diseño de cualquier ensayo basado en proteínas para garantizar que las diferencias aparentes entre las muestras de caso y control no sean un artefacto

de las condiciones experimentales o de la manipulación de la muestra. Los factores que pueden tener una influencia importante en el proteoma incluyen el tiempo de incubación y la temperatura, así como los parámetros para procesar las muestras, como la cantidad de tiempo entre la recolección de tejido y la posterior congelación o incluso las condiciones y el momento para la descongelación de tejidos o gránulos celulares (Taylor & Posch, 2014).

Además; hay varios factores asociados con la preparación de la muestra que pueden afectar directamente la densidad de las bandas en un Western blot, incluyendo (Taylor & Posch, 2014):

1. Manipulación inadecuada de muestras de tejido o células que provocan una degradación y/o expresión variable de proteínas entre muestras,
2. Detergentes, sales e inhibidores de la proteasa inadecuados en el tampón de lisis,
3. Mala técnica de homogeneización.

### **5.3.1.2 Aplicaciones científicas de Western Blot**

Aunque la aplicación más común de Western blot es detectar el tamaño y la cantidad de proteínas en una muestra dada, WB también parece ser eficaz en el estudio de otros aspectos de los análisis de proteínas (Meftahi et al., 2021);

- Detección de diferentes isoformas de proteínas.
- Detección de interacciones proteína-proteína
- Detección de interacciones proteína-ADN
- Detectar la modificación postraducciona
- Detección de la localización subcelular de proteínas
- Desarrollo y caracterización de anticuerpos, mapeo de epítopos

### **5.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)**

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción

aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si se utiliza como sustrato ADN genómico, entonces típicamente se habla de una PCR, pero si se utiliza ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN duplicarse en millones de partículas virales. El ADNc se utiliza cuando se analiza la expresión del ARNm de algún gen de interés. Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa (Tamay et al., 2013).

### **5.3.2.1 Los elementos importantes en la reacción**

Son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg +), una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O (Tamay et al., 2013).

### **5.3.2.2 Etapas principales de las que se compone la PCR (ver figura 7):**

- Desnaturalización: En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo con el modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

- **Hibridación:** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting ( $T_m$ ) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.
- **Extensión:** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

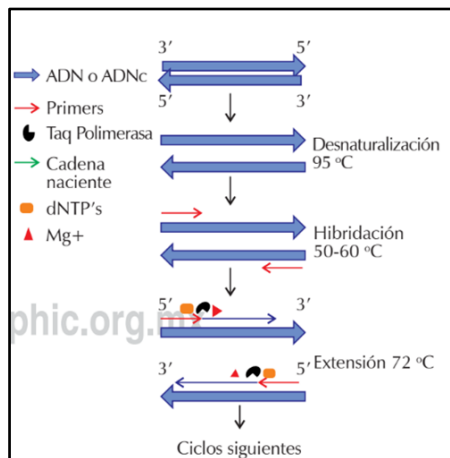


Figura 7. Pasos de un ciclo de la PCR (Tamay et al., 2013).

### 5.3.2.3 PCR en tiempo real: fundamentos

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores, en 1992, al videograbar en tiempo real la incorporación de

bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV.7 Desde entonces, el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. La nomenclatura que se usa también es diferente, si utilizamos ADN genómico entonces hablamos de una qPCR (quantitative PCR), si, por lo contrario, primero se obtiene ADNc y luego hacemos la PCR, nos referimos a una RT-qPCR. Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «Master mix», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas (Tamay et al., 2013).

#### **5.3.2.4 Métodos para detectar los productos amplificados**

El monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción es un paso importante en la PCR en tiempo real, para ello la estrategia tecnológica que ha dado buenos resultados es los sistemas basados en reporteros fluorescentes. En general, estos sistemas pueden ser clasificados en dos métodos diferentes: no específicos (ver figura 8) y específicos (ver figura 9) (Tamay et al., 2013).

Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines se llama SYBR Green, la cual es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia. Aunque el SYBR Green es uno de los reporteros fluorescentes más utilizados por los investigadores debido a su bajo costo, la principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de primers. Muchos laboratorios, para evitar esta situación, optimizan sus reacciones realizando una «curva melting» o «curva de disociación» al final de la reacción, cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de dímeros de primers. Hoy en día la mayoría de los softwares de los termocicladores ofrecen esta función que es fácil de aplicar y analizar (Tamay et al., 2013).

Los métodos específicos parten de principios distintos a diferencia de los no específicos y tienen en común la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados. Estos métodos siguen el principio conocido como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o «quencher». Para ello, existen dos métodos específicos, éstos son: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación. Los primeros se basan en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un «quencher», ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco. Cuando hibrida, ocurren cambios conformacionales en el reportero y el quencher, lo cual permite que la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Estos



métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso por lo que la especificidad es muy alta. Un ejemplo de estos sistemas son las sondas comerciales conocidas como TaqMan, aunque existen otras en el mercado (Tamay et al., 2013).

Los métodos por hibridación consisten en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibridan a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia. Un ejemplo de este método son las sondas *molecular Beacons* que también son comerciales (Tamay et al., 2013).

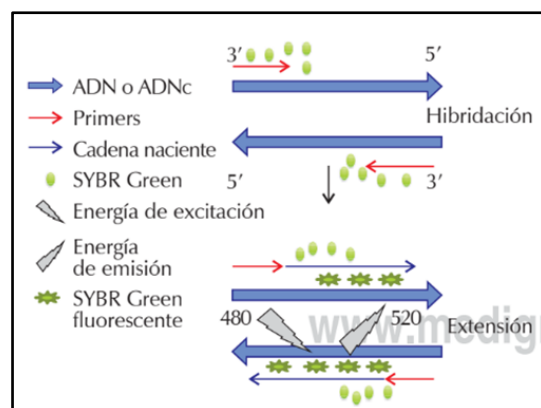


Figura 8. Método no específico. Cuando el SYBR Green está unido al ADN de doble cadena, es excitado a una longitud de onda de 480 nm, mientras que la longitud de onda de emisión corresponde a 520 nm (Tamay et al., 2013).

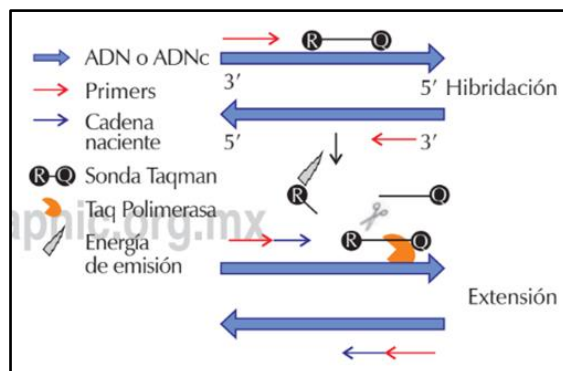


Figura 9. Método específico mediante la utilización de las sondas Taqman (Tamay et al., 2013).

### 5.3.3 Determinación de la viabilidad celular

La medición de la proliferación y la viabilidad celulares se ha convertido en una técnica clave en las ciencias de la vida. La necesidad de métodos sensibles, fiables, rápidos y sencillos ha llevado al desarrollo de varios ensayos estándar (MERCK,2022).

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra y la proliferación de células es un indicador vital para comprender los mecanismos en acción de ciertos genes, proteínas y vías involucradas en la supervivencia o muerte celular después de la exposición a agentes tóxicos. En general, los métodos utilizados para determinar la viabilidad también son comunes para la detección de la proliferación celular (Adan et al., 2016).

Hay una variedad de métodos de ensayo basados en diversas funciones celulares, como la actividad enzimática, la permeabilidad de la membrana celular, la adherencia celular, la producción de ATP, la producción de coenzimas y la actividad de captación de nucleótidos. Estos métodos podrían clasificarse básicamente en diferentes categorías: (I) métodos de exclusión de colorantes como el ensayo de exclusión de colorante azul de tripano, (II) métodos basados en la actividad metabólica, (III) ensayo de ATP, (IV) ensayo de sulfforhodamina B, (V) ensayo de

marcador de viabilidad de proteasa, (VI) ensayo de supervivencia celular clonogénica, (VII) ensayos de proliferación celular de síntesis de ADN y (V) microespectroscopia de raman (Adan et al., 2016).

### **5.3.3.1 Reactivo de proliferación celular WST-1**

El reactivo de proliferación celular WST-1 de Roche es un ensayo colorimétrico simple diseñado para medir las tasas de proliferación relativa de las células en cultivo. El principio de ensayo se basa en la conversión de la sal de tetrazolio WST-1 en un colorante por enzimas deshidrogenasas mitocondriales (ver figura 10). La sal soluble se libera en el medio. Dentro de un período de tiempo dado, la reacción produce un cambio de color que es directamente proporcional a la cantidad de deshidrogenasa mitocondrial en un cultivo dado. Como resultado, el ensayo en realidad mide la actividad metabólica neta de las células. Teóricamente, esto refleja el número de células: cuantas más células, más deshidrogenasa estará disponible para reducir el reactivo. Por el mismo razonamiento, Roche sugiere que el kit también puede ser adoptado para su uso en la medición de la viabilidad celular o citotoxicidad. Para realizar el ensayo, el reactivo WST-1 listo para usar simplemente se agrega directamente a los medios de las células cultivadas en placas de 96 pocillos. Luego, los cultivos se administran de 30 minutos a 4 horas para reducir el reactivo en forma de tinte. La placa se lee inmediatamente a 450 nm con una lectura de referencia a 630 nm. Una desventaja de este reactivo es que es una medida indirecta de la proliferación celular y la viabilidad, debido a ello probablemente son necesarias medidas más directas de estos índices celulares en la mayoría de los casos (Arjuna K., 2007).

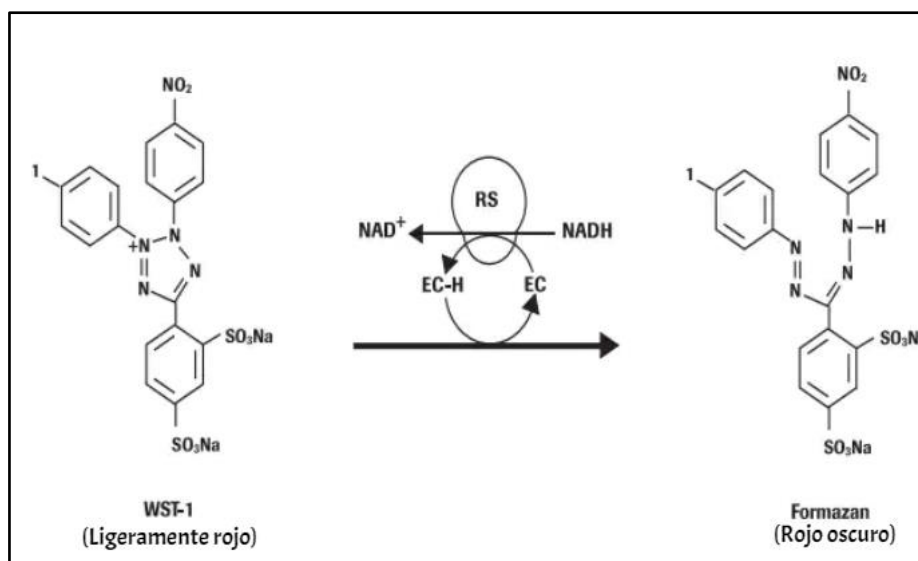


Figura 10. Desdoblamiento de la sal de tetrazolio WST-1 (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitro-fenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno sulfonato) a formazán (adaptación de MERCK, 2022). (EC = reactivo de acoplamiento de electrones, RS = sistema de succinato-tetrazolio-reductasa mitocondrial).

## 6. Metodología

### 6.1 Materiales y Métodos

#### Cultivo celular

Las líneas celulares fibróticas y controles se obtuvieron del biobanco del Instituto Nacional de Enfermedades respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, las cuales se cultivaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en DMEM/F12 (Gibco™) al 5% de suero fetal bovino (SFB), DMEM (Gibco™) al 10% de SFB, F-12 (Gibco™) al 10% de SFB o EMEM (Gibco™) al 10% de SFB, de acuerdo con los requerimiento de la línea celular, cada medio se complemento con Primocin (InvivoGen™) 1 mL/0.5 L. El tiempo de confluencia de las líneas celulares fue variable por ello hubo una diferencia entre pasajes.

#### Líneas celulares:

Control (Ctrl); HPFp<sub>5,p7</sub>, NHLFp<sub>5,p7 y p8</sub>, CCD16p<sub>9</sub>, CCD19p<sub>7 y p9</sub>, FN5p<sub>5</sub> y A549 (+), 1415p<sub>5</sub>, 1657p<sub>6</sub> y 1768p<sub>6</sub>.

*Fibróticas (FPI); 170p<sub>6</sub>, 231p<sub>10</sub>, 342p<sub>9</sub>, 397p<sub>5</sub>, p<sub>12</sub>, 337p<sub>6</sub> y p<sub>7</sub>, 305p<sub>6</sub> y p<sub>11</sub>, 362p<sub>5</sub>, p<sub>7</sub>, 381p<sub>4</sub> y LL97Ap<sub>7</sub>.*

### *Extracción de RNA*

Para la extracción de RNA se utilizaron cajas p60 con una confluencia del 100%, se realizó de la siguiente manera; un lavado con PBS 1x (2 mL), adición de trizol (1 mL), temperatura ambiente (T.A.) (5 min.), adición de cloroformo (200 uL), vortex 15 segundos, centrifugación (9000 rpm, 4 °C, 15 min), recuperación de fase acuosa y precipitación con 500 uL de isopropanol, incubación 24 hrs en ultracongelador, centrifugación (14000 rpm, 4 °C, 10 min), decantación del sobrenadante y lavado del pellet (2 veces) con 1 mL de EtOH 75 % y posteriormente 500 uL (9000 rpm, 4 °C, 10 min), secado de pellet a T.A. y resuspensión en 20 uL de agua libre de nucleasas (ThermoFisher Scientific™).

### *Cuantificación de RNA*

Se realizó la cuantificación de RNA (ng/uL), utilizando 2 uL por muestra (20 uL) de cada línea celular, la cuantificación se llevó a cabo con una longitud de onda de 260 nm y se obtuvieron índices de pureza A260/A280 y A260/A230, haciendo uso de NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific™).

### *Extracción de extractos nucleares, citosólicos y totales*

Para realizar la extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas se utilizaron cajas T-75 con una confluencia del 100%, se hizo uso del Kit NER-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (ThermoFisher Scientific™), se procedió de la siguiente manera; dos lavados con PBS 1x (7 mL), tripsinización por 5 min en incubadora (2 mL), centrifugación (1800 rpm, 4 °C, 7 min), resuspensión del pellet en 1 mL de PBS 1x, centrifugación (1800 rpm, 4 °C, 3 min), resuspensión del pellet en 200 uL de CER I (TSA uL/100 uL, nicotinamida uL/100 uL, proteasas uL/100 uL, fosfatasas uL/100 uL y CER I c.s.p), vortex vigoroso por 30 seg. e incubación en hielo por 10 min., adición de 12 uL de CER II, vortex por 10 seg. e incubación en

hielo por 1 min, vortex por 10 seg., centrifugación (14000 rpm, 4 °C, 10 min), recuperación de sobrenadante (extracto citoplasmático) y conservación a -80 °C en Ultracongelador, resuspensión del pellet con 100 uL de NER (TSA uL/100 uL, nicotinamida uL/100 uL, proteasas uL/100 uL, fosfatasas uL/100 uL y NER c.s.p), vortex c/5 min durante 30 seg. hasta cumplir 40 min., centrifugación (14000 rpm, 4 °C, 15 min), obtención de extracto nuclear y conservación a -80 °C en Ultracongelador. La extracción de lisados totales se realizó a partir de cajas p100 con una confluencia del 100% de la siguiente manera; 2 lavados con PBS 1X (6 mL), tripsinización por 5 min en incubadora (2 mL), centrifugación (2000 rpm, 10 °C, 10 min), resuspensión del pellet en 1 mL de PBS 1x, centrifugación (14000 rpm, 4 °C, 3 min), resuspensión del pellet en 140 uL de BL (TSA uL/100 uL, nicotinamida uL/100 uL, proteasas uL/100 uL, fosfatasas uL/100 uL y RIPA 100x c.s.p), vortex por 5 seg e incubación en hielo por 10 min., vortex por 5 seg y sonicación ( 3 veces, 40 amplicones de 3 segundos), centrifugación (14000 rpm, 4 °C, 20 min), conservación a -80 °C en Ultracongelador.

#### *Cuantificación de extractos proteicos*

Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas nucleares, citoplasmáticas y de lisado total; realizando una curva de calibración con Stock de BSA (1 mg BSA/ 1 mL de agua), las lecturas de absorbancia se realizaron a 590 nm con un sistema Accuris SmartReader™ 96.

#### *RT-qPCR sondas Taqman*

A partir de los valores de cuantificación del RNA se realizaron los cálculos correspondientes (con 1000 ng de muestra) para llevar a cabo una transcripción reversa con el Kit Verso cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific™) obteniendo un volumen final de 20 uL de cDNA los cuales se aforaron a 100 uL con agua libre de nucleasas obteniendo una concentración final de 10 ng/uL. Las sondas TaqMan de FOXO3a y SIRT1 se obtuvieron de Applied Biosystems. La expresión de FOXO3a y SIRT1 se determinó utilizando Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix

(ThermoFisher Scientific™). La PCR cuantitativa se realizó con un sistema QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado y se promediaron los valores del ciclo umbral (Ct). Los resultados fueron analizados por el método  $\Delta\Delta C_t$  y se utilizó como gen de referencia a GAPDH.

#### *RT-qPCR genes blanco*

A partir de los valores de cuantificación del RNA se realizaron los cálculos correspondientes (con 1000 ng de muestra) para llevar a cabo una transcripción reversa con el Kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific™) obteniendo un volumen final de 20 uL de cDNA los cuales se aforaron a 400 uL con agua libre de nucleasas (concentración final de 2.5 ng/uL). La PCR cuantitativa se realizó con un sistema 7900TH Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizando Maxima SYBER green/ROX qPCR master mix (ThermoFisher Scientific™) para determinar la expresión de los genes blanco; SOD, IGFB y P21. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado y se promediaron los valores del ciclo umbral. Los resultados fueron analizados por el método  $\Delta\Delta C_t$  y se utilizó como gen de referencia a HPRT.

#### *Western Blot*

Se procesaron alícuotas de 10 ug de proteína para la electroforesis (muestras Ctrl y FPI) en geles de poliacrilamida al 7.5 %, utilizando 2X Laemmli sample buffer;  $\beta$ -mercaptoethanol (Bio-Rad), las muestras proteicas se desnaturalizaron con ebullición y posteriormente se corrió 2 horas y media a 80 V y 30 min a 100 V. La inmunotransferencia se realizó con membranas de nitrocelulosa de 0.22 um (una para Núcleo, una para Citoplasma y otra para Lisado Total) 1 hora a 100 V, se realizó el bloqueo de las membranas durante toda la noche a 4°C con BSA 5%. Después del bloqueo las membranas se procesaron de la siguiente manera; incubación durante toda la noche con anticuerpo primario en BSA 5% (Ac 1), 4 lavados con TBS-T 0.05%, incubación con anticuerpo secundario (Ac 2°) en BSA

1% durante 1 hora, 4 lavados con TBS-T 0.05%, revelado con SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate en sistema ChemiDoc™ MP Imaging con Image Lab Software, lavado de membrana con TBS 1X por 10 min, se estripearon con Restore™ Western Blot Stripping Buffer (ThermoFisher Scientific™) por 15 min, bloqueo con BSA 5% por 1 hora y se volvían a marcar con el anticuerpo subsecuente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes; Acetyl FOXO3a (Lys271) Ab-AF3771 (1:500, Affinity Biosciences), FOXO3a (D19A7) Rabbit mAb (1:1000, Cell Signaling TECHNOLOGY®), Acetyl Lysine (1:2000, Cell Signaling TECHNOLOGY®), SirT1 (1F3) Mouse mAb (1:1000, Cell Signaling TECHNOLOGY®), anti-β-actina (1:5000, BioLegend®), Histona H3 (PA5-16183) (1:1000, ThermoFisher Scientific™) y GAPDH (0411): sc-47724 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology Inc.).

-Se realizaron dos procesos de *Western Blot* uno para las primeras muestras (*FN5p<sub>5</sub>*, *HPFp<sub>5</sub>*, *NHLFp<sub>5</sub>*, *,362p<sub>5</sub>*, *370p<sub>5</sub>*, *397p<sub>5</sub>*) y otro para las segundas muestras (*NHLFp<sub>8</sub>*, *CCD19p<sub>7</sub>*, *HPFp<sub>7</sub>*, *231p<sub>10</sub>*, *305p<sub>11</sub>*, *342p<sub>9</sub>*, *,397p<sub>12</sub>* y *337p<sub>7</sub>*). Para el caso de las segundas muestras que se trabajaron se realizó de la misma manera pero con 40 ug de proteína, solo se trabajaron 2 membranas\* (una para Núcleo y otra para Citoplasma) y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios, respectivamente; FOXO3a (D19A7) Rabbit mAb (1:1000, Cell Signaling TECHNOLOGY®), SirT1 (1F3) Mouse mAb (1:1000, Cell Signaling TECHNOLOGY®), anti-TATA (1:2000, BioLegend®), anti-β-actina (1:500, BioLegend®) .

\*Debido a las diferencias en el tiempo de proliferación celular para la obtención de las proteínas.

#### *Estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel celular*

Previamente al estímulo se realizó un plaqueo de la línea celular NHLF<sub>p<sub>8</sub></sub> en placa de 96 pozos con medio Advanced DMEM/F12 (Gibco™) al 5% de SFB a una concentración de 3.5x10<sup>3</sup> células/pozo y 7x10<sup>3</sup> células/pozo (por cuadruplicado). Cuando el crecimiento celular se encontraba en un 70-80 % de confluencia, se procedió con el estímulo de la siguiente manera; 2 lavados con F12 sin suero



(Gibco™), adición de 100 uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /pozo a las siguientes concentraciones; 10,20,40,80,160,320 y 640 uM e incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, 2 lavados con F12 sin suero (Gibco™), incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en 100 uL de medio Advanced DMEM/F12 (Gibco™)/pozo al 5% de SFB por 24 horas, 2 lavados con F12 sin suero (Gibco™), adición de 5 ul de Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche), incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas, recuperación del WST-1 en una nueva placa de 96 pozos y finalmente las lecturas de absorbancia se realizaron a 450 nm y 630 nm como lectura de referencia, con un sistema Accuris SmartReader™ 96.

## 7. Resultados

### *RT-qPCR sondas Taqman*

A continuación, se muestran los niveles relativos de expresión génica de genes representativos conocidos por distinguir la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) de las muestras de control. Los niveles de expresión génica de **(figura 11.A)** SIRT-1 y **(figura 11.B)** FOXO3a, se midieron mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), se realizó un análisis estadístico t-Student al 95% de confianza en el programa *Statgraphics® centurion™*, mediante el cual se pudo determinar que la diferencia de expresión tanto para SIRT1 como para FOXO3a entre muestras fibróticas y control no es significativa, ya que, se obtiene un valor de  $p > 0.05$  ( $p = 0.06$  para SIRT-1 y  $p = 0.33$  para FOXO3a), gráficamente se puede observar una tendencia con mayor expresión de SIRT1 en las muestras fibróticas respecto a las muestras control, para el caso de FOXO3a se observa lo contrario, observando la comparación entre la expresión de SIRT1 y FOXO3a **(figura 11.C)** en muestras fibróticas (FPI) y control (Ctrl), hay una mayor tendencia de expresión con SIRT1.

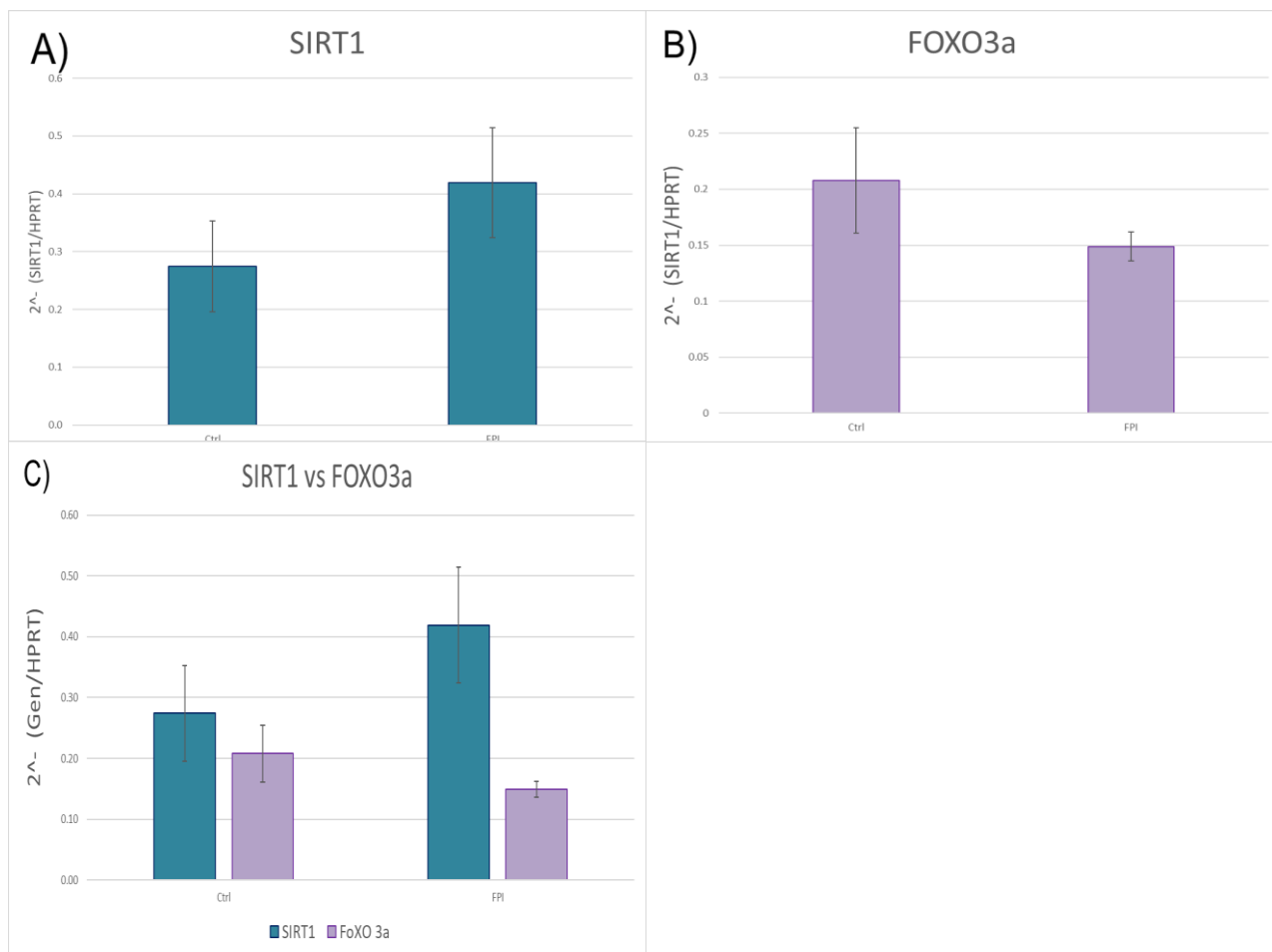
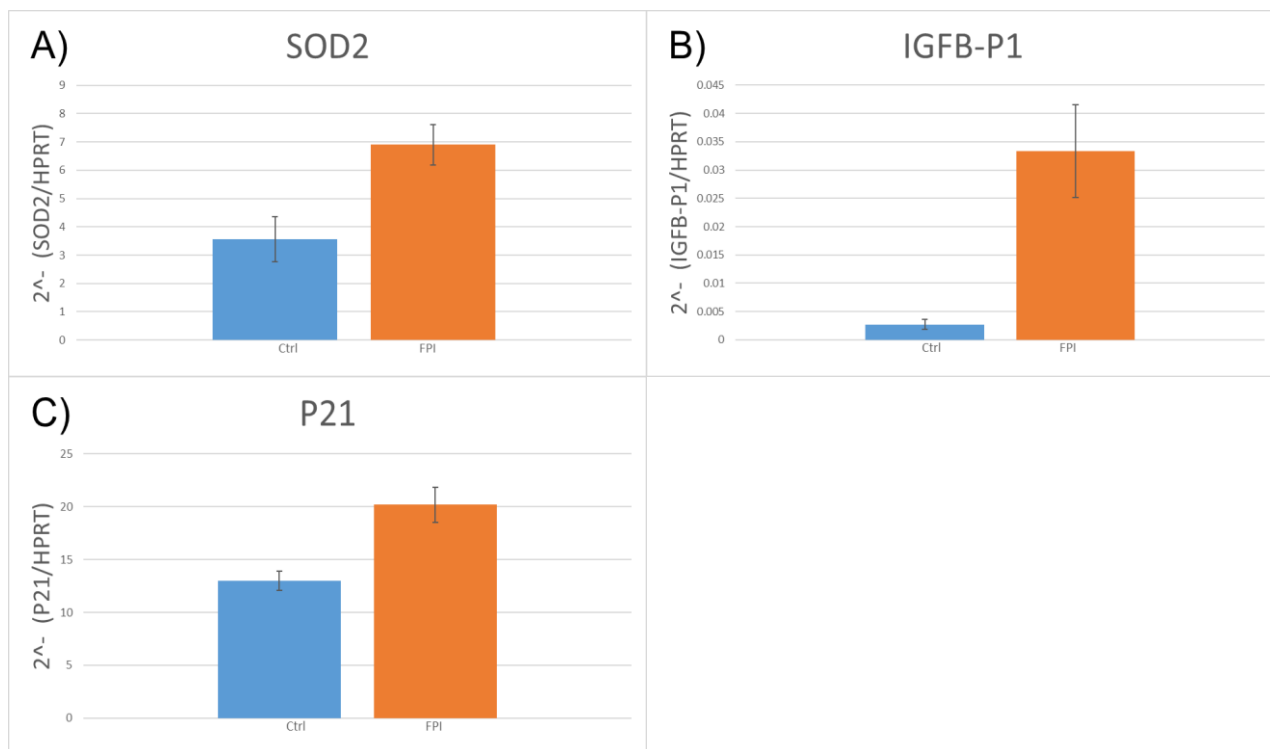


Figura 11. **A)** Expresión de *SIRT1* en muestras fibróticas (FPI) y control (Ctrl). **B)** Expresión de *FOXO3a* en muestras fibróticas (FPI) y control (Ctrl). **C)** Comparación entre la expresión de *SIRT1* y *FOXO3a* en muestras fibróticas (FPI) y control (Ctrl).

### RT-qPCR genes blanco

A continuación, se muestran los niveles relativos de expresión génica de genes blanco involucrados en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Los niveles de expresión génica de *SOD2*, *IGFB-P1* y *P21* (**figura 12.A,B y C, respectivamente**), se midieron mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), se realizó un análisis estadístico t-Student al 95% de confianza en el programa *Statgraphics® centurion™*, mediante el cual se pudo determinar que existe una diferencia significativa para los 3 genes blanco entre muestras control y fibróticas, ya que, se obtiene un valor de  $p < 0.05$  ( $p = 0.04$  para SOD2,  $p = 0.01$  para IGFB-P1 y  $p = 0.02$  para P21), gráficamente se observa la misma tendencia que con el análisis estadístico.



**Figura 12. A)** Expresión de SOD2 en muestras fibróticas (FPI) y control (Ctrl). **B)** Expresión de IGFB-P1 en muestras fibróticas (FPI) y control (Ctrl). **C)** Expresión de P21 en muestras fibróticas (FPI) y control (Ctrl).

### Western Blot

A continuación se muestran los resultados de los Western Blot que se realizaron para las líneas celulares que se trabajaron las primeras muestras (**figura 13.A y B**) y para las líneas celulares que se trabajaron las segundas muestras (**figura 14.A,B y C**). En la **figura 13.A** se puede observar una mayor expresión de FOXO3a en las muestras control en contraste con las muestras fibróticas (FPI), lo mismo ocurre con

la expresión de SIRT1. En la **figura 13.B** correspondiente a las muestras proteicas de citoplasma ocurre el mismo patrón que para las muestras proteicas de núcleo (**figura 13.A**).

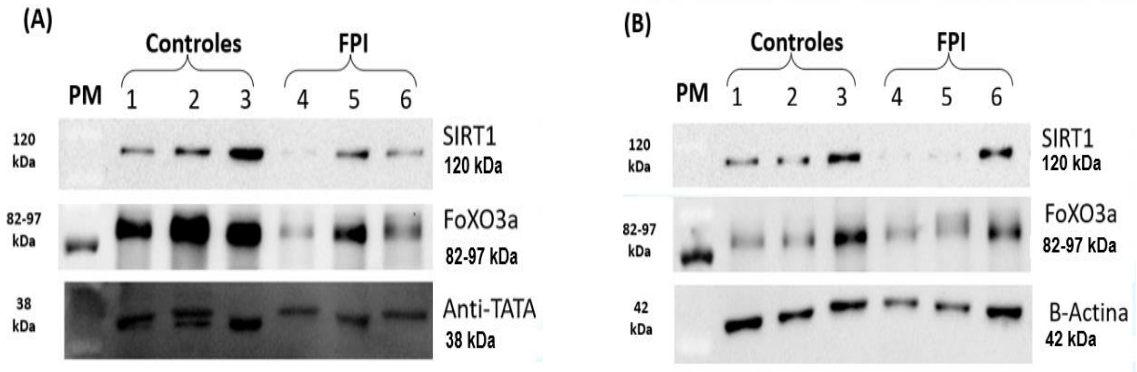


Figura 13. **(A) Análisis** de la expresión de FOXO3a y SIRT1 para muestras proteicas de núcleo mediante inmunotransferencia. **(B) Análisis** de la expresión de FOXO3a y SIRT1 para muestras proteicas de citoplasma mediante inmunotransferencia. (se utilizaron 40 ug de proteína en gels al 7.5 % de poliacrilamida)

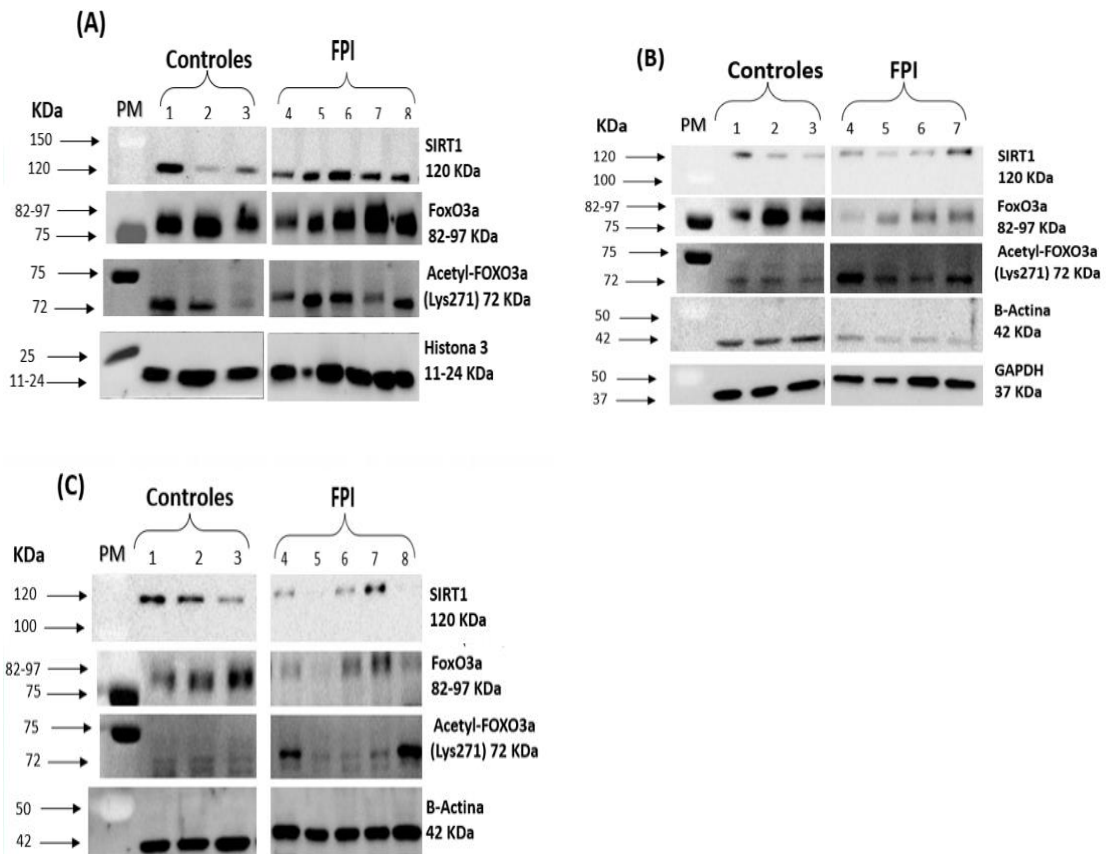


Figura 14. **(A)** Análisis de la expresión de Acetyl-FOXO3a, FOXO3a y SIRT1 para muestras proteicas de núcleo mediante inmunotransferencia. **(B)** Análisis de la expresión de Acetyl-FOXO3a, FOXO3a y SIRT1 para muestras proteicas de citoplasma mediante inmunotransferencia. **(C)** Análisis de la expresión de Acetyl-FOXO3a, FOXO3a y SIRT1 para muestras proteicas de lisado total mediante inmunotransferencia. (se utilizaron 10 ug de proteína en geles al 7.5 % de poliacrilamida)

En la **figura 14.A** (para muestras proteicas de núcleo) se puede observar una mayor expresión de Acetyl-FOXO3a, FOXO3a y SIRT1 en las muestras fibróticas (FPI) en contraste con las muestras control. En la **figura 14.B** (para muestras proteicas de citoplasma) se puede observar una mayor expresión de Acetyl-FOXO3a y SIRT1 en las muestras fibróticas (FPI) en contraste con las muestras control y con la expresión de FOXO3a ocurre lo contrario. En la **figura 14.C** (para muestras proteicas de lisado total) se puede observar una mayor expresión de Acetyl-FOXO3a en las muestras fibróticas (FPI) en contraste con las muestras control y con la expresión de FOXO3a y SIRT1 ocurre lo contrario.

*Estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel celular*

En la **figura 15.A) y B)**, se pueden observar los resultados del estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la línea celular NHLFp8, en ambos gráficos se observa una tendencia de disminución en el % de viabilidad conforme incrementa la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada.

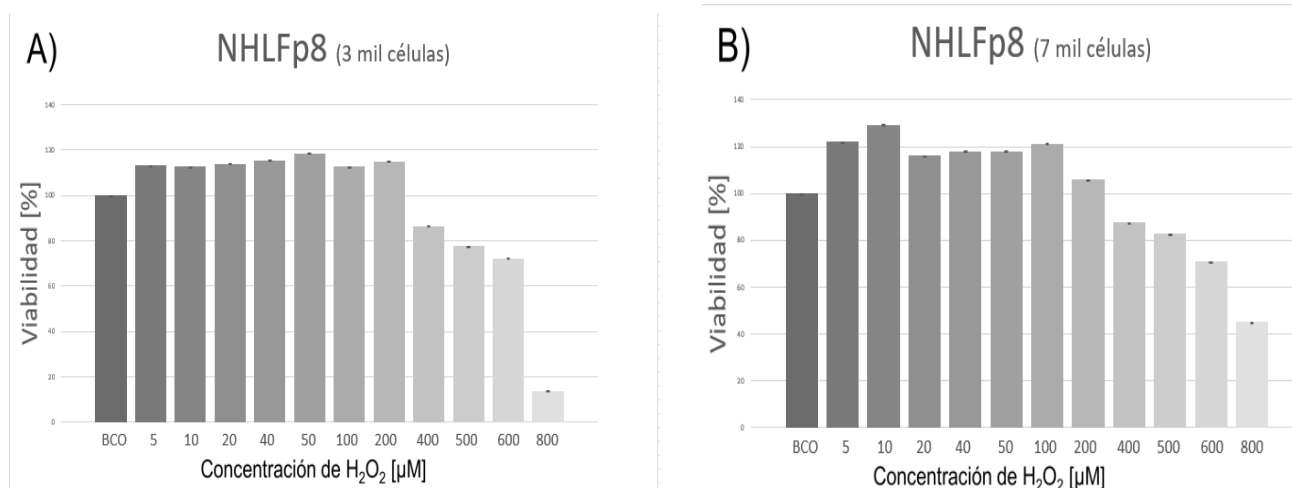


Figura 15. **A)** Viabilidad de la línea celular NHLFp8 después de 24 horas de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes concentraciones, utilizando un plaqueo de 3 mil células por pozo. **B)** Viabilidad de la línea

celular NHLFp8 después de 24 horas de tratamiento con  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones, utilizando un plaqueo de 7 mil células por pozo.

## 8. Discusión

De acuerdo con los resultados de la qPCR con sondas Taqman, se puede observar que hay una mayor expresión de SIRT1 en las muestras fibróticas respecto a las muestras control, por otro lado, la expresión de FOXO3a muestra lo contrario, Kobayashi *et al.* demostraron que en mamíferos SIRT1 interactúa física, funcional y fisiológicamente con FOXO, por lo que las posibles interacciones entre SIRT1 y FOXO3a se reflejan en los resultados con una menor expresión para FOXO3a, además, la menor expresión de FOXO3a en muestras fibróticas se podría deber a las posibles modificaciones postraduccionales llevadas a cabo por diversas enzimas y cofactores, como es la fosforilación, metilación, acetilación, glicosilación y ubiquitinación, de acuerdo con Xie *et al.* se ha demostrado que la activación de IKK induce la fosforilación de Ser644 en FOXO3a; la fosforilación en este residuo conduce tanto a la exclusión nuclear como a la degradación de las proteínas FOXO3a, otra posible interacción es la que ocurre en la vía de la insulina/IGF 1 en donde se da la fosforilación de FOXO3a en tres sitios; Thr32, Ser253 y Ser315, la fosforilación de estos sitios clave aumenta la asociación con las proteínas 14-3-3, lo que da como resultado la translocación de las proteínas FOXO3a desde el núcleo al citoplasma y conduce a su inactivación transcripcional, otros autores como Zhao *et al.* mencionan datos semejantes que indican que la fosforilación de FOXOs por AKT conduce a cito-localización plasmática y posterior degradación a través de la vía ubiquitina-proteasoma. En cuanto a los resultados para la qPCR con genes blanco se pudo observar una mayor expresión de p21, IGFB-P1 y SOD2 en muestras fibróticas respecto a las muestras control, dichos genes se relacionan específicamente con los factores de transcripción FOXO, lo cual comprueba que FOXO3a establece una relación con dichos genes blanco. Según Ferber *et al.*; FOXO3a ha sido previamente implicado en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la inducción de superóxido dismutasa que contiene manganeso (SOD2), de acuerdo con Yang *et al.* & Gan *et al.*; estudios previos han

demostrado que los factores de transcripción forkhead box, clase O (FOXO) interactúan con las secuencias de respuesta a la insulina (IRS) y median el efecto inhibitorio de la insulina en la expresión del gen IGFBP-1; Li *et al.* menciona que FOXO3a translocado, promueve directamente la transcripción del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina (CDKI) p21, por otro lado, puede reprimir la expresión de Skp2, lo que conduce a una regulación positiva de p21 que provoca la detención del ciclo celular en la fase G0/G1.

Respecto a los resultados de Western Blot correspondientes a las mismas líneas celulares que se trabajaron con sondas Taqman hay una mayor expresión de FOXO3a y SIRT1 en las muestras control en contraste con las muestras fibróticas, lo cual es algo desconcertante, sin embargo, esto se puede deber a algunas posibles variables dentro del manejo previo de las muestras, implicando desde el cultivo celular hasta la obtención de los extractos proteicos, a pesar de ello se puede observar una diferencia en la expresión de SIRT1 respecto a la expresión de FOXO3a, entre las muestras proteicas de núcleo y las muestras proteicas de citoplasma, existiendo mayor expresión en las muestras proteicas de núcleo, lo cual comprueba a nivel proteico que existe una relación entre SIRT1 y FOXO3a, según Brunet *et al.* FOXO3a se encuentra presente en el citoplasma pero en presencia de diversos estímulos se transloca hacia el núcleo en donde interacciona con SIRT1, para su desacetilación y activación. Los resultados de las mismas líneas celulares que se trabajaron con genes blanco muestran una mayor expresión de Acetyl-FOXO3a, FOXO3a y SIRT1 en las muestras fibróticas respecto a las muestras control, el nivel de expresión es mayor en muestras proteicas de núcleo, citoplasma y lisado total, respectivamente. Como anteriormente se mencionó, FOXO3a se encuentra en el citoplasma y a causa de un estímulo se transloca hacia el núcleo, previamente sufre la modificación postraduccional de acetilación y una vez dentro del núcleo interactúa con SIRT1, es por ello que se muestra una mayor expresión en las muestras nucleares ya que existe presencia de FOXO3a acetilado pero al mismo tiempo la SIRT1 está cumpliendo su función de desacetilar, por ello, las cantidades de FOXO total también se pueden observar expresadas de manera

significativa. En un estudio realizado por Brunet *et al.* demostraron que SIRT1 aumenta la capacidad de FOXO3 para inducir la resistencia al estrés oxidativo, lo cual se relaciona con la extensión de la vida útil.

Los resultados del estímulo realizado con  $H_2O_2$  a nivel celular mostraron un decrecimiento de la viabilidad celular conforme al incremento en la concentración del  $H_2O_2$ , sin embargo, se pudieron observar ligeras variaciones; con ciertas concentraciones de  $H_2O_2$  la viabilidad también aumentaba. De acuerdo con Yuting Yang, cuando realizó un ensayo con peróxido de hidrógeno en la línea celular CCK-8 tuvo resultados semejantes por lo que asumiendo que la mayor concentración de  $H_2O_2$  influía en su lectura, estableció algunos pozos de control sin células con concentraciones indicadas de peróxido de hidrógeno, estos conjuntos de control mostraron que el peróxido de hidrógeno en sí mismo tenía efectos en el ensayo CCK-8, y algunos pozos sin células incluso exhibieron una mayor "viabilidad celular" que las células del pozo.

## 9. Conclusiones

Al realizar el presente trabajo de investigación con base a los resultados de las pruebas a nivel proteico y genético se acepta la hipótesis propuesta, concluyendo que sí existe una sobreexpresión de FOXO3a en muestras fibróticas lo cual conlleva a modificaciones en la expresión de genes blanco (SOD, IGFB-P1 y P21) asociados al envejecimiento, de igual manera se comprobó que existe una interacción entre SIRT1 y FOXO3a con base en su expresión en las muestras fibróticas. Se logró cumplir satisfactoriamente con los objetivos propuestos ya que se realizó la evaluación de la expresión de FOXO3a a nivel de gen con sondas Taqman específicas en fibroblastos provenientes de pacientes con FPI y pacientes control, mediante técnica de PCR en tiempo real; se examinó la expresión de genes blanco de FOXO3a asociados al envejecimiento, mediante técnica de PCR en tiempo real; se analizó si existía diferencia en la expresión de FOXO3a en extractos totales, nucleares y citoplasmáticos de fibroblastos provenientes de pacientes con FPI y pacientes control, mediante técnica de Western Blot y finalmente se realizó un



estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel celular, sin embargo, este último objetivo no se pudo concluir debido a inconvenientes con la proliferación de las líneas celulares y con las cantidades requeridas de extractos proteicos para poder determinar si bajo dicho estímulo se modifica la expresión y localización celular de FOXO3a.

## 10. Referencias

Adan, A., Kiraz, Y. y Baran, Y. (2016). Ensayos de proliferación celular y citotoxicidad. *Biotecnología farmacéutica actual*, 17(14), 1213–1221.

<https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>

American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). (2000). Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. . *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(2 Pt 1), 646–664. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.2.ats3-00>

Arjuna K. (2007). Cell Proliferation Reagent WST-1 From Roche Applied Science. <https://www.biocompare.com/Product-Reviews/40930-Cell-Proliferation-Reagent-WST-1-From-Roche-Applied-Science/>

Boon, K., Bailey, N. W., Yang, J., Steel, M. P., Groshong, S., Kervitsky, D., ... Schwartz, D. A. (2009). *Molecular Phenotypes Distinguish Patients with Relatively Stable from Progressive Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)*. *PLoS ONE*, 4(4), e5134. doi:10.1371/journal.pone.0005134

Brennan, R. G., & Matthews, B. W. (1989). The helix-turn-helix DNA binding motif. *The Journal of biological chemistry*, 264(4), 1903–1906.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80595-4)

Calnan, D R; Brunet, A (2008). The FoxO code. , 27(16), 2276–2288. doi:10.1038/onc.2008.21

Cheng, Z. (2019). *The FoxO–Autophagy Axis in Health and Disease*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(9), 658–671. doi:10.1016/j.tem.2019.07.009

Cushing, L., Kuang, P. P., Qian, J., Shao, F., Wu, J., Little, F., ... Lü, J. (2011). *miR-29 Is a Major Regulator of Genes Associated with Pulmonary Fibrosis. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(2), 287–294. doi:10.1165/rcmb.2010-0323oc

Dansen, T. B., & Burgering, B. M. (2008). Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins. *Trends in cell biology*, 18(9), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.004>

Douglas, W. W., Ryu, J. H., Swensen, S. J., Offord, K. P., Schroeder, D. R., Caron, G. M., & DeRemee, R. A. (1998). Colchicine versus prednisone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. A randomized prospective study. Members of the Lung Study Group. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158(1), 220–225. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.1.9709089>

Du, S., & Zheng, H. (2021). Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases. *Cell & bioscience*, 11(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00700-7>

Egan, J. J., & Woodcock, A. A. (1996). Does the treatment of cryptogenic fibrosing alveolitis influence prognosis?. *Respiratory medicine*, 90(3), 127–130. [https://doi.org/10.1016/s0954-6111\(96\)90153-5](https://doi.org/10.1016/s0954-6111(96)90153-5)

Essafi, A., Fernández de Mattos, S., Hassen, Y. A., Soeiro, I., Mufti, G. J., Thomas, N. S., Medema, R. H., & Lam, E. W. (2005). Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene*, 24(14), 2317–2329. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208421>

Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 469–486. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00551.x>

Ferber, E., Peck, B., Delpuech, O. et al. FOXO3a regula el metabolismo reactivo del oxígeno mediante la inhibición de la expresión génica mitocondrial. *Cell Death Differ* 19, 968–979 (2012). <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.179>

Gan, L., Han, Y., Bastianetto, S., Dumont, Y., Unterman, T. G., & Quirion, R. (2005). FoxO-dependent and -independent mechanisms mediate SirT1 effects on IGF1R gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(4), 1092–1096. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.169

Greer, E. L., & Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, *24*(50), 7410–7425. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209086>

Hardie, W. D., Glasser, S. W., & Hagood, J. S. (2009). Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *The American journal of pathology*, *175*(1), 3–16. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081170>

Hart G. W. (2019). Nutrient regulation of signaling and transcription. *The Journal of biological chemistry*, *294*(7), 2211–2231. <https://doi.org/10.1074/jbc.AW119.003226>

Harrison S. C. (1991). A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature*, *353*(6346), 715–719. <https://doi.org/10.1038/353715a0>

Hunninghake, G. W., & Kalica, A. R. (1995). Approaches to the treatment of pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *151*(3 Pt 1), 915–918. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.3.7881692>

Johnston, I. D., Gomm, S. A., Kalra, S., Woodcock, A. A., Evans, C. C., & Hind, C. R. (1993). The management of cryptogenic fibrosing alveolitis in three regions of the United Kingdom. *The European respiratory journal*, *6*(6), 891–893.

KING, T. E., TOOZE, J. A., SCHWARZ, M. I., BROWN, K. R., & CHERNIACK, R. M. (2001). *Predicting Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *164*(7), 1171–1181. doi:10.1164/ajrccm.164.7.2003140

Kobayashi, Y., Furukawa-Hibi, Y., Chen, C., Horio, Y., Isobe, K., Ikeda, K., & Motoyama, N. (2005). SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine*. doi:10.3892/ijmm.16.2.237

KURIEN, B., & SCOFIELD, R. (2006). *Western blotting. Methods*, *38*(4), 283–293. doi:10.1016/j.ymeth.2005.11.007

Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., & Weirauch, M. T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*, *172*(4), 650–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>

Landschulz, W. H., Johnson, P. F., & McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4860), 1759–1764. <https://doi.org/10.1126/science.3289117>

Li, F., Dong, X., Lin, P., & Jiang, J. (2018). Regulation of Akt/FoxO3a/Skp2 Axis Is Critically Involved in Berberine-Induced Cell Cycle Arrest in Hepatocellular Carcinoma Cells. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 327. <https://doi.org/10.3390/ijms19020327>

Link, W., & Fernandez-Marcos, P. J. (2017). *FOXO transcription factors at the interface of metabolism and cancer. International Journal of Cancer*, 141(12), 2379–2391. doi:10.1002/ijc.30840

Link, Wolfgang (2019). [Methods in Molecular Biology] FOXO Transcription Factors Volume 1890 (Methods and Protocols) || Introduction to FOXO Biology. , 10.1007/978-1-4939-8900-3(Chapter 1), 1–9. doi:10.1007/978-1-4939-8900-3\_1

Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thannickal, V. J., ... Abraham, E. (2010). *miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. The Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1589–1597. doi:10.1084/jem.20100035

Loomis-King, H., Flaherty, K. R., & Moore, B. B. (2013). *Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis. Current Opinion in Pharmacology*, 13(3), 377–385. doi:10.1016/j.coph.2013.03.015

McAnulty, R. J., & Laurent, G. J. (1995). Pathogenesis of lung fibrosis and potential new therapeutic strategies. *Experimental nephrology*, 3(2), 96–107.

Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., & Burgering, B. M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 404(6779), 782–787. <https://doi.org/10.1038/35008115>

Meftahi, G. H., Bahari, Z., Zarei Mahmoudabadi, A., Iman, M., & Jangravi, Z. (2021). *Applications of western blot technique: From bench to bedside. Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(4), 509–517. doi:10.1002/bmb.21516

MERCK(2022). Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability. <https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/protocol/cell->

culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-reagent-wst-1

Morris, B. J., Willcox, D. C., Donlon, T. A., & Willcox, B. J. (2015). FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. *Gerontology*, 61(6), 515–525. doi:10.1159/000375235

Panos, R. J., Mortenson, R. L., Niccoli, S. A., & King, T. E., Jr (1990). Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: causes and assessment. *The American journal of medicine*, 88(4), 396–404. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(90\)90495-y](https://doi.org/10.1016/0002-9343(90)90495-y)

Peters, S. G., McDougall, J. C., Douglas, W. W., Coles, D. T., & DeRemee, R. A. (1993). Colchicine in the treatment of pulmonary fibrosis. *Chest*, 103(1), 101–104. <https://doi.org/10.1378/chest.103.1.101>

Raghu, G., Collard, H. R., Egan, J. J., Martinez, F. J., Behr, J., Brown, K. K., Colby, T. V., Cordier, J. F., Flaherty, K. R., Lasky, J. A., Lynch, D. A., Ryu, J. H., Swigris, J. J., Wells, A. U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D. M., ... ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(6), 788–824. <https://doi.org/10.1164/rccm.2009-040GL>

Rennard, S. I., Bitterman, P. B., Ozaki, T., Rom, W. N., & Crystal, R. G. (1988). Colchicine suppresses the release of fibroblast growth factors from alveolar macrophages in vitro. The basis of a possible therapeutic approach of the fibrotic disorders. *The American review of respiratory disease*, 137(1), 181–185. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/137.1.181>

Selman, Moisés (2001). *Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy*. *Annals of Internal Medicine*, 134(2), 136–. doi:10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015

Selman, M., Rojas, M., Mora, A., & Pardo, A. (2010). *Aging and Interstitial Lung Diseases: Unraveling an Old Forgotten Player in the Pathogenesis of Lung Fibrosis*. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 31(05), 607–617. doi:10.1055/s-0030-1265901

Shimokawa, I., Komatsu, T., Hayashi, N., Kim, S.-E., Kawata, T., Park, S., ... Mori, R. (2015). *The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. Aging Cell, 14(4), 707–709.* doi:10.1111/accel.12340

Singh, H., Khan, A. A., & Dinner, A. R. (2014). Gene regulatory networks in the immune system. *Trends in immunology, 35(5), 211–218.* <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.03.006>

Spitz, F., & Furlong, E. E. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nature reviews. Genetics, 13(9), 613–626.* <https://doi.org/10.1038/nrg3207>

Spreitzer, Emil et al. (2022). “FOXO transcription factors differ in their dynamics and intra/intermolecular interactions.” *Current research in structural biology* vol. 4 118-133. 27. doi:10.1016/j.crstbi.2022.04.001

Tamay de Dios L., Ibarra C. & Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Volumen 2 Número 2, pp 70-78. <http://www.medigraphic.com/rid>

Talmadge E King Jr; Annie Pardo; Moisés Selman (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. , 378(9807), 0–1961. doi:10.1016/s0140-6736(11)60052-4  
[Sci-Hub | Idiopathic pulmonary fibrosis | 10.1016/s0140-6736\(11\)60052-4 \(hkvisa.net\)](https://www.sci-hub.net/10.1016/s0140-6736(11)60052-4)

Taylor, S. C. y Posch, A. (2014). El diseño de un experimento cuantitativo de Western blot. *BioMed research international, 2014,* 361590. <https://doi.org/10.1155/2014/361590>

Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology, 3(5), 349–363.* <https://doi.org/10.1038/nrm809>

T. Murphy Coleen & J. Hu. Patrick (2013). Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*\*. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.164.1, <http://www.wormbook.org>

Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace, A. J., Jr, DiStefano, P. S., Chiang, L. W., & Greenberg, M. E. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science (New York, N.Y.), 296(5567), 530–534.* <https://doi.org/10.1126/science.1068712>



van Moorsel, C. H. M., van Oosterhout, M. F. M., Barlo, N. P., de Jong, P. A., van der Vis, J. J., Ruven, H. J. T., van Es, H. W., van den Bosch, J. M. M. & Grutters, J. C. (2010, 1 diciembre). Surfactant Protein C Mutations Are the Basis of a Significant Portion of Adult Familial Pulmonary Fibrosis in a Dutch Cohort. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(11), 1419-1425. <https://doi.org/10.1164/rccm.200906-0953oc>

Wang, X., Hu, S., & Liu, L. (2017). Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically? *Oncology Letters*, 13(5), 2867–2872. doi:10.3892/ol.2017.5851

Webb, A. E., & Brunet, A. (2014). *FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 159–169. doi:10.1016/j.tibs.2014.02.003

Webb, A. E., Kundaje, A., & Brunet, A. (2016). *Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. Aging Cell*, 15(4), 673–685. doi:10.1111/acel.12479

Weigel, D., & Jäckle, H. (1990). The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors?. *Cell*, 63(3), 455–456. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90439-l](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90439-l)

Wingender, E., Schoeps, T., Haubrock, M., & Dönitz, J. (2015). TFClass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D97–D102. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1064>

Wynn T. A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*, 117(3), 524–529. <https://doi.org/10.1172/JCI31487>

Xie, Q.; Chen, J.; Yuan, Z. (2012). *Post-translational regulation of FOXO. Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(11), 897–901. doi:10.1093/abbs/gms067

Yang, L., Tang, Q., Wu, J., Chen, Y., Zheng, F., Dai, Z., & Hann, S. S. (2016). Inter-regulation of IGFBP1 and FOXO3a unveils novel mechanism in ursolic acid-inhibited growth of hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1). doi:10.1186/s13046-016-0330-2

Zhao, Y., Wang, Y., & Zhu, W.-G. (2011). Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(5), 276–282. doi:10.1093/jmcb/mjr013