

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



“Modulación del factor de transcripción FoXO1 en células endoteliales por glucosa y ácido palmítico: implicancias para la homeostasis redox”

Juan Pablo Benítez Cárdenas

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas y Médicas
Mención Fisiología**

Director de Tesis: Omar Hugo Porras Espinoza

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

JUAN PABLO BENÍTEZ CÁRDENAS

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Ciencias Biológicas y Medicas** con **mención en Fisiología** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de Octubre 2015.

Prof. Dr. Omar Porras E.

Director de Tesis

Laboratorio de Biología Celular

Instituto Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. HECTOR CONTRERAS.

PROF. DR. GINA SANCHEZ.

PROF. DR. RAMÓN RODRIGO.

Presidente Comisión de Examen

Dedicatoria

Dedico esta tesis a todos aquellos que creyeron en mí, a aquellos que me apoyaron incondicionalmente y ayudándome a cultivar mi espíritu de perseverancia en cada paso que di hacia la culminación de mis estudios.

Agradecimientos

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Omar Porras, quien me guió durante este largo periodo a adquirir las diversas habilidades necesarias para desarrollar esta tesis, poniendo a disposición tiempo y mucha paciencia para guiar a un inexperto profesional de la salud en la área de la investigación para así dar mis primeros pasos en lo que involucra hacer ciencia.

Por otra parte me es importante poder destacar el rol que tuvo los diversos integrantes del laboratorio de biología celular tales como Carla Ramella, Nicolás Tobar, Nicolás Méndez, Flavia Román entre tantos otros, que me ayudaron, entregándome su conocimiento de forma desinteresada, y que constantemente me apoyaron en momentos en los cuales el proceso fue más árido.

Por ultimo quiero dar las infinitas gracias a todo el círculo de amigos y familia tanto sanguínea como política que me rodeó a lo largo de todos estos años de estudio durante el magister en Santiago, pues fueron periodos de constantes cambios en ámbitos diversos tanto personales como profesionales, asistiéndome en múltiples ocasiones con consejos, palabras de aliento y como de decirlo en muchas ocasiones sus mismas casas para alojar a este constante nómada errante.

INDICE

1. Resumen	6
2. Abstract	8
3. Introducción	10
3.1. Enfermedades cardiovasculares y papel del endotelio en la regulación de la presión	10
3.2. Óxido nítrico	11
3.3. Disfunción endotelial en obesidad	12
3.4. Regulación del factor de transcripción FoXO1 y su relación con el sistema antioxidante celular	13
4. Hipótesis	15
5. Objetivo General	15
5.1. Objetivos Específicos	15
6. Métodos	16
6.1. Material y reactivos	16
6.2. Cultivo celular	16
6.3. Condiciones experimentales y maniobra prosprandial in vitro	16
6.4. Inmunodetección de FoXO1 y TXNIP	17
6.5. Infección con GFP-FoXO1 y HyPer	19
6.6. PCR cuantitativa	20
6.7. Análisis de imágenes	21
6.8. Análisis Estadístico	21
7. Resultados	22
8. Discusión	31
9. Conclusiones	35
10. Bibliografía	36
11. Anexo	43

1. RESUMEN

El sistema vascular controla la adecuada perfusión de los tejidos, permitiendo el intercambio gaseoso, la entrega de nutrientes y la remoción de desechos celulares. La microvasculatura es particularmente importante porque es la que ejerce la resistencia periférica y por ende, determina la presión arterial sistémica. El endotelio que recubre estos lechos vasculares responde a diversas señales como la acetilcolina, las bradicininas y a la estimulación mecánica ejercida por el roce del flujo sanguíneo entre otros, modulando la producción de óxido nítrico, el cual además de ser un potente vasodilatador, posee propiedades anticoagulantes, citoprotectoras, anti-inflamatorias y anti-aterogénicas.

La disfunción endotelial, un término que implica una disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico, ha sido propuesta como uno de los mecanismos patogénicos que conecta a la obesidad con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Si consideramos que la biodisponibilidad del óxido nítrico está íntimamente ligada al estado reductor/oxidante (redox) de la célula endotelial y que, algunas de las perturbaciones comunes observadas en cuadros de obesidad, tales como, hiperlipidemia, insulino-resistencia e hiperglicemia, generan estrés celular oxidativo, es crucial entender qué mecanismos moleculares determinan el balance redox endotelial en condiciones fisiopatológicas.

El factor de transcripción FoXO1 integra las señales metabólicas imperantes y regula la homeostasis redox a través de la expresión de proteínas involucradas en la neutralización de especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa entre otras. En endotelio, se ha reportado a la TXNIP (*thioredoxin negative interacting protein*) como uno de sus blancos moleculares, esta proteína modula la actividad de las tiorredoxinas (Txr), vitales para la conversión de puentes disulfuro a sulfhidrilos de proteínas celulares, por consiguiente FoXO1 es un excelente candidato para regular la homeostasis redox en función de las condiciones metabólicas a las que se expone el lecho vascular.

En esta tesis se investigó si el factor de transcripción FoXO1 es regulado por señales metabólicas impuestas por escenarios hiperglicémicos o con elevados niveles de ácidos grasos saturados en modelos celulares de endotelio provenientes de la

microvasculatura. Para tal fin, estudiamos la localización relativa de FoXO1 endógeno en núcleo y citoplasma, así como también, a través de la visualización en tiempo real de la proteína de fusión GFP-FoXO1. Determinamos la expresión de la proteína TXNIP, como uno de sus blancos moleculares y realizamos mediciones de la actividad redox citoplasmática a través del registro en tiempo real del biosensor HyPer en células endoteliales vivas.

2. ABSTRACT

The vascular system controls the adequate perfusion of the tissues, allowing gas exchange, nutrients delivery and cellular waste products removal. The microvasculature is particularly important because it exerts the peripheral resistance and, thus, determines systemic arterial pressure. The endothelium that covers these vascular beds responds to diverse signals like acetylcholine, bradykinins and mechanical stimulus by blood flow among others, modulating the production of nitric oxide, which beside to be a powerful vasodilator, owns anticoagulant, cytoprotective, anti-inflammatory and anti-atherogenic properties. Endothelial dysfunction, a term that implies a decrease in nitric oxide bioavailability, has been proposed as one of the pathogenic mechanisms that connects obesity with the development of cardiovascular diseases. If we consider that bioavailability of nitric oxide is closely linked to the oxidation/reduction state (redox) of endothelial cells and that, some of the common systemic perturbations observed in obesity include hyperlipidemia, insulin-resistance and hyperglycemia, which in turn, generate oxidative stress, it is crucial to gain knowledge concerning the molecular mechanisms involved in endothelial redox balance in pathophysiological conditions. The transcription factor FoXO1 integrates prevailing metabolic signals and regulates redox homeostasis through expression of proteins involved in neutralization of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide dismutase (SOD) and catalase, among others. In endothelium, TXNIP (thioredoxin negative interacting protein) has been reported as one of their molecular targets. This protein modulates the activity of Thioredoxins (Trx), essential for conversion of disulfide bridges to sulfhydryls on residues of proteins. Therefore, FoXO1 is an excellent candidate to regulate redox homeostasis according to metabolic conditions to which the vascular bed is exposed. In this thesis we focused on the regulation of the transcription factor FoXO1 by metabolic signals imposed by hyperglycemic scenarios or high saturated fatty acid levels in endothelial cell models coming from microvasculature. We studied the subcellular presence of endogenous FoXO1 and also, we were able to describe the dynamic of subcellular of the fusion protein, GFP-FoXO1. In order to determine the redox impact of differential nuclear residence of FoXO1, we monitor the redox status of living endothelial cells by means

of redox biosensor HyPer along with determinations of TXNIP protein, as one of its molecular targets.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Enfermedades cardiovasculares y rol endotelial en la regulación de la presión.

Hoy en día, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte por año a nivel mundial. El principal factor responsable de este triste récord confluente en llevar un estilo de vida caracterizado por hábitos que incluyen el consumo de dietas no saludables, sedentarismo, consumo de tabaco y alcohol, los cuales en conjunto causan al menos un 80% de las enfermedades cerebro y cardiovasculares (1).

En la patogenia de las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas a una excesiva ganancia de peso, tales como la diabetes mellitus (DM), hiperlipidemias, el síndrome metabólico y la hipertensión, es común encontrar complicaciones vasculares como retinopatías, nefropatías, infecciones refractarias, úlceras y/o amputaciones, todas ellas, condiciones que disminuyen la calidad de vida no sólo de los pacientes, sino también de su entorno familiar y social (1).

La regulación de la presión arterial sistémica depende del tono vascular de la microvasculatura, lugar donde se ejerce gran parte de la resistencia periférica. En términos fisiológicos, el tono vascular es la resultante de la acción simultánea de agentes vaso-constrictores y dilatadores, en su mayoría secretados localmente por el endotelio, el cual corresponde a una monocapa celular que tapiza los vasos sanguíneos (Figura 1). Uno de los agentes vasoconstrictores secretados por el endotelio corresponde a la endotelina 1 (ET-1), la cual estimula la contracción del músculo liso vascular y su proliferación ante señales de insulina o angiotensina II (2,3). Por el contrario, la vaso-dilatación dependiente del endotelio está mediada principalmente por el óxido nítrico (NO), sin embargo, existen otros vasodilatadores como la prostaglandina 2 (PG2) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) (4). Señales extracelulares como la acetilcolina (ACh), la bradicinina (BKK), el ATP y la estimulación mecánica por roce (*Shear Stress*) y/o la hipoxia estimulan la producción de NO, que no sólo mantiene el tono vascular apropiado, sino también, modula las respuestas inflamatorias, ejerce acción anti-coagulante, promueve la angiogénesis y mantiene la permeabilidad de la capa endotelial (5-7).

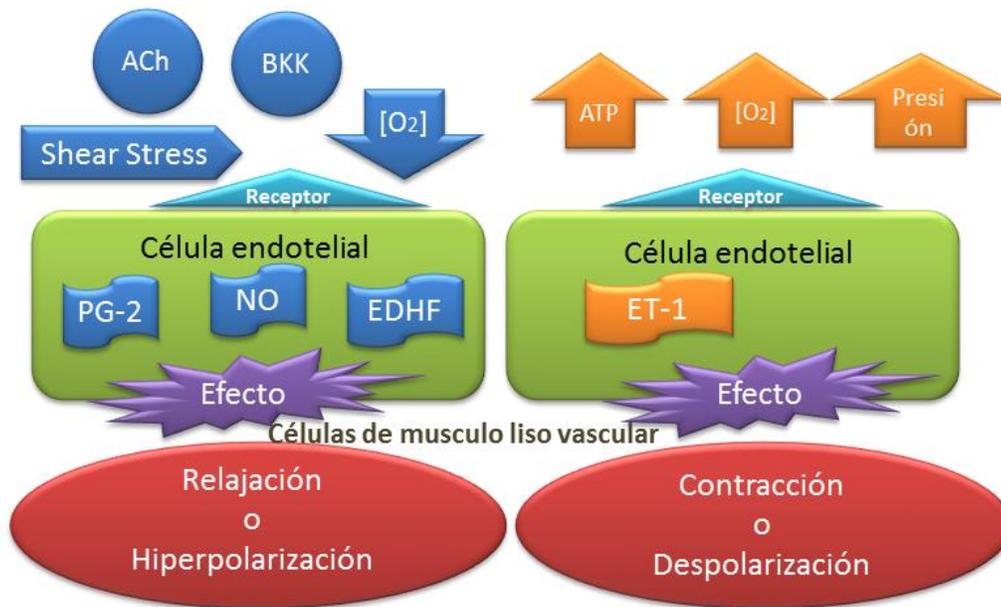


Figura 1: Regulación del tono vascular por células endoteliales (ECs): La señales de Shear Stress, Ach, BKK o caídas en la concentración de oxígeno promueven la generación de PG-2, NO y EDHF, las cuales tienen efecto de relajación del músculo liso, en cambio aumentos en la presión o concentración de oxígeno y/o ATP estimulan la formación de ET-1 en ECs, provocando contracción del músculo liso.

3.2. Óxido nítrico

En 1980, Furchgott and Zawadzki aislaron una molécula con propiedades vasodilatadoras que llamaron *endothelial-derived relaxing factor* (8). Siete años más tarde, Ignaro y Moncada identificaron esta molécula como NO. El NO, de naturaleza gaseosa, es producido por la NO Sintasa endotelial (eNOS) a través de la conversión de L-arginina en L-citrulina con el aporte de electrones de los cofactores NADPH, FADH₂ y tetrahidrobiopterina (BH₄) (9). Este gas difunde libremente, sin embargo, su paso por la membrana es notablemente facilitado por la presencia de las aquaporinas (AQP) (10). Una vez en el músculo, el NO interacciona con el grupo *heme* de la enzima guanilato ciclasa, estimulando la formación de GMP cíclico que a su vez, activa a las fosfatasa de la cadena liviana de la miosina, con la consecuente relajación muscular (11). Otros mecanismos por los cuales el NO genera relajación incluyen la nitrosilación y la apertura de canales de potasio dependientes de ATP, evento que conlleva a la hiperpolarización de la membrana plasmática y restringe la entrada de Ca⁺⁺ (12-13). Además de producir relajación muscular, el NO inhibe la activación, secreción y agregación de plaquetas (14), evita la adhesión leucocitaria (15) y participa en

procesos de reparación ante daños endoteliales o lesiones vasculares, generando angiogénesis (16) entre otras funciones.

3.3 Disfunción endotelial en obesidad

La disfunción endotelial es un término referido a una disminución en la biodisponibilidad de NO, un escenario que puede ser causado por un impedimento en su producción y/o un aumento en su degradación. La biodisponibilidad del NO está íntimamente ligada al estado redox de la célula endotelial debido a que la producción enzimática de NO depende de la apropiada disponibilidad de NADPH, FADH₂ y BH₄, todos agentes redox activos vulnerables de ser oxidados en situaciones de estrés oxidativo. Niveles elevados del anión superóxido O₂⁻, pueden generar peroxinitrito (ONOO⁻) al combinarse con el NO (17) y oxidar la molécula BH₄ (18-19), lo cual fomenta la producción de O₂⁻ por la misma eNOS, un fenómeno descrito como el desacoplamiento de la eNOS.

En general, la obesidad se considera un cuadro complejo con características pro-inflamatorias y pro-oxidantes (20). La desregulación metabólica del tejido adiposo implica un cambio del perfil secretor de los adipocitos hacia uno pro-inflamatorio y bajo en adiponectina (21-23). A modo de ejemplo, el TNF- α y la IL-6 inducen un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa, fuente productora de O₂⁻, un proceso dependiente de PKC (24). Otras señales como altos niveles de ácidos grasos saturados libres, angiotensina II, TNF- α , IL-1 β , ET-1 e incluso la hiperglicemia han sido vinculados como responsables de la disminución en la expresión y actividad de eNOS, síntesis de BH₄ y la consecuente biodisponibilidad del NO(25-31).

En conjunto, la evidencia indica que en la obesidad el organismo está sometido a señales que generan estrés oxidativo a nivel celular, lo cual a su vez, podría afectar la biodisponibilidad del NO en el endotelio.

3.5. Regulación del factor de transcripción FoXO1 y su relación con el sistema antioxidante celular

Los factores de transcripción FoXO integran señales metabólicas con el estado redox celular (32). En mamíferos, existen cuatro miembros en esta familia: FoXO1, FoXO3, FoXO4 y FoXO6. Estos están regulados por modificaciones post-traduccionales como, fosforilación, acetilación y ubiquitinización, participando en diversas funciones celulares tales como metabolismo, diferenciación, proliferación y supervivencia (33-34). De los cuatro miembros, quizás el más relacionado con el estado redox es FoXO1, el cual también participa en la regulación de la gluconeogénesis/glicogenólisis en el hígado (35) y en la adipogénesis (36). El papel de FoXO1 en la resistencia frente al estrés oxidativo fue demostrada en un modelo animal nulo para FoXO1, cuyos osteoblastos presentaron un acentuado estado oxidativo, lo cual fue atribuido a una expresión disminuida de SOD2 y bajos niveles de GSH, lo que sugiere que FoXO1 es necesario para mantener las defensas antioxidantes en el tejido óseo y que, la pérdida de función podría ser parte de la patogenia de la osteoporosis (37). Por otra parte, la localización nuclear de FoXO1 mostró ser cardioprotectora frente a escenarios de isquemia y reperfusión, así como también frente a infarto, probablemente ligado a la expresión de enzimas antioxidantes SOD y catalasa por FoXO1 (38).

En general, factores de crecimiento como la insulina o IGF-1, inducen la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS) lo cual activa la vía PI3K/AKT (39), esta última fosforila a FoXO1 disminuyendo su actividad transcripcional. Adicionalmente, la interacción proteína-proteína de FoXO1 con XBP1, un factor de transcripción activado por estrés del retículo endoplásmico (40), genera un complejo susceptible de ser ubiquitinizado y por ende, degradado (41). En resumen, el estado metabólico junto con la actividad de FoXO1 son factibles de ser estudiadas a nivel celular mediante la manipulación de los factores de crecimiento, esta maniobra ha sido utilizada con éxito para activar a XBP-1 en fibroblastos de ratón (42).

En el endotelio sucede algo diferente, la localización nuclear de FoXO1 coincide con un aumento en el estrés oxidativo ya que regularía negativamente a la kalistatina y a la eNOS, lo cual aumentaría el estrés oxidativo vía señalización JNK (43). De

manera complementaria, FoXO1 comanda la expresión de TXNIP, proteína que juega un rol crítico en el estado redox al interactuar con las tiorredoxinas (TRXS) tanto en su isoforma citosólica (TRX1) como en la mitocondrial (TRX2) inhibiendo su actividad. Las TRX son parte de una serie de moléculas que mantienen el potencial reductor tonificado, niveles de NADH y NADPH suficientes para garantizar la producción de NO (44-46), por lo cual su disminución podría repercutir en un aumento del estado oxidativo, tal como se ha reportado ante estados de hiperglicemia en células endoteliales (47).

Este proyecto está orientado a conocer cómo el balance redox de las células endoteliales es modificado por señales metabólicas características de la obesidad, hiperglicemia y altos niveles de ácidos grasos saturados. En virtud de la capacidad integradora que posee FoXO1 entre metabolismo y estado redox, su regulación es de interés como mecanismo que conecta a la obesidad con los eventos que llevan a una disfunción endotelial. Particularmente, utilizaremos modelos celulares de endotelio de la microvasculatura de origen murino y humano, los cuales serán expuestos a diferentes condiciones metabólicas. La regulación del tránsito hacia el núcleo o distribución subcelular de FoXO1 será registrada por técnicas de inmunocitoquímica y fraccionamiento subcelular. Además, la expresión de uno de sus blancos río abajo, la proteína TXNIP será inmuno-detectada igualmente.

3. HIPÓTESIS

La hiperglicemia y los niveles elevados de palmitato modifican la distribución subcelular de FoXO1, un factor de transcripción que integra el metabolismo y el balance redox en las células endoteliales.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la distribución subcelular de FoXO1 y su impacto en la expresión de TXNIP en células endoteliales expuestas a hiperglicemia y elevados niveles de palmitato.

5.1 Objetivos específicos:

1. Inmuno-localizar la proteína FoXO1 en núcleo y citoplasma de células endoteliales expuestas a condiciones control y a elevados niveles de glucosa y ácido palmítico.
2. Determinar la dinámica de la migración intracelular de la proteína de fusión GFP-FoXO1 en células vivas expuestas a las condiciones experimentales (hiperglicemia y altos niveles de palmitato).
3. Determinar el impacto de la modulación de FoXO1 por glucosa/ palmitato en la expresión de TXNIP, como reportero endógeno de FoXO1 en células endoteliales.

6. Materiales y Métodos

6.1. Materiales y reactivos

Los medios de cultivos DMEM, M131 y el suplemento MVGS (*Microvascular Growth Supplement*), tripsina, antibióticos y los reactivos propios para mantener el cultivo celular se adquirieron en Life technologies S.A. (Oregon, USA). Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa o con fluorescencia provienen de Rockland (USA). El suero bovino fetal (SBF) y la albúmina de suero bovino (BSA) fueron adquiridos en Corning Ltda. (USA) y Winkler S.A. (Chile). Reactivos como el ácido palmítico y las sales para elaborar el tampón KRH fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Química LTDA.

6.2. Cultivo celular

La línea celular endotelial de microvasculatura de origen murino, “Mouse Hemangioendothelioma Endothelial Cells” (EOMA ATCC® CRL-2586), y la línea celular HepG2 (ATCC® HB-8065™) fueron mantenidas en un ambiente humidificado a 37°C con 5% CO₂ en medio de cultivo DMEM con alta glucosa (25 mM) o baja glucosa (5 mM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBF 10%). La línea celular endotelial de la microvasculatura humana adulta, HMVECA_d (Invitrogen, USA) fue mantenida en medio M131 suplementado con MGVS. Cabe señalar, que este tipo celular necesita del pre-tratamiento de la superficie de las placas con gelatina al 0.1% (Attachment factor). El medio de cultivo fue reemplazado cada 2-3 días, mientras que su expansión se realizó por tripsinización.

6.3. Condiciones experimentales y maniobra postprandial *in vitro*

Las células fueron sembradas en medios de cultivo en baja glucosa (5 mM) o alta glucosa (25 mM). Para las condiciones experimentales que incluían la exposición a palmitato/BSA, primero se preparó una solución de BSA al 20% en tampón KRH (en mM: 140 NaCl, 4,7 KCl, 20 Hepes, 1,25 MgSO₄, 1,25 CaCl₂, ajustado a pH 7,4), sobre la cual se agregó el volumen necesario de una solución stock de palmitato 200 mM/EtOH para generar una solución de 8 mM, se agitó gentilmente durante toda la

noche a 37%. Se determinó la dosis máxima no letal a través del test de viabilidad celular (Anexo, Figura 1) basado en la reducción de MTT.

Para evaluar la dinámica de migración subcelular de FoXO1 en las células EOMA, se utilizó una maniobra que se denominó “postprandial *in vitro*” que consistió en mantener las células en ausencia de suero fetal bovino (SBF) por 16-20 horas para luego ser re-expuestas al SBF al 10%. Esta maniobra ha sido efectiva para inducir una acumulación de FoXO1 en el núcleo celular de hepatocitos (48-49). Esto se corroboró en el laboratorio con células HEPG2 que expresaban GFP-FoXO1 como se muestra en el anexo (Anexo Figura 2).

6.4. Inmunodetección de FoXO1 y TXNIP

Inmunocitoquímica Las células fueron previamente sembradas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro, y una vez expuestas a las condiciones experimentales, fueron sometidas a fijación con paraformaldehído al 4% por 5-10 min, para luego ser lavadas tres veces con PBS frío. La permeabilización de la muestra fue alcanzada tratando las células fijadas con Triton X-100 (0.1%), gelatina de pescado (1%) y Tween 20 (0.2%) en PBS durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió al bloqueo con BSA (1%) y suero de cabra (5%) en PBS. La proteína FoXO1 fue detectada incubando con el anticuerpo monoclonal anti-FoXO1 generado en conejo con una dilución 1: 100 (Cell signaling Technologies, USA), la proteína marcadora de endotelio, el factor von Willebrand (vW-factor), fue reconocida por el anticuerpo policlonal anti-vW proveniente de conejo. La detección de los anticuerpos primarios se llevó a cabo con la posterior incubación con anticuerpos anti-conejo conjugados con moléculas fluorescentes como Alexa 488 (verde) o SA-Cy3 (rojo). Los cubreobjetos fueron posteriormente montados sobre portaobjetos con medio de montaje Prolong gold con DAPI (Invitrogen, USA) para visualizar el núcleo.

Western blot: Las células sembradas en placas de 6 o 10 cms de diámetro, en confluencia de un 80 a 90% y tratadas con las condiciones experimentales, fueron lisadas con tampón RIPA (NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; deoxicolato de sodio 0,5%; SDS 0,1%) y Tris 50 mM. En los casos que procedió el fraccionamiento subcelular, las

muestras fueron expuestas primero a un tampón con detergente (HEPES 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM, PMSF; DTT 1 mM; Triton X-100 1% e inhibidores de proteasas/fosfatasa Calbiochen 1X) sobre una cama de hielo por 10 minutos. Una vez recolectado el lisado, se procede a la centrifugación a 1500G por 3 minutos a 4 °C, el sobrenadante resultante contiene mayormente las proteínas citoplasmáticas y fue denominado “fracción cyt”. El precipitado remanente fue tratado con un tampón (HEPES 20 mM; NaCl 0,4 M; EDTA 1 mM; Glicerol 10%; DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM e inhibidores de proteasas/fosfatasa Calbiochen 1X) por 60 minutos en hielo y luego por otros 60 minutos a -70 °C. Transcurrido este periodo, las muestras se centrifugaron a 4 °C por 5 minutos a 1500 G y el sobrenadante correspondiente a la fracción nuclear se denominó “fracción nuc”. Las muestras obtenidas, ya sea en modalidad lisis total o para fraccionamiento celular, se resolvieron en geles de poliacrilamida al 6-10% por electroforesis.

La separación de las proteínas obtenidas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (10%), cargando para ello 20-30 µg de proteínas. Una vez terminada la separación de proteínas por electroforesis, se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) previamente activadas en metanol. Para evitar el marcaje inespecífico, las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 7 % o BSA 3% en TBS-Tween 0,05% (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 137 mM NaCl y más Tween 20 0,05%) durante 1 hora con agitación a 20 °C. Luego, fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C o bien a temperatura ambiente durante 2 horas, dependiendo del anticuerpo utilizado. Las membranas fueron lavadas tres veces con una solución TBS-Tween 0,05 % y luego, incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez completada esta etapa, las membranas fueron lavadas tres veces por 10 minutos con una solución TBS-Tween 0,05 % a temperatura ambiente en agitación constante. La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con un kit (Rapid Step™ ECL Reagent, Calbiochem).

Las señales registradas en la placa film fueron digitalizadas para posteriormente ser analizadas por densitometría. Los anticuerpos primarios utilizados para western

blot fueron: α -tubulina 1:1000 (α -tubulina Rabbit mAb, Cell signaling Technologies, USA) FoXO1 1:1000 (Cell signaling Technologies, USA), Histona-3 1:200 (D1H2 rabbit mAb #4499 Cell Signaling) y TXNIP 1:1000 (Anti-Txnip mAb, MBL International) en TBS-T 0,05% con un tiempo de incubación de 2 horas. El anticuerpo secundario usado fue anti-inmunoglobulina de ratón conjugada con peroxidasa (Pierce Biotechnology, 1:5000 en TBS- T 0,05%).

6.5. Infección con GFP-FoXO1 y Hyper

Adenovirus:

Para las infecciones, se generó un vector adenoviral usando el sistema AdEasy. Brevemente, cDNAs de cyto-HyPer (Evrogen, Moscú) y GFP-FoXO1 (Addgene plásmido #17551) fueron sub-clonados dentro del vector adenoviral comercial pAdEasy-RFP con técnicas convencionales, y la recombinación homóloga fue realizada en las células transformables, BJ5183. Los plásmidos adenovirales recombinantes fueron digeridos por la enzima PacI y transfectadas en células AdHek con lipofectamina (utilizando las pautas indicadas por el fabricante). Tras la observación de los efectos citopáticos (CPE), usualmente después de 14-21 días, las células fueron colectadas y se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación, seguido de centrifugaciones para eliminar los desechos celulares y el sobrenadante resultante (2ml) usado para infectar a una placa de 10 cm de células AdHek confluentes al 90%. Luego de la observación de los CPEs (2-3 días), las partículas virales fueron purificadas y expandidas para poder infectar a 10 placas de células AdHek. La producción de los adenovirus fue realizada por el Dr. Diego Varela de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Para la realización de los experimentos de *imaging* las células fueron infectadas con el virus GFP-FoXO1 a una dilución de 1:100 o con el virus HyPer con una dilución de 1:500 durante 48-72 horas, luego de lo cual fueron sometidas a las maniobras experimentales. El virus se mantuvo guardado a -80°C.

Imaging celular in vivo

Las células fueron sembradas sobre un cubreobjetos de vidrio de 25 mm y sometidas a infección con las partículas adenovirales. Transcurridas 48 a 72 horas post-infección, las células fueron transferidas a una cámara abierta en presencia del tampón KRH suplementado con 5 mM glucosa. El registro de imágenes fue realizado a través de un objetivo de 40X [apertura numérica, N.A. 1.3] montado en un microscopio Nikon Ti Eclipse (Japón) equipado con un monocromador (Cairn Research, UK), el cual permite la excitación con longitudes de onda discretas para el fluoróforo de interés (Anexo, Figura 3). En el caso de la fluorescencia proveniente de la proteína de GFP-FoXO1, la muestra fue excitada a 490 ± 10 nm y la luz emitida fue recolectada con un filtro LP530 nm (*LongPass*). El biosensor HyPer fue simultáneamente excitado a 420 nm y 490 ± 10 nm, mientras que la luz emitida se recolectó de la misma manera que para GFP-FoXO1. La adquisición de imágenes se llevó a cabo por una cámara CCD ORCA3 (Hamamatsu, Japan). Los experimentos de *imaging* se desarrollaron a temperatura ambiente (23-26°C).

6.6. PCR CUANTITATIVO (qPCR)

El ARN de células endoteliales fue aislado con trizol (Ambion, Carlsbad, CA). Luego se generó el ADN complementario a partir de 1 µg de ARN total, utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV y Oligo-dT como iniciador, según un protocolo estándar. La expresión del mensajero para TXNIP fue determinada por PCR cuantitativo en tiempo real usando un equipo Light Cycler® 96 de Roche. La corrida fue realizada con 100 ng de ADN complementario y una mezcla de reacción LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I de Roche, en un volumen final de 10 µL. Todas la corridas fueron hechas en duplicado e incluyendo un control negativo. La normalización de los datos fue expresada en función de la expresión del mensajero para la proteína β-actina. Los Partidores utilizados se detallan en la tabla n°1 (Anexo) y el cálculo de la expresión relativa de cada uno de los mensajeros estudiados, fue determinado por la ecuación (Anexo, Figura 4) descrita por Pfaffl, M. en 2001 (50), presentes en el anexo.

6.7. Análisis de imágenes

Las imágenes fueron analizadas con el software de libre acceso ImageJ. v.1.47c (NIH, USA). La cuantificación de los experimentos de inmuno-localización se llevó a cabo tomando alrededor de 10 campos por cada cubreobjeto, cada imagen estaba compuesta de dos fotografías relacionadas a los fluoróforos utilizados, alexafluor 488 para FoXO1 (Anexo Figura 5A) y DAPI como marcador de núcleo (Anexo Figura 5B). Las imágenes de cada canal fueron ajustadas en cuanto a brillo y contraste. Para la cuantificación subcelular de FoXO1, se procedió a sobreponer las imágenes de ambos canales con el fin de localizar de la región nuclear mediante el canal azul (DAPI), para luego cuantificar mediante el posicionamiento de las regiones de interés (ROIs) de FoXO1 en regiones nucleares directamente, y las citoplasmáticas en regiones que excluyeran al núcleo, (Anexo Figura 5C). El ruido de fondo fue obtenido posicionando un ROI en el espacio extracelular, el valor obtenido fue sustraído de la señal fluorescente en todos los casos, los datos se expresaron como la razón núcleo/citoplasma.

6.8. Análisis estadístico

Los análisis y los gráficos se realizaron con el programa Prism 5.01 (GraphPad Software Inc.) o Sigma Plot 11.0 (Systat software INC.). Los datos de las inmunocitoquímicas se obtuvieron al menos de 10 campos para cada experimento, el cual se realizó por triplicado, analizándose un total de 380-579 células de 3 a 5 experimentos independientes. Los datos agrupados se ajustaron satisfactoriamente a una curva gaussiana, lo que indica una distribución normal de los valores de la razón Nuc/Cyt de FoXO1 (Figura 7, véase en el Anexo).

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar. Según corresponda, la significancia estadística se evaluó mediante el test t-Student pareado si corresponde discriminar diferencias en diseños experimentales de “antes-después”, mientras que para comparar más de dos grupos se utilizó el test de ANOVA post hoc bonferroni. La significancia fue asignada con un $p < 0.05$.

5. Resultados

La detección de la proteína endógena FoXO1 en las células EOMA se llevó a cabo por inmunocitoquímica. Con el fin de asignar la presencia de FoXO1 en el compartimiento nuclear utilizamos la tinción DAPI (Figura 1B), que facilitó el posicionamiento de las regiones de interés (ROIs), de manera tal que, para cada célula analizada se cuenta con una señal citoplasmática y otra nuclear, (Figura 1B). Una vez establecido el método para detectar subcelularmente a FoXO1, las células EOMA fueron expuestas a la condición “postprandial *in vitro*” descrita en materiales y métodos. La reposición del suero en células EOMA, mantenidas en ausencia de suero por 16-20 horas, indujo una disminución en la razón núcleo/citoplasma de FoXO1 que fue de carácter transitoria, como se puede apreciar en los histogramas de frecuencia de distribución de los valores, los cuales se ajustaron a una curva de tipo gaussiana (Figura 1C), así como también, al expresar los valores como promedios (Figura 5D). Para corroborar la observación anterior, inmuno-detectamos la presencia de FoXO1 endógeno en fracciones nucleares y citoplasmáticas de células EOMA sometidas a la misma maniobra experimental descrita arriba. La integridad de la fracción nuclear se determinó con la presencia de Histona-3, una proteína de exclusiva residencia nuclear, en cambio, para los extractos citoplasmáticos se utilizó como marcador la α -tubulina, ambos marcadores son útiles también para controlar la carga del inmunoblot. Los datos presentados en la imagen (Figura 5E) confirman la temprana movilización de FoXO1 en el núcleo, ya que disminuye a partir de los 15 minutos después de la reposición de suero y también confirma la naturaleza transitoria de la respuesta de FoXO1 al postprandial *in vitro*, ya que a los 60 minutos de re-exposición a suero los niveles relativos de FoXO1 se estabilizan.

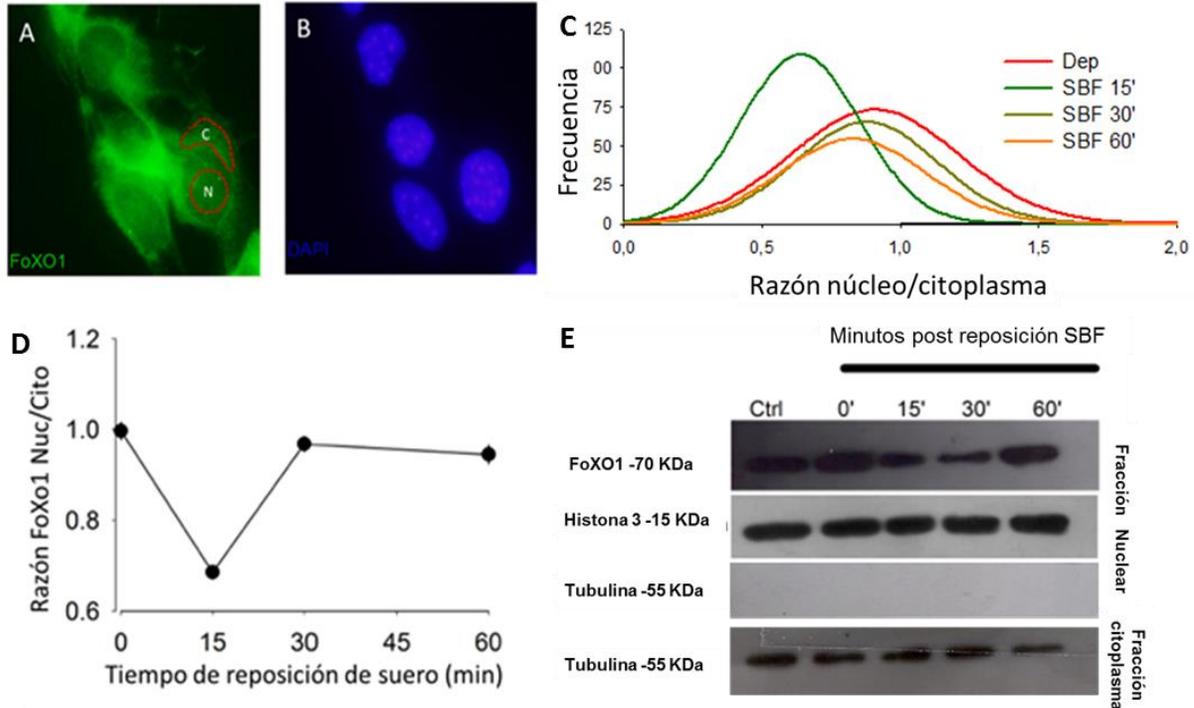


Figura 8. Inmunodetección y migración subcelular de FoXO1 endógeno en cultivo de células EOMA.

A y B corresponde a una fotografía que muestra células EOMA fijadas, FoXO1 fue teñido con un anticuerpo secundario conjugado con alexafluor 488 (verde) y el núcleo con DAPI (azul). La microfotografía fue obtenida con un aumento de 40X. Para la cuantificación de la intensidad de la región citoplasmática (C) y nuclear (N), las regiones de interés fueron dibujadas con líneas rojas en A como se ejemplifica. En C, FoXO1 endógeno fue inmunodetectado en células EOMA cultivadas en alta glucosa (25 mM) en diferentes condiciones: privado (Dep, línea roja) y re-exposición a suero por 15 (verde), 30 (verde oliva) y 60 (naranja) minutos. Los histogramas se construyeron con la razón de intensidades entre el núcleo y citoplasma de más de 500 células analizadas. Las curvas mostradas obedecen al ajuste de los datos a una función Gaussiana de primer orden. En D, se observa la migración subcelular de FoXO1 entre la región de núcleo y citoplasma en células privadas y re-expuestas a suero fetal bovino 10% a distintos tiempos. Los datos son expresados como promedio \pm ES de 380-579 células de 3 o 5 experimentos independientes. En E, se presenta un inmuno-blot de fraccionamiento subcelular de células EOMA privadas y re-expuestas a suero por los tiempos indicados y fueron reveladas por SDS-PAGE. Se presentan las fracciones nucleares para FoXO1, Histona 3 y α -tubulina conjunto a la fracción citoplasmática. Todas las fracciones nucleares mostraron intensa presencia de Histona 3 pero no se detectó α -tubulina; este experimento es representativo de otros tres.

A continuación se utilizó una tercera aproximación experimental para registrar el tránsito subcelular de FoXO1 inducido por la maniobra postprandial *in vitro*. Esta vez, la migración fue observada en células vivas mediante la infección con un adenovirus portador de la secuencia que codifica para la proteína de fusión GFP-FoXO1. Esta herramienta molecular permite mayor resolución temporal para estudiar la redistribución de FoXO1. Tal como se observa en la Figura 2, GFP-FoXO1 presenta una residencia mayor en el núcleo de células sujetas a ausencia de suero y que, frente a la re-exposición de SBF 10%, ocurre la redistribución de la señal nuclear hacia al citoplasma.

Los resultados obtenidos por la inmuno-detección endógena de FoXO1 y el seguimiento de GFP-FoXO1, indican que la redistribución subcelular de FoXO1 ocurre efectivamente en células endoteliales cuando son sometidas a un ejercicio postprandial *in vitro*. Esta redistribución es de carácter rápido, pues ocurre en una ventana temporal de minutos, y además es transitoria.

Para observar el impacto de la concentración de nutrientes sobre la localización y dinámica de FoXO1, las células fueron cultivadas en diferentes condiciones de oferta nutricional: glucosa 5 mM (baja glucosa), glucosa 25 mM (alta glucosa) y glucosa 25 mM + palmitato 1 mM (alta glucosa + palm 1 mM). Establecidas las condiciones experimentales, se determinó la distribución núcleo/citoplasma en condiciones basales de cultivo de las células endoteliales, observándose un aumento de carácter significativo de la razón núcleo/citoplasma en las condiciones de alta glucosa y alta glucosa más palmitato en comparación a la condición baja glucosa (Figura 3A). Posteriormente, al realizar la maniobra postprandial *in vitro*, pudimos observar que la redistribución subcelular de FoXO1 evocada por la reposición de suero fue de menor amplitud en células cultivadas en alta glucosa al comparárseles con la condición baja glucosa. Notable es el efecto del palmitato en el medio de cultivo, ya que evita totalmente la redistribución de FoXO1 observada (Figura 3 B).

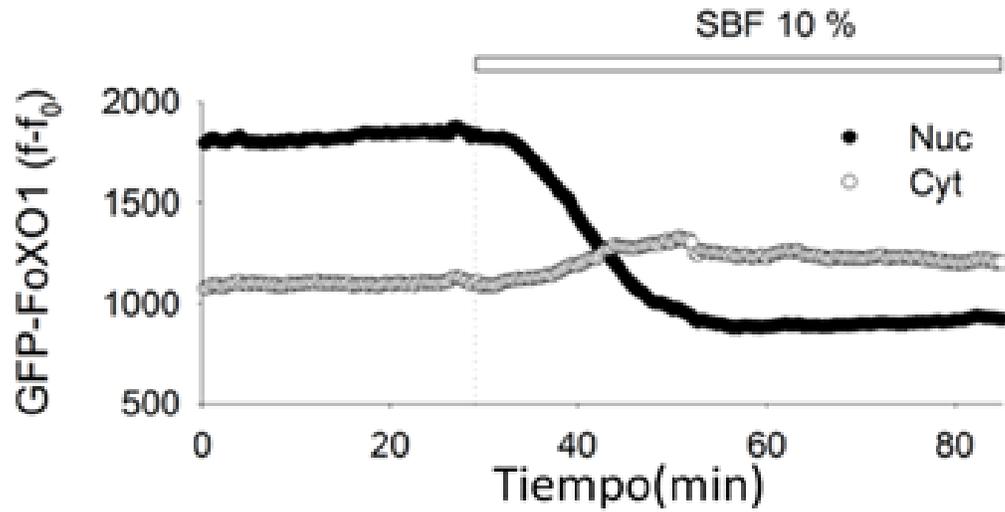


Figura 2. La extrusión nuclear de GFP-FoXO1 ocurre en células EOMA sometidas a la maniobra postprandial *in vitro*. Las células EOMA infectadas con "adenovirus GFP-FoXO1" fueron deprivadas de suero por 16-20 horas para luego, ser re-expuestas a 10% de suero fetal bovino, como indica la barra blanca y la línea punteada en el gráfico. La señal fluorescente proveniente del citoplasma (círculos blancos) y del núcleo (círculos negros) es presentada en función del tiempo. Nótese los cambios recíprocos observados en el citoplasma y núcleo desde la exposición al suero. Este hallazgo ha sido observado consistentemente en el laboratorio.

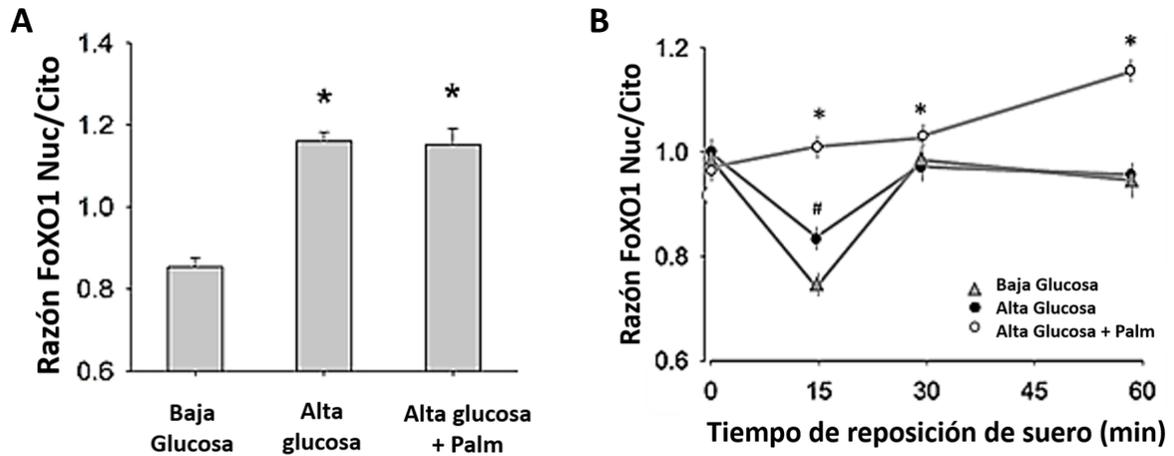


Figura 3. Glucosa y Palmitato fomentan una mayor residencia nuclear en las células EOMA y la presencia de Palmitato impide la extrusión nuclear evocada por el ejercicio “post-prandial”.

A. Las células EOMA fueron cultivadas en 5 mM (Baja Glucosa), 25 mM (Alta Glucosa) en presencia y ausencia de palmitato/BSA 1 mM (Alta Glucosa + Palm), para luego ser fijadas y evaluar las condiciones basales de la razón núcleo/citoplasma de FoXO1. Los datos corresponden al promedio \pm error estándar de 289 células cultivadas en baja glucosa; 579 en alta glucosa y 176 en alta glucosa + palm de al menos 3 experimentos independientes. **B.** Las células fueron sometidas a la maniobra post-prandial *in vitro*. FoXO1 endógeno fue detectado por inmunocitoquímica en los tiempos señalados en el gráfico. La línea con triángulos corresponde a los valores obtenidos en células EOMA mantenidas en baja glucosa, mientras que los círculos negros indican los resultados observados en alta glucosa y círculos blancos, alta glucosa más palmitato. Los datos corresponden al promedio \pm ES de 176-590 células analizadas de 3 experimentos independientes. Los asteriscos el símbolo numeral (#) corresponden a diferencias significativas entre los grupos obtenidos por one way Anova.

Una vez determinado los efectos del exceso de nutrientes sobre la estabilidad nuclear de FoXO1, el siguiente paso fue corroborar el impacto sobre el estado antioxidante celular, ya que como se ha descrito, FoXO1 es un modulador entre las señales metabólicas y el estado redox. Para demostrarlo, se evaluó la respuesta antioxidante de las células EOMA mediante el biosensor HyPer sometiendo a las células a dos pulsos de peróxido de hidrógeno.

En primera instancia se evaluó la señal fluorescente en condiciones basales para células endoteliales cultivadas en alta glucosa (25 mM) expuestas a BSA (Figura 4A) como una condición control, versus la condición de mayor impacto en la estabilidad nuclear de FoXO1, alta glucosa más palmitato 1 mM por 16-20 horas (Figura 4B). La cinética de la respuesta del biosensor ante el pulso de 50 μM se muestra en la Figura 4C. Se aprecian diferencias en la velocidad de ascenso de la señal HyPer frente al estímulo. Cuando se graficó la señal alcanzada a 50 y 500 μM de peróxido de hidrógeno, se encontraron diferencias de carácter significativas en los pulsos de baja concentración de peróxido de hidrógeno (Figura 4D) y no en la respuesta máxima (500 μM), indicativo que el rango dinámico no fue distinto en ambas condiciones y las diferencias obtenidas frente a H_2O_2 50 μM , obedecen más bien a diferencias en el entorno celular. Finalmente, se analizó la cinética de recuperación del biosensor en células EOMA sometidas a BSA y Palmitato, la velocidad inicial registrada en células tratadas con BSA fue de $7.2 \pm 0.7 \text{ min}^{-1}$ para, mientras que BSA/Palm alcanzó $4.4 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ (Figura 4E).

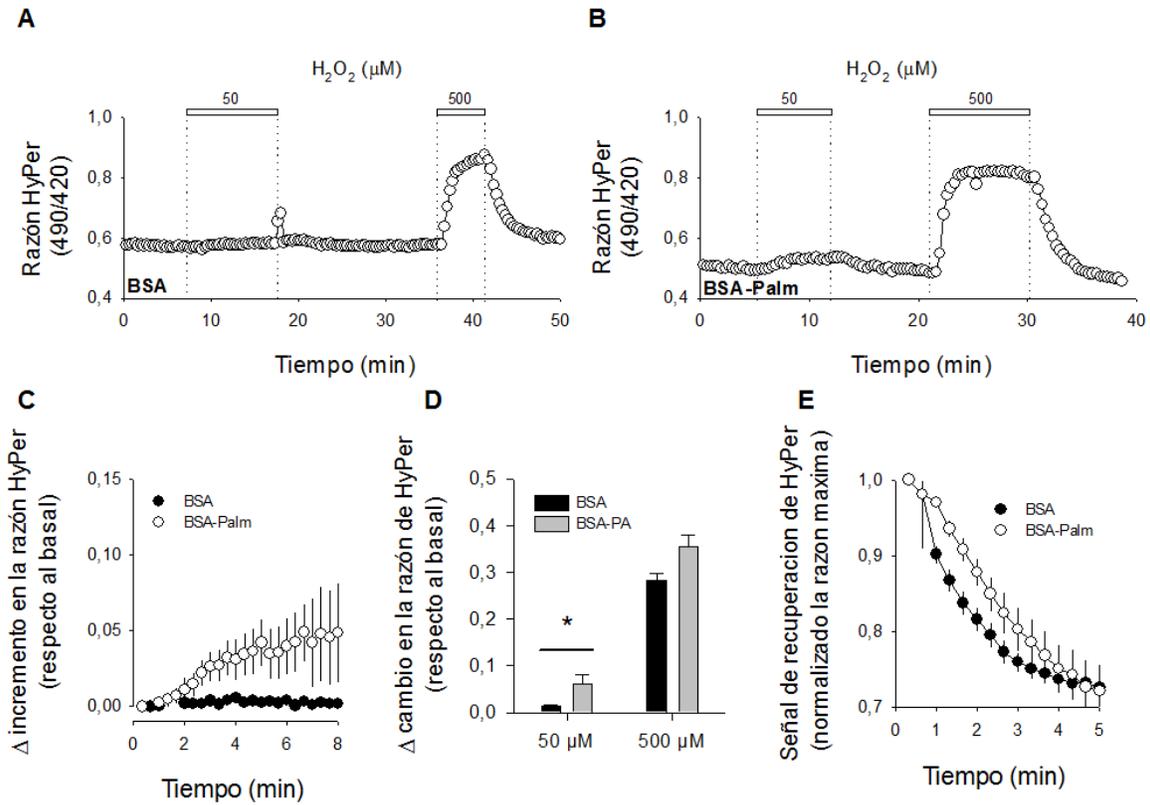


Figura 4. El tratamiento con palmitato/BSA provoca a una capacidad antioxidante disminuida del ambiente citosólico en células EOMA.

A, curso temporal de la señal HyPer en células EOMA tratadas con BSA por 20 horas, expuestas a dos pulsos consecutivos de H_2O_2 señalados por las barras blancas y las líneas punteadas. Los datos corresponden al promedio \pm ES de 6 células de un experimento representativo de otros tres. Para **B**, células EOMA tratadas con BSA-Palmitato 1 mM por 20 horas fueron sometidas al mismo diseño experimental, la aplicación de los pulsos de peróxido y su concentración, están indicados por las barras blancas y las líneas punteadas. Los datos corresponden al promedio \pm ES de 5 células de un experimento representativo de otros cuatro. En **C**, se compara el incremento de la señal durante la aplicación del primer pulso de peróxido de hidrógeno (50 μM) en relación a los valores basales, las células tratadas con palmitato están representadas con círculos blancos mientras que las células tratadas con BSA con círculos negros. Los datos corresponden al promedio \pm ES. En **D**, las respuestas máximas obtenidas a 50 y 500 μM H_2O_2 respecto a la señal basal obtenida de células tratadas con palmitato (barras grises) y BSA (barras negras). Los asteriscos indican diferencias significativas obtenidas por test t-student no pareado. En **E**, se presenta la fase de recuperación del biosensor una vez removido el H_2O_2 500 μM . Los puntos experimentales fueron ajustados a una función exponencial de tres parámetros, la velocidad inicial estimada para la recuperación en células tratadas con BSA fue de 7.2 ± 0.7 min^{-1} , mientras que la velocidad estimada para las tratadas con BSA/Palm alcanzó 4.4 ± 0.3 min^{-1} . Los datos presentados en las figuras C, D y E corresponden al promedio \pm ES de 14 de 15 células de 3-5 experimentos independientes.

Para explicar el impacto redox que presentan las células EOMA ante el exceso de nutrientes y su relación con la alta estadía nuclear de FoXO1, se decidió estudiar a una proteína blanco de este factor de transcripción: la TXNIP. Esta proteína ha sido descrita en la regulación del estado redox al disminuir la actividad de las proteínas TRX, que poseen un rol antioxidante celular.

Por lo anterior, fue de interés ver el impacto que presentaba la mayor presencia nuclear de FoXO1 en las condiciones de alta concentración de nutrientes, analizando si esto se traducía en aumento de la expresión de TXNIP en células EOMA. Para ello se cultivaron células EOMA en baja (5 mM) y alta glucosa (25 mM), para luego, realizar una curva temporal de exposición de palmitato de 0, 2, 4, 8 y 16 horas. Los niveles del ARNm para TXNIP fueron determinados mediante la técnica de qPCR (Figura 5A). A modo de control de los grupos palmitato, a un grupo de células se les realizó la misma línea temporal pero sólo con BSA 1mM, los datos se entregan como veces de cambio de ARNm de TXNIP en relación al grupo control. Los resultados muestran que el palmitato aumenta los niveles de ARNm tanto en condiciones de alta como baja glucosa hasta las 6 horas, para luego decaer a las 8 y 16 horas. Por otra parte, es evidente que el aumento del ARNm para TXNIP fue mayor en condiciones basales en alta glucosa versus baja glucosa.

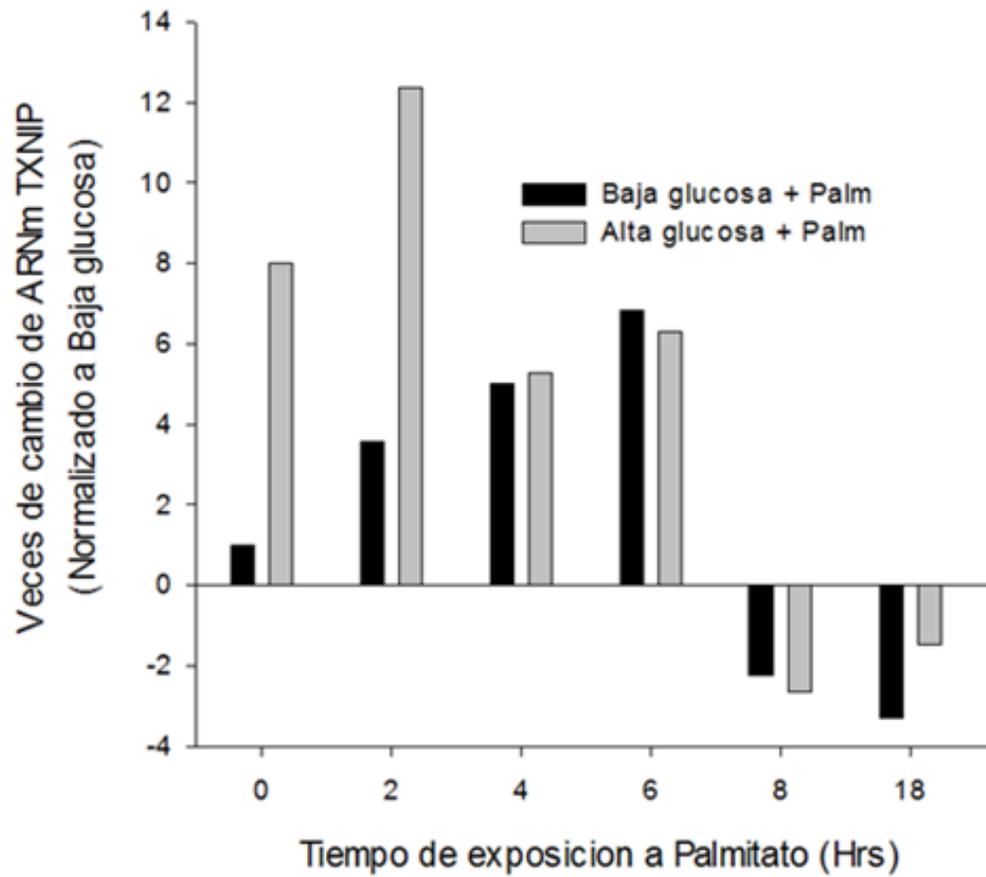


Figura 5. TXNIP modificaría su expresión en células endoteliales ante palmitato.

Muestra las veces de cambios para el mensajero de ARN de TXNIP en células EOMA expuestas a condiciones de baja glucosa (5 mM) y alta glucosa (25 mM) para luego ser expuestas a diferentes tiempos a palmitato 1 mM (palm) mediante un qPCR. Las barras negras representan la condición de Baja Glucosa + Palm, mientras que las barras grises corresponden a la condición alta glucosa + Palm. Las veces de cambios fueron expresadas en relación a la condición control que fueron células cultivadas en baja glucosa.

Discusión

Dinámica de FoXO1 y su impacto en las células endoteliales

FoXO1 es un factor de transcripción regulado por señales metabólicas. La exposición a una alta concentración de glucosa (25 mM) junto con palmitato (1 mM) aumentan la presencia nuclear de FoXO1 en condiciones basales de cultivo, y alteran la dinámica de migración subcelular desde el núcleo evocada por la maniobra postprandial *in vitro*, indicando que la exposición a palmitato desregula de forma permanente los mecanismos encargados de inactivar FoXO1 sacándolo del núcleo, permitiendo así una estadía elevada y constante de FoXO1 nuclear.

La bibliografía relata que FoXO1 presenta mecanismos regulatorios altamente sensibles a los cambios de señales de estadios metabólicos, como lo son el ayuno y el postprandial (51). La desregulación en la capacidad migratoria de FoXO1 está en línea con el estrés oxidativo provocado por el exceso de nutrientes, puesto que estos cuando son elevados de forma crónica como ocurre en condiciones fisiopatológicas, se genera toxicidad metabólica celular por glucosa o lípidos que promueven la formación de especies reactivas de oxígeno, produciéndose un desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes (52).

Uno de los principales mecanismos que puede inducir el aumento en la de especies reactivas del oxígeno es la producción mitocondrial producto del desacoplamiento cadena transportadora de electrones, en los complejos I, II y III (53-54). Incrementando la producción del anión superóxido. Por otra parte, el exceso de nutrientes y la producción de las especies reactivas de oxígeno producidas a nivel mitocondrial se ven potenciadas por la actividad en las células endoteliales de enzimas como las NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa, xantina oxidoreductasa, lipooxigenasas/ciclooxigenasas (55-56).

Dentro del mecanismo más ampliamente descrito como de modulador de la actividad transcripcional de FoXO1, se encuentra el evocado por insulina y su *signaling* vía PI3K/AKT, este promueve la fosforilación de FoXO1 y su posterior ubiquitinización, destinándolo para degradación proteosomal (57). El ambiente pro-oxidante promovido por el exceso de podría perturbar la vía de señalización del receptor de insulina (58) y

eventualmente impedir que este mecanismo regule apropiadamente la actividad de FoXO1 (59).

XBP1: otro mecanismo de modulación de FoXO1

Por otra parte, la migración subcelular de FoXO1 puede ser controlada mediante la activación de XBP1, un factor de transcripción activado durante estrés reticular (Anexo, Figura 7A), esto mecanismo depende de la activación de la IREIII α , la cual posee actividad endonucleasa y está encargada del *splicing* de XBP1 de 29 KDa a su versión 55 KDa. En su versión procesada, XBP1 interactúa con FoXO1 y promueve su degradación (42).

De forma complementaria en el laboratorio, se inmunodetectó la activación de XBP1 (Anexo, Figura 7B) observando que el maniobra postprandial *in vitro* regulaba su splicing y la cual no se presentaba cuando se utilizó el SB203580 (inhibidor de p38 MAPK) (Anexo Figura 7C), por lo que la estrategia de inhibir a XBP1 o su translocación nuclear generaban un impacto sobre la redistribución de FoXO1 nuclear que no se revertía ante la maniobra postprandial *in vitro* en células endoteliales.

Estos resultados obtenidos por el equipo de trabajo del laboratorio muestran que la maniobra experimental de la deprivación *in vitro* no es sólo modulado por fosforilación vía de AKT, sino también por XBP1. Esto indica que FoXO1 puede migrar del núcleo para ir a degradación proteosómica por diversas vías, que son complementarias permitiendo la integración de señales nutricionales.

Impacto en la capacidad antioxidante

El exceso de nutrientes promueve una disminución de la capacidad antioxidante endotelial asignado a diversos actores tales como FoXO1, TXNIP y TRX que modulan estado redox y cuyo efecto es el promover un estado oxidante y reducir tono reductor celular (60-63). Esto se corrobora con los resultados obtenidos de células cultivadas en presencia de alta glucosa y palmitato, que presentaron una respuesta elevada al ser expuestas a peróxido de hidrógeno, lo cual indicaría que un exceso de nutrientes genera una disminución de la capacidad antioxidante celular.

Si bien se demostró un aumento en el estadio nuclear de FoXO1, lo cual aumentaría la actividad transcripcional, aun no podemos afirmar que la presencia sostenida de FoXO1 en el núcleo se traduce en un aumento de TXNIP, uno de los blancos moleculares propuestos. Sin embargo, resultados preliminares indican que la exposición a palmitato evoca un aumento en los niveles de mensajero para TXNIP. La detección de la proteína está aún en desarrollo, ya que hemos tenido dificultades técnicas que impiden interpretar los datos apropiadamente.

La literatura en relación a TXNIP y su regulación mediada por FoXO1 en endotelio es escasa y no se ha encontrado evidencia actualmente a nivel de microvasculatura. Sin embargo, un estudio en células endoteliales de aorta señala que altos niveles de glucosa (25 mM) promueven la expresión de FoXO1 y TXNIP. La disminución de la expresión de FoXO1 mediante ARN interferentes impidió el aumento de TXNIP aun cuando las condiciones de alta glucosa estaban presentes, lo que sugiere que FoXO1 estaría mediando la expresión de TXNIP (47). Las consecuencias por un incremento de los niveles de TXNIP fueron abordados en un estudio realizado en células endoteliales aórticas de ratón, donde se relacionó niveles elevados de TXNIP con un incremento en especies reactivas del oxígeno (ROS). Este efecto fue abolido al interferir en la expresión de la proteína FoXO1 (64). De esta forma ambos estudios demuestran la relación directa entre exceso de nutrientes, modulación TXNIP/FoXO1 y estado redox disminuido, si bien esto fue realizado en endotelio de macrovasculatura, futuros estudios podrían reafirmar que dichos mecanismos también ocurren en modelos de microvasculatura.

La literatura relata que existe una interacción entre TXNIP con proteínas antioxidantes como las TRX disminuyendo su actividad (65). Las TRX son agentes que reducen los niveles de H₂O₂ generando un tono reductor citoplasmático alto en células endoteliales, por lo cual la elevación de los niveles de TXNIP generan como consecuencia un pro oxidante elevado, aumento en los niveles de ROS (66-67) y finalmente una alteración en la función del endotelio vascular, lo cual se ha corroborado en estudios realizados en microvasculatura de retina en donde el exceso de nutrientes inducen una remodelación epigenética de la cromatina, inflamación mediado por la NFκB y al desarrollo de patologías vasculares (68). Por lo tanto la

disminución en la capacidad antioxidante pareciera ser un indicador para el inicio para el desarrollo de la disfunción endotelial y en consecuencias de las co-morbilidades asociadas.

Proyección y limitaciones del modelo

Los resultados fueron obtenidos mediante un modelo celular *in vitro*, por lo cual sería de interés poder proyectar estudios en los cuales se pudiese analizar la respuesta de FoXO1, TXNIP e su impacto en el estado redox, por ejemplo mediante técnicas de *imaging in vivo* en un modelo animal. Esto, con el fin de determinar los reales impactos de ser expuestos a condiciones crónicas de exceso de nutrientes en un organismo que presentan múltiples mecanismos que interactúan para mantener la homeostasis sistémica

La disfunción endotelial se presenta como uno de los eventos tempranos en el desarrollo de las comorbilidades cardio-metabólicas tales como: resistencia a la insulina, diabetes, aterosclerosis, hipertensión arterial y accidentes vasculares por nombrar a algunos. Por ello la evaluación de la función endotelial es primordial para anticiparse en años o incluso décadas, evitando o permitiendo la intervención terapéutica temprana de estas patologías. Técnicas poco invasivas y de bajo costo como la pletismografía de cambios de presión en los dedos, ofrece la ventaja de evaluar la función endotelial de la microvasculatura. Este tipo de herramientas, hoy en día se presentan como una solución para determinar la salud endotelial de carácter no invasiva, validadas y con carácter diagnóstico estandarizado (69).

Por lo que el plantear un modelo en el cual se evalué la función endotelial en una población humana de manera diagnóstica y luego, se intervenga a través de la acción de fármacos específicos que generen un impacto sobre FoXO1, TXNIP o XBP1, sería una forma determinar finalmente de forma funcional la modulación que presentan estos factores del estado redox.

9. Conclusiones

La regulación de FoxO1 en endotelio microvascular es dependiente de la maniobra postprandial in vitro

La localización nuclear basal de FoxO1 aumenta en presencia de alta glucosa y palmitato.

El Palmitato, y no el exceso de glucosa, impide la extrusión nuclear de FoxO1 en células endoteliales (ECs) por la maniobra postprandial in vitro.

El aumento de la residencia nuclear de FoxO1 por la mayor oferta de nutrientes, sobre todo palmitato disminuye la capacidad antioxidante de las ECs.

10. Bibliografía

1. Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva n° 311, mayo 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> visitado el 27 julio.
2. Yanagisawa M, Kurihara H. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1998; Vol 332
3. Rejagopalan S, Laursen J. Role of endothelin-1 in angiotensin II- mediated hypertension. *Hypertension* 1997; 30:29-34
4. Brandes R, Schmitz-Winnenthal F, Féletou M, Gödecke A, Huang P, Vanhoutte P, Fleming I et al. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice *PNAS* August 15, 2000 vol. 97 no. 17 9747-9752.
5. Opal, Steven M.; Esmon, Charles T. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care*, 2002, vol. 7, no 1, p. 236
Levi M, de Jonge E, van der Poll T, ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.* 1999 Aug;82(2):695-705..
7. Esmon, C. The interactions between inflammation and coagulation. *British Journal of Haematology*, 2005; 131, 417–430
8. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288/5789: 373-376
9. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3/3: 214-220.
10. Herrera M, Garvin JL. Novel role of AQP-1 in NO-dependent vasorelaxation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 May;292(5):F1443-51.
11. Munzel T, Feil R, Mulsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* 2003; 108/18: 2172-2183.
12. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 2000; 101/4: 439-445.
13. Kawano, T., Zoga, V., Kimura, M., Liang, M. Y., Wu, H. E., Gemes, G., ... & Sarantopoulos, C. D. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. *Mol Pain*, 2009, vol. 5, no 12, p. 12.

14. Schafer A, Wiesmann F, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide. *Circulation* 2004; 109/15: 1819-1822.
15. Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; 78/2: 225-230.
16. Aicher A, Heeschen C: Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003; 9:1370–1376.
17. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 1992; 5/6: 834-842.
18. Werner ER, Gorren AC, Heller R, Werner-Felmayer G, Mayer B. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228/11: 1291-1302.
19. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005; 79/1-2: 157-165.
20. Guo W, Wong S, Xie W, Lei T, Luo Z. Palmitate modulates intracellular signaling, induce endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Aug;293(2):E576-86.
21. Waki, H; Tontonoz, P: Endocrine Functions of adipose tissue. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2007. 2:31–56
22. Ron, D; Walter, P: Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):519-29.
23. Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, Abe R, Shimizu T, Yoshimura A, Imaizumi T. Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF- α -induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Aug;37(2):497-506..
24. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000 Nov;49(11):1939-45.
25. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002 Apr 9;105(14):1656-62.

26. Munzel T, Feil R, Mulsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U: Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 5-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Circulation* 2003; 108: 2172–2183.
27. Begum N, Sandu OA, Ito M, Lohmann SM, Smolenski A: Active Rho kinase (ROK-alpha) associates with insulin receptor substrate- 1 and inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002;277: 6214–6222.
28. Kim F, Gallis B, Corson MA: TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C1057– C1065.
29. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R: Metabolic syndrome. A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005; 111: 1448–1454.
30. Hsueh WA, Quinones MJ: Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol* 2003; 92(suppl):10J–17J.
31. Levine A, Punihale D, Levine T. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. *Cardiology* 2012; 122:55–68
32. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993; 366/6454: 461-464.
33. Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004; 117/4: 421-426.
34. Hedrick SM. The cunning little vixen: Foxo and the cycle of life and death. *Nat Immunol* 2009; 10/10: 1057-1063.
35. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1alpha interaction. *Nature* 2003, 423, 550-555.
36. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation". *Dev. Cell* 4 (1): 119–29.
37. Rached MT, Kode A, Xu L, Yoshikawa Y, Paik JH, Depinho RA et al. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell Metab* 2010; 11/2: 147-160.
38. Sengupta A, Molkenin JD, Paik JH, Depinho RA, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 2011; 286/9: 7468-7478.

39. Ueki K, Kadowaki T. The other sweet face of XBP-1. *Nat Med.* 2011 Mar;17(3):246-8
40. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med.* 2012 Jan;18(1):59-68
41. Greer E, Brunet A. Foxo transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression *Oncogene* 2005; 24, 7410–7425.
42. Zhou Y, Lee J, Reno CM, Sun C, Park SW, Chung J et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1–FoxO1 interaction. *Nature Medicine* 2011, 17, 356–365
43. Potente M, Urbich C, Sasaki K, Hofmann WK, Heeschen C, Aicher A et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 2005 Sep;115(9):2382-92
44. De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 1998; 82/10: 1094-1101.
45. Takeshita S, Inoue N, Ueyama T, Kawashima S, Yokoyama M. Shear stress enhances glutathione peroxidase expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273/1: 66-71.
46. Yamawaki H, Pan S, Lee RT, Berk BC. Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells. *J Clin Invest* 2005; 115/3: 733-738.
47. Li X, Rong Y, Zhang M, Wang XL, LeMaire SA, Coselli JS et al. Up-regulation of thioredoxin interacting protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 contributes to the impaired thioredoxin activity and increased ROS in glucose-treated endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381/4: 660-665.
48. Arginine Methylation of FOXO Transcription Factors Inhibits Their Phosphorylation by Akt. *Molecular Cell.* Vol. 32, issue 2, 24 October 2008, Pages 221-231.
49. Li X, Rong Y. Up-regulation of thioredoxin interacting protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 contributes to the impaired thioredoxin activity and increased ROS in glucose-treated endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381 (2009) 660–665
50. Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research.* 2001;29(9):e45

51. InSug, O., Zhang, W., Wasserman, D. H., Liew, C. W., Liu, J., Paik, J. & Unterman, T. G. (2015). FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. *Nature communications*, 6.
52. Cao, S. S., & Kaufman, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants & redox signaling*, 2014, vol. 21, no 3, p. 396-413
53. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA et al (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 278: 8516-25.
54. Albayrak T, Scherhammer V, Schoenfeld N, Braziulis E, Mund T, Bauer MK et al (2003). The tumor suppressor cybL, a component of the respiratory chain, mediates apoptosis induction. *Mol Biol Cell* 14: 3082-96.
55. Singh U, Jialal I (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 13: 129-42.
56. Szocs K (2004). Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys* 23: 265-95.
57. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., & Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11285-11290
58. Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567-575
59. Kluth, O., Mirhashemi, F., Scherneck, S., Kaiser, D., Kluge, R., Neschen, S. & Schürmann, A. Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity

associated diabetes: role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure. *Diabetologia*, 2011, vol. 54, no 3, p. 605-616).

60. Chen, Y. H., Lin, S. J., Lin, F. Y., Wu, T. C., Tsao, C. R., Huang, P. H. & Chen, J. W. (2007). High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide–related but not oxidative stress–mediated mechanisms. *Diabetes*, 56(6), 1559-1568.

61. Samarin J, Cicha I, Goppelt-Struebe M. Cell type-specific regulation of CCN2 protein expression by PI3K-AKT-FoxO signaling. *J Cell Commun Signal* 2009; 3/1: 79-84.

62. Mowbray AL, Kang DH, Rhee SG, Kang SW, Jo H. Laminar shear stress up-regulates peroxiredoxins (PRX) in endothelial cells: PRX 1 as a mechanosensitive antioxidant. *J Biol Chem* 2008; 283/3: 1622-1627.

63. Kobayashi-Miura M, Nakamura H, Yodoi J, Shiota K. Thioredoxin, an anti-oxidant protein, protects mouse embryos from oxidative stress-induced developmental anomalies. *Free Radic Res*. 2002 Sep; 36(9):949-56

64. Li, X., Kover, K. L., Heruth, D. P., Watkins, D. J., Moore, W. V., Jackson, K. & Yan, Y. (2015). New insight into Metformin action: regulation of ChREBP and FoXO1 activities in endothelial cells. *Molecular Endocrinology*, 29(8), 1184-1194.

65. Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT. 2004. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* 279:30369–30374

66. Yamawaki H, Pan S, Lee RT, Berk BC. Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells. *J Clin Invest* 2005; 115/3: 733-738

67. Inogushi T, Li P. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* November 2000 vol. 49 no. 11 1939-1945

68. Perrone, L. Devi, T et al. Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) Induces Inflammation Through Chromatin Modification in Retinal Capillary Endothelial Cells Under Diabetic Conditions. *J. Cell. Physiol.* 221: 262–272, 2009)

69. Kuvin, J. T., Patel, A. R., Sliney, K. A., Pandian, N. G., Sheffy, J., Schnall, R. P. & Udelson, J. E. (2003). Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *American heart journal*, 146(1), 168-174

11. Anexos

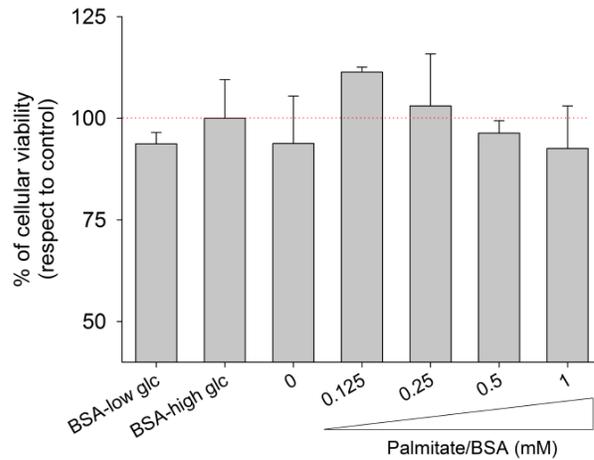
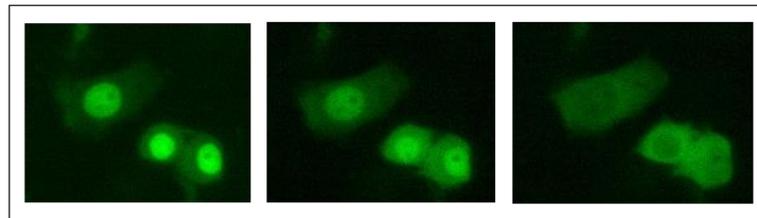


Figura 1. Dependencia de las dosis de los efectos de Palmitato/BSA en viabilidad de células EOMA. La viabilidad de las células EOMA expuestas a dosis incrementales de palmitato/BSA fue determinada por ensayo MTT. Para la condición BSA, ya sea a baja o alta glucosa (glc), fue usada la máxima concentración de BSA alcanzada con palmitato/BSA 1 mM. 100% de viabilidad fue referida a células EOMA cultivadas a alta glucosa con la dosis más alta de BSA. Los datos corresponden a promedio \pm DS del triplicado para cada condición y este experimento es representativo de 3 observaciones independientes.

A



B

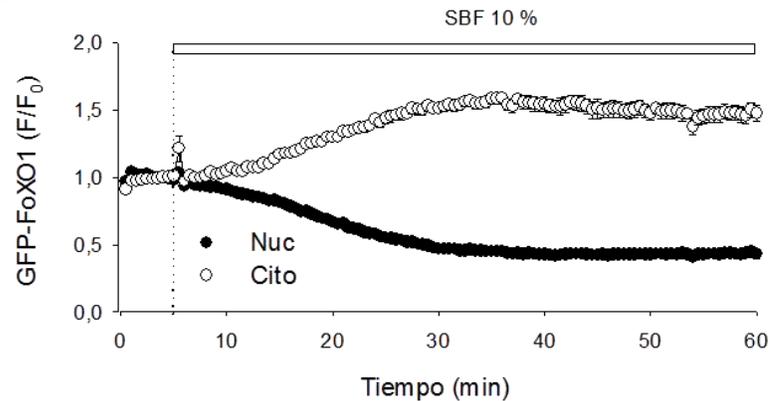


Figura 2. Dinámica de la distribución subcelular de GFP-FoxO1 en células HepG2 inducida por la maniobra postprandial *in vitro*.

Las células HepG2 fueron transfectadas con GFP-FoxO1, después de 16-20 horas de privación de suero (SBF 10%) la presencia nuclear de FoxO1 fue visualizado. Nótese que la intensidad de la señal nuclear (círculos negros) y citoplasmática ha sido normalizada (círculos blancos). Al momento de agregar suero al cultivo celular, las señales presentan un comportamiento recíproco.

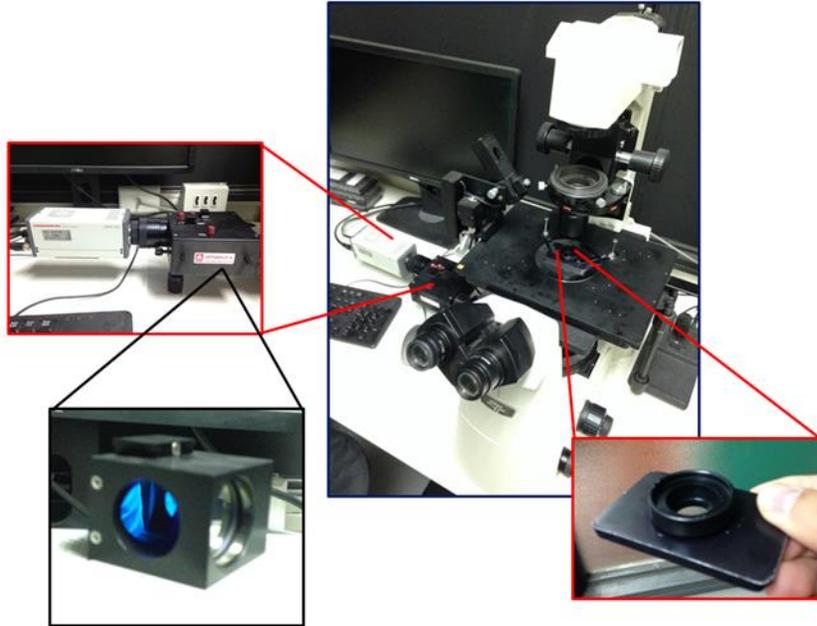


Figura 3. Equipo para el registro de imágenes para *imaging* celular *in vivo*.
 Microscopio Nikon Ti Eclipse (Japón) equipado con un monocromador (Cairn Research, UK), equipado con objetivo 40X [apertura numérica, N.A. 1.3] , un filtro un filtro LP530 nm (longPass) y una cámara CCD (ORCA3, Hamamatsu, Japan)..

$$R = \frac{E_{gen\ blanco}^{\Delta Ct_{gen\ blanco} (Control-tratado)}}{E_{gen\ ref}^{\Delta Ct_{gen\ ref} (Control-tratado)}}$$

Figura 4. Ecuación de cálculo de la expresión relativa de cada uno de los mensajeros
 Ecuación descrita por Pfaffi (2011) para el cálculo de los ARNm en el qPCR.

Tabla n°1	Secuencia del partidor	Tm	Tamaño
TXNIP a	5'- CAGCCTACAGCAGGTGAGAA -3'	60°C	78 pb
TXNIP b	5'- AAGCTCGAAGCCGAACTTGT -3'		
b-actina a	5' -CCGTAAAGACCTCTACTGCA -3'	66°C	214 pb
b-actina b	5'- AAGAAAGGGTGTAAAACGCA-3'		

Tabla n°1 Secuencia de los partidores utilizados para la realización de PCR cuantitativo

Se describen la secuencia de los partidores, la Tm y su tamaño utilizados para la realización del q-PCR de la proteínas TXNIP y β -actina

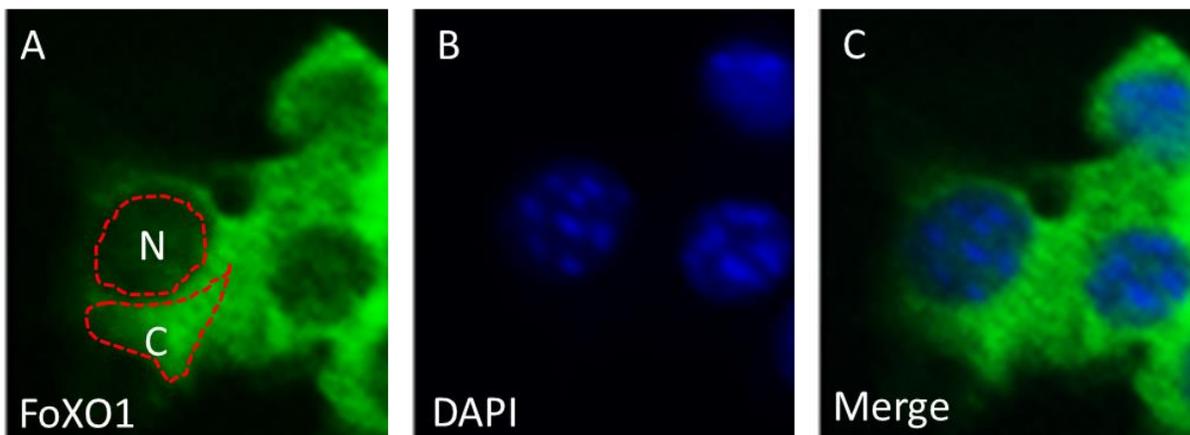


Figura 5. Inmunodetección subcelular de FoXO1 endógeno

A y B corresponde a la típica fijación de células EOMA en donde FoXO1 fue teñido con un anticuerpo secundario conjugado con alexafluor 488 (verde) y el núcleo con DAPI (azul) respectivamente, y C corresponde a la superposición (Merge) de ambos canales. La microfotografía fue obtenida con un aumento de 40X. Para la cuantificación de la intensidad de la región citoplasmática (C) y nuclear (N), las regiones de interés fueron dibujadas con líneas rojas en A como se ejemplifica.

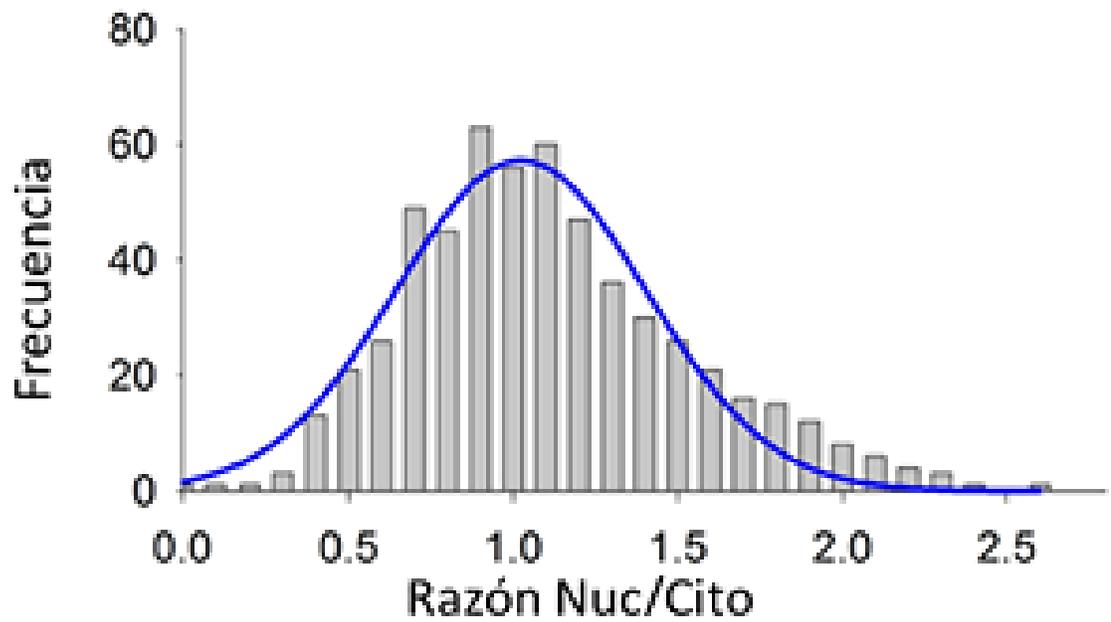


Figura 6. Histograma de frecuencia de distribución núcleo/citoplasma por inmunofluorescencia de FoxO1.

La distribución de frecuencia de los valores obtenidos de la razón núcleo/citoplasma (Nuc/Cito) cuantificados en células EOMA cultivadas en alta glucosa. El gráfico fue construido con la categorización de valores provenientes de 565 células; los datos fueron ajustados a una función gaussiana con una mediana de valor de 1.02 ± 0.02

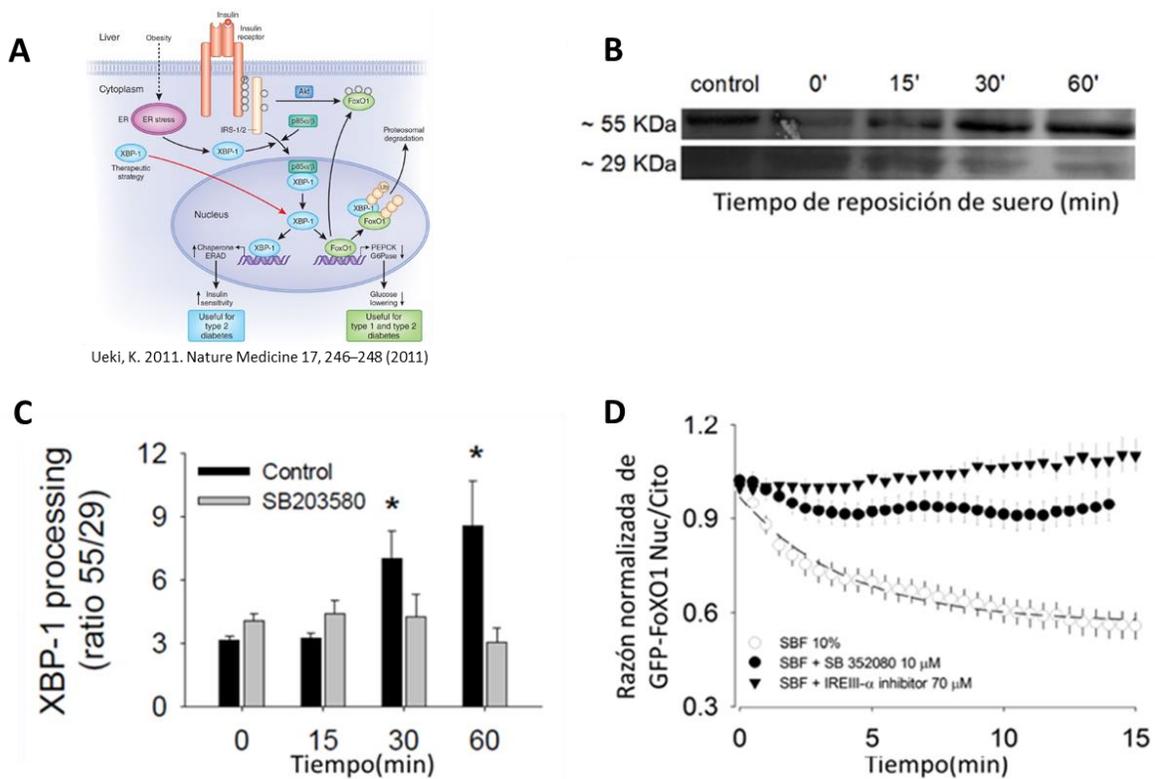


Figura 7. Papel de la activación de XBP-1 en la extrusión nuclear de FoXO1 es inducida por suero en células EOMA.
 A Esquema de la interacción entre XBP-1 y FoXO1 como mecanismo regulador de la gluconeogénesis en células hepáticas
 B Inmuno-detección del procesamiento por splicing de XBP-1 en el lisado total de células EOMA sometidas a la maniobra postrandial in vitro a distintos tiempos. XBP-1 procesado migra a ~55 KDa mientras que la proteína XBP-1 no procesada lo hace a ~29 KDa. C, Resumen los resultados obtenidos de 4 experimentos mostrados en B, los datos corresponden al promedio \pm ES de los valores obtenidos para la la razón de XBP-1 procesado/no procesado. Los asteriscos corresponden a diferencias significativas en contraste al grupo control (0 minutos). En las barras grises se observa el efecto de SB203580 100 μ M (inhibidor de p38 MAPK). D, corresponde al curso temporal de la redistribución de la proteína GFP-FoXO1 evocada por la maniobra postprandial en células EOMA, los promedios \pm ES de la razón núcleo/citoplasma GFP-FoXO1 obtenido para la condición control (círculos blancos), y en presencia de SB203580 (círculos negros) o inhibidor de IREIII (triángulos negros) pre-incubados por una hora. La línea punteada que une los círculos blancos corresponde a una exponencial simple de tres parámetros. Los datos fueron recopilados de al menos tres experimentos independientes donde los valores fueron normalizados a condición de tiempo 0 ($8 < \text{número de células} > 15$).