

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO
REGULADOR DEL SISTEMA DE PROTECCIÓN
FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO
MITOCONDRIAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Yolanda Olmos Buchelt

Bajo la dirección de la doctora

María Monsalve Pérez

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-5993-8

© Yolanda Olmos Buchelt, 2010

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Biología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**Caracterización del complejo regulador
del sistema de protección
frente a estrés oxidativo mitocondrial**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Yolanda Olmos Buchelt
para optar al grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid

Directora de Tesis:
Dra. María Monsalve Pérez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
Instituto de Salud Carlos III



Dra. María Monsalve Pérez
Departamento de Cardiología Regenerativa
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
Madrid
Teléfono: 914531294
mmonsalve@cnic.es

Dña. María Monsalve Pérez, investigadora Junior del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares,

Certifica

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado:

Caracterización del complejo regulador del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial

del que es autora Yolanda Olmos Buchelt, ha sido realizado bajo mi dirección en el laboratorio de Regulación Transcripcional de los Sistemas de Protección Frente al Estrés Oxidativo del Departamento de Cardiología Regenerativa perteneciente al Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Este trabajo reúne la calidad científica necesaria para ser presentado por la interesada con el fin de optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Por ello, informo favorablemente para que pueda proceder a su defensa.

En Madrid, a 2 de Febrero de 2010

Firmado:

María Monsalve Pérez

AGRADECIMIENTOS

Sé que estas páginas serán las más leídas de esta Tesis, quizás las más leídas que yo escriba nunca, así que espero poder expresar en unas pocas líneas todo mi agradecimiento a las personas que durante estos años me han apoyado y que han hecho posible este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecerle a mi directora de tesis, la Dra. María Monsalve, el haberme permitido formar parte de su grupo de investigación durante estos años. Gracias María por haberme enseñado tantas cosas desde el primer día que entré en el laboratorio y porque siempre intentas buscar un hueco en tu agenda para resolver mis dudas y ayudarme con mi trabajo.

Aunque coincidiésemos poco tiempo, gracias también al Dr. Santiago Lamas por haberme acogido en su grupo durante mi primer año en el CNIC. Gracias a todos los que fuimos "Lamas" durante aquel tiempo, Mariano por tus historias científicas y no científicas, Estrella por estar siempre dispuesta a echar una mano y tener tanta paciencia con todos nosotros, Mari Ángeles, por ayudarme tanto a dar mis primeros pasos en el laboratorio. Por supuesto gracias a Ceci, Conchi, Crispu, Cris, Sara e Inma, que fue la que empezó con el trabajo de FoxO. Gracias especiales a Tania por nuestras conversaciones de becarita a becarita y siempre afrontar los problemas con una sonrisa. Cómo no, gracias Tarín, superviviente todavía conmigo de aquella época, por ser como eres, por tu alegría y tus bailes memorables, por poner la música a todo volumen le pese a quien le pese, por ofrecer siempre un café cuando ves que hace falta. A todos vosotros mil gracias por los buenos momentos pasados tanto dentro como fuera del laboratorio, en bodas, fiestas y demás. Porque es difícil que vuelva a coincidir en el tiempo un grupo tan grande de gente tan maravillosa y tan buenos científicos.

Gracias a los que siempre han sido nuestros vecinos de laboratorio y que han seguido junto a nosotros a pesar de tantos cambios y mudanzas. Gracias a Gemma, Paqui, Gabi, Vane, Mónica y Bego. Gracias Alfonso y Sonso por ser nuestros jefes favoritos, Raquel por tu forma de ser, Patricia por tu compañía y conversación en estos meses de biblioteca, Óscar por ser tan buena gente y ofrecerme siempre tu ayuda para lo que sea. Gracias a todos porque, aunque andemos ahora dispersos por todo el CNIC, nos seguimos juntando para cafés, comidas, cañas de los viernes..., y porque trabajar junto a vosotros siempre ha sido y será un gustazo. Gracias también a Enara por ser un ejemplo de tesón y trabajo y hacerme compañía cuando se hacía de noche en el labo y no tenías ni cinco minutos para... Y gracias a Dani porque, aunque a veces nos veamos poco, siempre encontramos un ratillo para contarnos nuestras cosas, gracias por tu amistad y consejos.

Gracias también a la gente del Departamento de Cardiología Regenerativa de la tercera planta, a nuestros nuevos vecinos, Celia, Antonio M, Pilar, Antonio H, Christian y Cristiana, por acogernos tan bien en la segunda sur, y a los recién llegados de Zaragoza, con vosotros ya parece que el laboratorio está habitado...

También quería mencionar a la gente que ha pasado por nuestro labo como "Cicerone" o para hacer prácticas, Óscar, Cris, Lucía, Andrea y Fernando. Sobre todo gracias a Lucía por ser tan encantadora y estar siempre tan dispuesta a trabajar y aprender, y,

cómo no, gracias a la *amazing* Andreita por todas las risas que nos hemos echado juntas que espero sean muchas más, por los dibujitos y letrillas japonesas que me encontraba cada día envolviendo mis geles para Western, en definitiva, por ser tan especial. Gracias a todos vosotros por haberme enseñado a enseñar, por vuestras ganas de aprender y porque hemos tenido la suerte de dar con gente maravillosa.

Gracias Fran por ser un compi de labo estupendo, por ilustrarme con tu sabiduría de doctor de vez en cuando, por compartir conmigo penas, alegrías e ibuprofenos...

Cómo no, mil gracias a Brigitte, Nieves, Alberto y Cris. Gracias Brigitte por tu apoyo e interés, y por ayudarme a hablar en inglés. Nieves, gracias por ser tan buena gente, por entreternos con tus historias en las comidas, por estar ahí cuando lo he necesitado, por tus consejos, porque siempre estás dispuesta a echar un cable. Gracias Alberto por los buenos momentos que hemos pasado codo con codo en la poyata escuchando *Hot Mix Radio*, por todo lo que nos hemos reído juntos, por tus frases, y porque te gusta *Fama!*. Y gracias Cris por ser mi compañera y amiga durante este tiempo, por ser una compañera de laboratorio estupendísima, por tu ayuda desinteresada, por los sudores compartidos en *just pump*, por estar siempre ahí. Gracias a todos por ser el mejor grupo que se pueda tener, y sobre todo porque sois vosotros los que me habéis aguantando en el día a día, mis agobios, malhumores y días malos.

Gracias también a la gente que fuera de este mundillo me ha ayudado y apoyado en todo momento, en especial gracias a Patricia, David, Luisa y Sara, por interesarse siempre por mi trabajo y preocuparse por mí. Gracias a mis compis de Facultad Carlos y Esther. Gracias Esther por tu amistad y por estar siempre ahí dando ánimos aunque sea en la distancia. Gracias también a Chus, Rafa, Silvia, Alex, Paloma... por los buenos momentos vividos, tanto en cenas y salidas como en conciertos de Vetusta...

Muchas gracias a Jose Luis y a Regi, a María, a Anabel y a todos los demás "Orgaz" y "Bueno", porque desde el primer día que entré en vuestra casa me habéis hecho sentir como a una más, porque os habéis convertido en mi segunda familia.

Gracias a Pili y a Dani, sobre todo a Dani por aguantarme y bajar la música cuando quería estudiar... tú también me has sufrido en período de exámenes. Gracias al resto de mi familia, abuelo, tíos y primos, *muito obrigado a minha familia brasileira*, por ser tan maravillosos.

Gracias a mis padres, Jose e Inés, por apoyarme en todas mis decisiones, por ayudarme siempre, por enseñarme a valorar lo que realmente importa, por ser las mejores personas que he conocido nunca.

Y gracias a Jose por ser mi complemento perfecto, por hacerme reír, por enseñarme a disfrutar la música, por nuestras *cataplanas*, *rumbas* y *seahorses*, por todo lo que nos seguiremos inventando. Gracias por estar siempre a mi lado.

Sin todos vosotros esta Tesis no habría sido posible. ¡ ¡ ¡ MUCHAS GRACIAS!!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. ENDOTELIO, ESTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGÍA VASCULAR.....	7
Disfunción endotelial	7
Papel de las especies reactivas de oxígeno en la disfunción del endotelio.....	8
2. GENERACIÓN MITOCONDRIAL DE ROS Y SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE	11
Producción de ROS por la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	11
Sistemas de protección antioxidante	13
3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA DEFENSA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO	17
3.1. PGC-1 α	17
3.2. FoxO3a.....	23
3.3. SIRT1	30
OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
CULTIVOS CELULARES.....	45
a. Establecimiento de cultivos primarios	45
b. Líneas celulares	46
ANIMALES	46
AISLAMIENTO DE ARN TOTAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADNc	46
RT-PCR CUANTITATIVA	47
INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).....	48
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES TOTALES E INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).....	49
INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS (IP)	50
ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS <i>IN VITRO</i>	51
VECTORES ADENOVIRALES	51
a. Vectores adenovirales utilizados.....	51
b. Obtención de preparaciones de adenovirus y titulación	53
c. Protocolo de infección.....	54
TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS	54
MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA	54
MUTAGÉNESIS DIRIGIDA SOBRE EL PROMOTOR DE LA MnSOD	55
ANÁLISIS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	55
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
RESULTADOS.....	57
1. ESTUDIO DEL PAPEL DE FOXO3A EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES DE LA DEFENSA ANTIOXIDANTE EN EL ENDOTELIO.	59
FoxO3a regula la expresión del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial en HUVEC	59
FoxO3a se asocia directamente a las regiones promotoras de los genes de la defensa antioxidante	61
FoxO3a reduce los niveles intracelulares de ROS.....	62

2. ANÁLISIS DE LA POSIBLE COOPERACIÓN ENTRE FOXO3A Y PGC-1α EN LA INDUCCIÓN DE LOS GENES DE PROTECCIÓN FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO.....	66
PGC-1 α requiere la presencia de FoxO3a para inducir la expresión de los genes del sistema de defensa antioxidante	66
FoxO3a requiere la presencia de PGC-1 α para ejercer su efecto sobre el sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial.....	69
La capacidad de FoxO3a para reducir los niveles de ROS es menor en ausencia de PGC-1 α	73
FoxO3a y PGC-1 α interactúan directamente en células endoteliales.....	74
PGC-1 α actúa como coactivador transcripcional de FoxO3a	76
PGC-1 α coactiva a FoxO3a en el promotor de sod2	77
La inducción de sod2 por PGC-1 α requiere un sitio FoxO funcional.....	78
3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE SIRT1 EN LA REGULACIÓN DEL PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS ENDOTELIALES.	79
SIRT1 regula positivamente la expresión de varias enzimas clave en la defensa antioxidante en BAEC	79
SIRT1 requiere la presencia de PGC-1 α y de FoxO3a para inducir la expresión de los genes del sistema de defensa antioxidante.....	81
El tratamiento con el inhibidor de SIRT1 nicotinamida aumenta la acetilación de PGC-1 α	83
El tratamiento con H ₂ O ₂ induce la deacetilación de PGC-1 α y de FoxO3a por SIRT1.	85
DISCUSIÓN	89
FoxO3a actúa como regulador de la homeostasis de los ROS en el endotelio vascular	91
FoxO3a y PGC-1α actúan conjuntamente en la regulación de los genes de la defensa antioxidante	96
PGC-1α, FoxO3a y SIRT1 en la regulación de la protección frente al estrés oxidativo	101
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXO	137

ABREVIATURAS

Abreviaturas

β-actina: <i>beta</i> -actina	Ins: insulina
aa: aminoácido	JNK: quinasa c-Jun N-terminal
Ac-Lys: residuo de lisina acetilado	Kb: Kilobase
Ad: adenovirus	KO o (-/-): cepa carente de la expresión de un gen específico (del inglés <i>knock-out</i>)
ADN: ácido desoxirribonucleico	MAEC: células endoteliales de aorta de ratón
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario	MEF: fibroblastos embrionarios de ratón
ADP: adenosín difosfato	mg: miligramo/s
Akt: proteína quinasa B	min: minuto/s
AMPC: adenosín monofosfato cíclico	ml: mililitro/s
AMPK: quinasa activada por AMP	MnSOD: manganeso superóxido dismutasa
ARN: ácido ribonucleico	MST1: quinasa de mamíferos similar a Ste1
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	mut: mutante
ASK1: quinasa 1 en la señalización de apoptosis	NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida adenina
ATP: adenosín trifosfato	NADH: forma reducida del NAD ⁺
BAEC: células endoteliales de aorta bovina	NO: óxido nítrico
BAT: tejido adiposo marrón	O₂: oxígeno molecular
CAT: catalasa	O₂⁻: anión superóxido
CBP: proteína de unión a CREB	OH[·]: radical hidroxilo
CM-H₂DCFDA: 5-clorometil-2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester	ONOO⁻: peroxinitrito
CTE: cadena de transporte electrónico mitocondrial	p38 MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno p38
DBE: sitio consenso de unión para los factores FoxO en el ADN (del inglés <i>DAF-16 family member-binding element</i>)	PBS: solución salina de fosfato
DhR6G: dihidrorodamina 6G	PCAF: factor asociado a p300/CBP
EDTA: ácido etilén-diamino-tetracético	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial	PGC-1α: <i>peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1-α</i>
FADH₂: forma reducida del dinucleótido de flavina-adenina (FAD)	PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa
FBS: suero fetal de origen bovino	PPAR: <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
FKHRL1/FoxO3: <i>Forkhead in Rhabdomyosarcoma like-1</i>	Prx: peroxirredoxina
FoxO: subfamilia O de factores de transcripción de la familia <i>Forkhead</i>	qRT-PCR: PCR en tiempo real o cuantitativa
GADD45: gen inducible por daño en el ADN y parada en el crecimiento	RNasa: ribonucleasa
GFP: proteína verde fluorescente (del inglés <i>green fluorescent protein</i>)	RNS: especies reactivas de nitrógeno
GSK-3: glicógeno-sintasa quinasa-3	ROS: especies reactivas de oxígeno
GST: glutatión S-transferasa	s: segundo/s
H₂O₂: peróxido de hidrógeno	SDS: dodecil sulfato sódico
HA: hemaglutinina	SGK: quinasa inducible por suero y glucocorticoides
HEK-293A: células embrionarias humanas de riñón	shRNA: ARN de interferencia con horquilla (del inglés <i>short hairpin RNA</i>)
HRP: peroxidasa de rábano (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)	SIRT: sirtuinas, familia de enzimas deacetilasas (del inglés <i>silent information regulator 2</i>)
HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana	TR: tiorredoxina reductasa
IgG: inmunoglobulina G	Trx: tiorredoxina
	UCP: proteína desacoplante
	WB: inmunodetección de proteínas (del inglés <i>Western Blot</i>)
	WT o (+/+): cepa silvestre, control de referencia (del inglés <i>wild type</i>)

INTRODUCCIÓN

1. ENDOTELIO, ESTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGÍA VASCULAR

La capa más interna de los vasos sanguíneos, el endotelio vascular, es un órgano activo con actividad paracrina, endocrina y autocrina que es crucial para el mantenimiento de la homeostasis vascular (Szocs, 2004).

En respuesta a diferentes sustancias, tales como hormonas circulantes, citoquinas y drogas, así como a estímulos físicos y químicos (cambios de presión, fuerzas mecánicas asociadas al flujo sanguíneo, pH), las células endoteliales sintetizan y liberan diferentes factores que modulan la angiogénesis, las respuestas inflamatorias, la hemostasis, el tono y la permeabilidad vascular. Entre los factores vasoactivos se incluyen sustancias vasodilatadoras, como la prostaciclina (PGI_2), el óxido nítrico (NO) y el péptido natriurético C (CNP), y vasoconstrictoras, como el tromboxano A_2 , los isoprostanos y la endotelina-1 (Feletou and Vanhoutte, 2006a).

Como principal regulador de la homeostasis vascular, el endotelio desempeña varias funciones clave entre las que destacan:

- la regulación del flujo sanguíneo y la presión arterial
- el control del intercambio de macromoléculas y fluidos con los tejidos
- el control de la migración y proliferación de las células de la musculatura lisa vascular
- la regulación de la adhesión y la agregación plaquetaria
- la prevención de la activación leucocitaria
- la regulación de la trombogénesis y la fibrinólisis (Davignon and Ganz, 2004; Pober *et al.*, 2009).

Disfunción endotelial

El daño de la célula endotelial impide que sus funciones puedan ser realizadas con normalidad, dando lugar al proceso conocido como **disfunción endotelial**. Se ha descrito que la alteración de las propiedades homeostáticas del endotelio vascular contribuye tanto al inicio como a la progresión y resolución de los procesos de aterosclerosis. El daño endotelial reduce la respuesta vasodilatadora, generando hipertensión, promueve la expresión de moléculas de adhesión y aumenta la permeabilidad del endotelio, lo que favorece el establecimiento de un estado pro-inflamatorio en la pared arterial, con reclutamiento y activación de células mononucleares y formación de macrófagos espumosos. La disfunción endotelial es también responsable de la proliferación y acumulación de las células musculares lisas, que engrosan la pared del vaso y acaban por

invadir el lumen del mismo. El infiltrado de células inflamatorias, la degradación de matriz extracelular por proteólisis, y la muerte de células musculares lisas por apoptosis conduce a la formación de la placa de ateroma, constituida por un núcleo necrótico rico en lípidos recubierto por una cápsula fibrosa, y cuya ruptura puede causar trombosis y originar la oclusión del vaso. La inestabilidad de la placa de ateroma y la formación de un coágulo tras su liberación al flujo sanguíneo también están relacionados con la disfunción endotelial (Ross, 1999; Watkins and Farrall, 2006).

Las alteraciones de la función del endotelio son evidentes de forma muy temprana -mucho antes de que la formación de la placa de ateroma sea detectable- en individuos que están sometidos a alguno de los factores de riesgo conocidos para la patología vascular, presentándose también aunque en distintos grados en los posteriores estadios de la enfermedad (Balletshofer et al., 2000; Caballero et al., 1999; Ludmer et al., 1986). Así, diversos estudios clínicos han puesto de manifiesto el valor de la disfunción endotelial como factor pronóstico de futuros eventos cardiovasculares en pacientes con hipertensión (Perticone et al., 2001) o con diabetes (Makimattila and Yki-Jarvinen, 2002). También se ha observado disfunción endotelial en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria (Heitzer et al., 2005), así como en individuos que ya han sufrido procesos de isquemia-reperfusión a nivel de la circulación coronaria (Pagliaro et al., 2003) o un fallo cardíaco (Linke et al., 2003).

Papel de las especies reactivas de oxígeno en la disfunción del endotelio

Aunque todavía no existe un consenso generalizado sobre cuál es el elemento iniciador de la disfunción endotelial, numerosos estudios apuntan al **estrés oxidativo** como un factor clave tanto en la aparición como en la posterior evolución patológica de este proceso, siendo el denominador común de las diferentes condiciones patológicas a las que se encuentra asociado. El estrés oxidativo es por definición un incremento anormal, no fisiológico, en los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Griendling and FitzGerald, 2003; Szocs, 2004). Es importante reseñar que todos los factores considerados de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis, como la hipercolesterolemia (Rueckschloss et al., 2001), la hipertensión (Rueckschloss et al., 2003), la hiperglicemia (Nishikawa et al., 2000), la obesidad (Nishikawa et al., 2000), el hábito de fumar (Knight-Lozano et al., 2002) y el envejecimiento (Singh and Jialal, 2006), se han relacionado con niveles elevados de ROS.

Bajo la denominación de ROS se incluyen varias especies derivadas de la reducción del oxígeno molecular, fundamentalmente el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). Los ROS son necesarios para el funcionamiento

normal del endotelio, dando lugar a moléculas que actúan como segundos mensajeros en la regulación de distintos procesos, como el crecimiento/proliferación de la célula endotelial, su función como barrera para el paso de sustancias, la vasorelajación y el remodelado vascular (Cai and Harrison, 2000; Griendling *et al.*, 2000; Matoba *et al.*, 2000; Rhee *et al.*, 2000). Sin embargo, numerosas evidencias apuntan a que las especies reactivas de oxígeno generadas en el endotelio son determinantes en la aparición de la disfunción endotelial y el progreso de la aterosclerosis y otros procesos patológicos relacionados (Keaney, 2005).

El mecanismo molecular a través del cual los ROS alteran la función endotelial parece ser multifactorial y aún no está totalmente esclarecido. Hecha esta salvedad, hay que señalar que se conocen distintas vías a través de las cuales la acción de los ROS altera directamente la actividad de la célula endotelial. Se sabe que las especies reactivas de oxígeno pueden modular negativamente varias vías importantes en la regulación endotelial de la vasodilatación, siendo el NO su diana más relevante. La reacción entre el anión superóxido y el NO no sólo disminuye la concentración efectiva de óxido nítrico, sino que genera peroxinitrito (ONOO⁻), molécula altamente reactiva que puede producir el desacoplamiento de la enzima eNOS (sintasa de óxido nítrico endotelial) mediante oxidación de su cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄), reduciendo aún más la biodisponibilidad de NO en la célula endotelial y alterando así la capacidad de vasorelajación (Kuzkaya *et al.*, 2003; Landmesser *et al.*, 2003). El peroxinitrito es asimismo un potente mediador de la peroxidación lipídica y la nitración de proteínas, y puede incrementar los niveles celulares de ROS mediante la inhibición de las superóxido dismutasas, enzimas antioxidantes (Zou *et al.*, 2004) (Fig. 1).

Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno promueven la contracción de las células vasculares favoreciendo la movilización del calcio y la activación de enzimas endoteliales como las ciclooxigenasas, que producen factores de contracción derivados del endotelio (EDCF) (Suzuki and Ford, 1992; Vanhoutte *et al.*, 2005). La modificación de ácidos grasos poliinsaturados por el anión superóxido da lugar a isoprostanos, moléculas bioactivas que producen vasoconstricción por la activación de receptores de prostanoides en las células de la musculatura lisa vascular (Yang *et al.*, 2004). El peróxido de hidrógeno también puede causar despolarización del músculo liso y vasoconstricción (Feletou and Vanhoutte, 2006b).

Se sabe también que los ROS pueden dañar directamente diversas biomoléculas, produciendo modificaciones en el ADN celular (Bohr, 2002), oxidando e inactivando proteínas e induciendo la peroxidación de lípidos (Ott *et al.*, 2007). Los componentes mitocondriales son especialmente sensibles a la acción de los ROS, lo que puede comprometer la funcionalidad y la integridad de la mitocondria. Esto se debe fundamentalmente a la proximidad con el principal sitio de generación de ROS en la célula (la

cadena de transporte electrónico en la membrana mitocondrial interna) y a la particular vulnerabilidad del ADN mitocondrial a la acción de las especies reactivas de oxígeno, ya que carece de las histonas protectoras y de muchos de los mecanismos de reparación presentes en el genoma nuclear (Clayton *et al.*, 1974; Croteau *et al.*, 1999; Yakes and Van Houten, 1997).

La exposición prolongada a situaciones de estrés puede conducir a la muerte de la célula endotelial por apoptosis mediante la vía que implica la activación de ASK1 y JNK y/o p38 MAPK (Poerber *et al.*, 2009). La activación de apoptosis endotelial en la patología vascular ocurre tanto por la vía mitocondrial como por la vía extrínseca por inducción de Fas ligando.

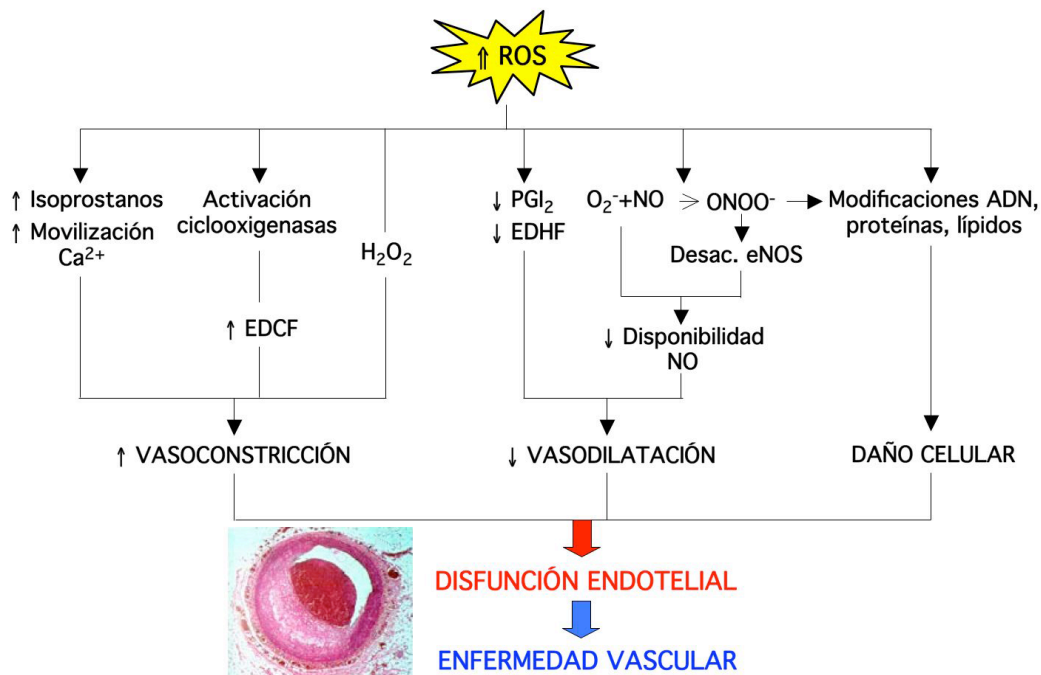


Figura 1. Las especies reactivas de oxígeno en la disfunción endotelial. Se representan los principales mecanismos de disfunción endotelial inducida por niveles elevados de ROS. Los radicales libres de oxígeno promueven la síntesis de compuestos que producen vasoconstricción y disminuyen la producción de sustancias vasodilatadoras. Asimismo, las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno pueden dañar distintas biomoléculas mediante su oxidación/nitración directa, lo que ocasiona el daño celular. Este conjunto de procesos conlleva una pérdida de la funcionalidad del endotelio que se ha descrito como factor iniciador de varias enfermedades vasculares. *EDCF*: factores de contracción derivados de endotelio; *H₂O₂*: peróxido de hidrógeno; *PGI₂*: prostaciclina; *EDHF*: factor hiperpolarizante derivado de endotelio; *eNOS*: sintasa de óxido nítrico endotelial; *ONOO⁻*: peroxinitrito.

2. GENERACIÓN MITOCONDRIAL DE ROS Y SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Las especies reactivas de oxígeno se generan en múltiples compartimentos celulares como consecuencia de la acción de una gran variedad de enzimas. Las principales fuentes de ROS en la célula endotelial son: la NADPH oxidasa, las óxido nítrico sintasas, la xantina oxidoreductasa, las lipooxigenasas/ciclooxigenasas y los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Singh and Jialal, 2006; Szocs, 2004).

En condiciones normales la mayor parte de los ROS generados en la célula endotelial proceden de la mitocondria (Balaban et al., 2005). No obstante, en situaciones patológicas la excesiva producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno representa tan solo el primer paso de una cascada que tiene como consecuencia la activación secundaria de otras fuentes productoras de ROS mucho más potentes. Se trata fundamentalmente de la NADPH oxidasa (Schafer et al., 2003), que a su vez puede promover la generación de ROS por otras enzimas como la xantina oxidoreductasa (McNally et al., 2003) o la eNOS (Landmesser et al., 2003), amplificándose así la situación de estrés oxidativo. Consideramos por tanto relevante centrar nuestra atención en los ROS procedentes del metabolismo de la mitocondria, ya que este orgánulo constituye la fuente primaria de especies reactivas de oxígeno en la célula (Nishikawa et al., 2000).

Producción de ROS por la cadena de transporte electrónico mitocondrial

La generación de ROS a nivel de la mitocondria es una consecuencia del proceso conocido como **fosforilación oxidativa**, mecanismo que permite la generación del ATP necesario para la mayoría de los procesos celulares de forma acoplada al consumo de oxígeno y a la producción de CO₂ (Saraste, 1999). Este proceso tiene lugar mediante el transporte de electrones desde el NADH o el FADH₂ al oxígeno molecular a través de una serie de transportadores situados en la membrana mitocondrial interna que constituyen lo que se conoce como cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE).

En la Figura 2 se muestra un esquema del flujo de electrones a través de la CTE. El NADH y el FADH₂ procedentes del metabolismo celular donan electrones derivados de la oxidación de distintos sustratos al complejo I ó II de la CTE, respectivamente. A continuación los electrones pasan al siguiente aceptor, la coenzima Q (CoQ), que a su vez los dona al citocromo b en el complejo III. De allí se transfieren sucesivamente al citocromo c1 y al citocromo c. Éste a su vez reduce al citocromo a₃ (citocromo oxidasa) en el complejo IV, que finalmente reduce el oxígeno molecular para formar agua. Durante este

proceso, y a medida que los electrones se mueven a lo largo de la CTE, un determinado número de protones ($\approx 10 \text{ H}^+$ por cada 2 electrones que se transfieren del NADH al oxígeno) son eyectados desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana por los componentes I, III y IV de la cadena de transporte electrónico, lo que establece un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La energía conservada en este gradiente es utilizada por la ATP sintasa situada en dicha membrana para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i) al tiempo que se disipa el gradiente generado, volviendo los protones a la matriz mitocondrial desde el espacio intermembrana (Balaban et al., 2005; Krauss et al., 2005).

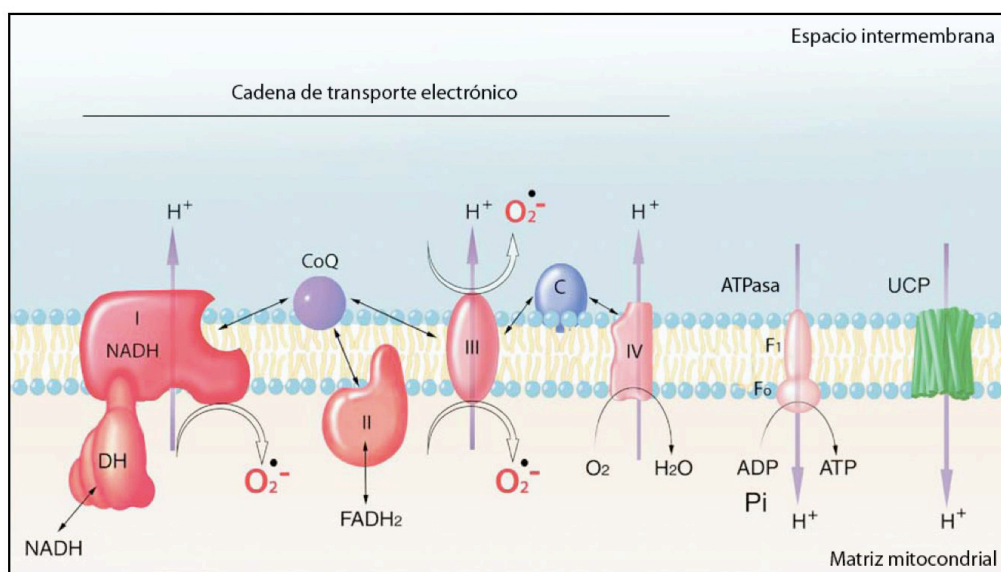


Figura 2. Modelo esquemático de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se señalan los principales sitios de producción de aniones superóxido a nivel de los complejos I y III. Las flechas representan el flujo de electrones cedidos por el NADH y/o el FADH₂ (en los complejos I y II respectivamente) hasta el aceptor final (O_2). El bombeo de protones hacia el espacio intermembrana genera un gradiente de voltaje que será utilizado por la ATPasa F₁-F₀ para generar ATP. La familia de proteínas desacoplantes (UCP), representada en color verde, reduce el potencial de membrana total. DH: deshidrogenasas; CoQ: coenzima Q; C: citocromo C. Adaptado de (Balaban et al., 2005).

En distintos puntos de la cadena de transporte electrónico electrones derivados del NADH o el FADH₂ pueden reaccionar directamente con el oxígeno molecular generando anión superóxido. Por acción de las enzimas superóxido dismutasas, este radical libre puede dar lugar a peróxido de hidrógeno, que a su vez, y en presencia de metales de transición reducidos, puede convertirse vía reacción de Fenton en anión hidroxilo, un potente oxidante (Giulivi et al., 1995). Asimismo, los ROS generados pueden reaccionar con el óxido nítrico dando lugar a las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Brown and Borutaite, 2001).

Se cree que la generación de ROS en la CTE se localiza fundamentalmente a nivel de los complejos I (Kushnareva et al., 2002) y III (Chen et al., 2003). La producción neta de

ROS es extremadamente variable, siendo sensible al potencial de membrana, al estado redox de los complejos transportadores, y a la tensión de oxígeno, entre otros factores. Se ha estimado que entre un 0,2 y un 2% del total de moléculas de oxígeno consumidas son convertidas por la mitocondria en especies reactivas de oxígeno (Chance *et al.*, 1979; St-Pierre *et al.*, 2002; Staniek and Nohl, 2000).

Sistemas de protección antioxidante

Dados los efectos potencialmente dañinos de los ROS, las células han desarrollado complejos mecanismos protectores para limitar la producción y liberación de oxidantes. Estos sistemas se localizan en múltiples compartimentos celulares (membrana plasmática, citosol, mitocondria, peroxisomas) y proporcionan protección frente a la toxicidad de los ROS mediante diferentes estrategias, desde la conversión de los ROS en moléculas menos activas (proceso conocido como *scavenging*), hasta la prevención de la transformación de ROS poco reactivos en formas más dañinas (Powers and Lennon, 1999).

Entre los distintos tipos de enzimas detoxificantes de ROS que forman parte del sistema de defensa antioxidante cabe destacar las superóxido dismutasas, la catalasa, las enzimas implicadas en el metabolismo del glutatión, las peroxirredoxinas y el sistema de tiorredoxinas/tiorredoxinas reductasas (Fig. 3).

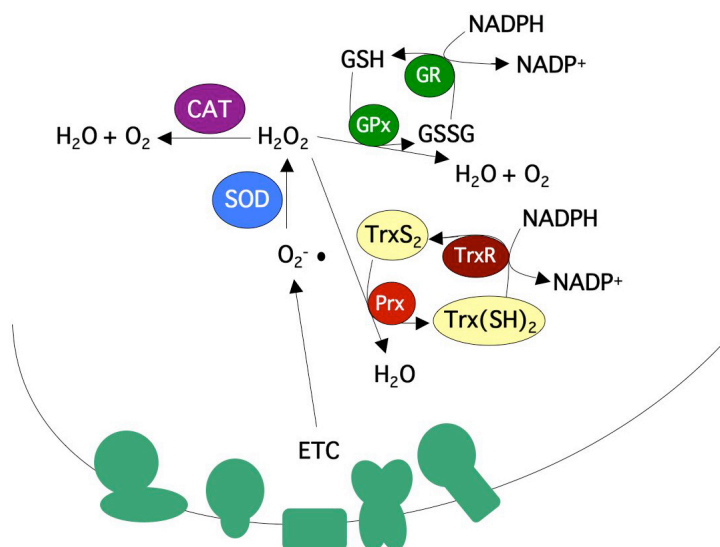


Figura 3. Sistema de detoxificación de ROS. Las células disponen de un complejo sistema de defensa para detoxificar los ROS generados como consecuencia del metabolismo oxidativo. Entre sus componentes enzimáticos se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa (CAT), las glutatión peroxidadas (GPx), las glutatión reductasas (GR), las peroxirredoxinas (Prx), las tiorredoxinas (Trx) y tiorredoxinas reductasas (TrxR). La regeneración del glutatión reducido (GSH) a través de las GR y del Trx reducido (a través de TrxR) dependen del NADH. ETC: cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Las **superóxido dismutasas (SOD)** son las enzimas que actúan en primer lugar sobre el anión superóxido derivado del metabolismo mitocondrial. Aunque no se trata de una molécula muy reactiva, el O_2^- puede alterar la función mitocondrial mediante la oxidación de núcleos Fe-S de distintas enzimas, como la aconitasa del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Gardner, 1997). Además, su interacción con el NO da lugar al peroxinitrito, un poderoso oxidante (Brown and Borutaite, 2001). Tanto la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), que se localiza en la matriz mitocondrial, como la cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu-ZnSOD), presente en el citosol y el espacio intermembrana, y la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD), localizada en la membrana citosólica con su sitio activo orientado hacia la matriz extracelular, catalizan la dismutación de dos moléculas de anión superóxido en peróxido de hidrógeno (Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001; Oberley, 2005; Powers and Lennon, 1999; Zelko *et al.*, 2002).

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre en sí mismo, pero sí un intermediario esencial en la formación de especies altamente reactivas como el radical hidroxilo. Se trata de una molécula relativamente estable que puede difundir desde la mitocondria a distintos compartimentos celulares. Sobre el H_2O_2 actúan diversas enzimas del sistema antioxidante:

- la **catalasa (CAT)**, localizada preferentemente en los peroxisomas, convierte el peróxido de hidrógeno en H_2O y oxígeno molecular (Goth *et al.*, 2004; Schriener *et al.*, 2005)

- las **glutation peroxidasas (GPx)** reducen el H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos a agua y alcohol, respectivamente. Utilizan el glutatión como sustrato. Existen tanto isoformas citoplasmáticas como mitocondriales (Imai and Nakagawa, 2003)

- las **glutation reductasas (GR)**, con una distribución similar a las GPx, no se consideran enzimas antioxidantes primarias, pero son esenciales para el correcto funcionamiento de las glutatión peroxidasas (Powers and Lennon, 1999)

- las **peroxirredoxinas (Prx)** y **tiorredoxinas (Trx)** son sistemas enzimáticos que actúan conjuntamente en la reducción de hidroperóxidos, entre ellos el H_2O_2 (Chae *et al.*, 1999). Algunos de sus componentes se expresan preferentemente en mitocondrias, como las peroxirredoxinas 3 (Prx3) y 5 (Prx5) (Banmeyer *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2004), la tiorredoxina 2 (Trx2) (Tanaka *et al.*, 2002) y la tiorredoxina reductasa 2 (TR2) (Conrad *et al.*, 2004).

Varias moléculas orgánicas pequeñas son también importantes para la eliminación de los ROS. Entre ellas se incluyen el ascorbato, el piruvato, los flavonoides, los carotenoides y, sobre todo, el glutatión, presente en grandes concentraciones en el interior celular (Finkel and Holbrook, 2000).

Aparte de los mencionados anteriormente, existe otro mecanismo importante en la defensa antioxidante, el constituido por las **proteínas desacoplantes (UCPs)**. Las UCPs son canales protónicos que se localizan en la membrana mitocondrial interna. A través de ellas los protones pueden retornar a la matriz mitocondrial desde el espacio intermembrana sin pasar por la ATP sintasa, de manera que parte de la energía derivada de la oxidación de los sustratos se disipa en forma de calor. Por tanto, como consecuencia de la acción de estas proteínas se produce un desacoplamiento entre el consumo de oxígeno y la generación de ATP (Krauss et al., 2005). Dado que la producción de superóxido está estrechamente ligada al gradiente protón-motriz generado en la CTE, se ha propuesto que el desacoplamiento de la respiración mediado por las UCPs puede reducir la producción mitocondrial de aniones superóxido y, por tanto, la generación de ROS (Duval et al., 2002; Echtay et al., 2002; Vidal-Puig et al., 2000).

Normalmente los complejos sistemas de la defensa antioxidante regulan los niveles de ROS manteniendo la homeostasis fisiológica. Sin embargo, en condiciones patofisiológicas la formación de especies reactivas de oxígeno puede verse incrementada, produciéndose un desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes, lo que genera estrés oxidativo.

Uno de los mecanismos que puede inducir un aumento en la producción mitocondrial de ROS es la inhibición de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de los complejos I (Li et al., 2003; Wolvetang et al., 1994), II (Albayrak et al., 2003) y III (Chandel et al., 1998) incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno, ya que los electrones se acumulan en las primeras fases de la CTE y pueden ser donados directamente al oxígeno molecular dando lugar al anión superóxido. Varios estudios han descrito que mutaciones en el ADN mitocondrial que afectan a la actividad de distintos componentes de la cadena de transporte electrónico se asocian con un incremento en la generación de ROS (Birket *et al.*, 2009; Gonzalo *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Pitkanen and Robinson, 1996).

Sin embargo, en las patologías humanas en general y en la enfermedad cardiovascular en particular, el principal factor desencadenante de una producción excesiva de ROS mitocondriales es consecuencia del llamado efecto Warburg. Este efecto fue descrito inicialmente en células tumorales y consiste en que, cuando hay glucosa suficiente y/o la célula está proliferando, se utiliza preferentemente la vía glicolítica (conversión de glucosa a lactato) para generar ATP, incluso en condiciones de normoxia, inhibiéndose la entrada del piruvato a la mitocondria (Warburg, 1956).

Numerosos estudios han mostrado que en pacientes con disfunción metabólica y/o diabetes el organismo se encuentra sometido de forma global al efecto Warburg, con un aumento generalizado del metabolismo glicolítico y una supresión de la actividad oxidativa

mitocondrial (Mootha et al., 2003). También se ha observado que esta situación se asocia a un aumento, aparentemente paradójico, en la producción mitocondrial de ROS y a la aparición de situaciones de estrés oxidativo. Hasta hace poco se desconocía el mecanismo que vinculaba al efecto Warburg con el estrés oxidativo, pero trabajos recientes de nuestro grupo y de otros (Kumashiro et al., 2008; Valle et al., 2005) han servido para proponer que la excesiva producción de ROS asociada a la disfunción metabólica se debe a que los mecanismos de detoxificación y protección frente a ROS se encuentran suprimidos cuando la actividad metabólica mitocondrial está inhibida, siendo el coactivador transcripcional PGC-1 α el responsable de la co-regulación de la actividad mitocondrial y los sistemas de protección frente a ROS. Se ha propuesto que este fenómeno también tiene lugar en las primeras fases de la disfunción endotelial (Addabbo et al., 2009), y que podría estar causado por un defecto en la respiración mitocondrial, lo que disminuiría la eficacia en la generación de ATP por el proceso de la fosforilación oxidativa y supondría un aumento en el número de electrones que se escapan de la CTE para reaccionar con el oxígeno molecular, generando ROS.

Cuando las células se ven sometidas a una situación de estrés oxidativo severo, su supervivencia depende de su habilidad para adaptarse o resistir el estrés y para reparar las moléculas dañadas. De forma alternativa, las células pueden responder al estímulo entrando en apoptosis (Finkel and Holbrook, 2000; Ott *et al.*, 2007).

Dada la importancia del mantenimiento de la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno para la funcionalidad celular, consideramos de gran relevancia estudiar cómo se regulan los distintos elementos de la defensa antioxidante en el endotelio vascular, sistema donde el estrés oxidativo parece jugar un papel determinante en el desarrollo de la disfunción endotelial y los procesos de aterosclerosis. Esto nos permitirá no sólo entender qué mecanismos median la respuesta al estrés y las decisiones de supervivencia o inducción de apoptosis, sino también proponer nuevas aproximaciones terapéuticas para la patología vascular.

3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA DEFENSA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

3.1. PGC-1 α

Numerosos programas biológicos son regulados a nivel transcripcional mediante la acción coordinada de diversos factores de transcripción que se unen al ADN. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de una nueva forma de regulación, la llevada a cabo por los coactivadores transcripcionales. Estos factores, que carecen de secuencia de unión al ADN, regulan diferentes procesos mediante la unión selectiva a factores de transcripción y el reclutamiento de proteínas reguladoras que modifican la estructura de la cromatina, lo que promueve la transcripción génica (Fig. 4).

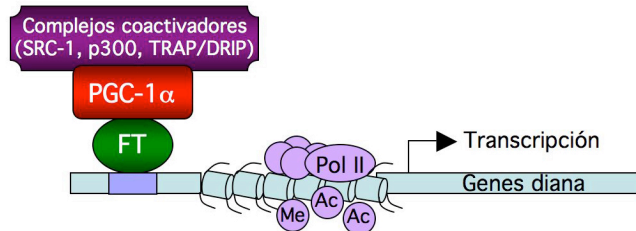


Figura 4. Mecanismo de activación de la transcripción por el coactivador PGC-1 α . El esquema muestra cómo el coactivador PGC-1 α se une a la cromatina mediante la interacción con factores de transcripción (FT) que reconocen secuencias específicas en la región promotora del gen diana. PGC-1 α recluta complejos proteicos que activan la transcripción mediante la modificación enzimática de la cromatina (como el coactivador-1 del receptor esteroideo [SRC-1] o p300, con actividad histona-acetiltransferasa), o mediante la interacción directa con la maquinaria de iniciación de la transcripción (como es el caso del complejo TRAP/DRIP). Se muestran modificaciones específicas de histonas, como la acetilación (Ac) y la metilación (Me), así como el complejo de la RNA polimerasa II (Pol II). *Modificado de (Finck and Kelly, 2006).*

Uno de los coactivadores transcripcionales más estudiados en el ámbito cardiovascular es PGC-1 α (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α*), factor que se identificó inicialmente por su interacción funcional con el receptor nuclear PPAR- γ en tejido adiposo marrón (BAT) (Puigserver et al., 1998). Posteriormente se descubrieron dos coactivadores relacionados, PGC-1 β , que muestra una alta homología con PGC-1 α , y PRC (del inglés *PGC-1-related coactivator*), el miembro de la familia menos caracterizado (Kressler et al., 2002; Lin et al., 2002a).

Funciones de PGC-1 α : regulación metabólica y protección frente al estrés oxidativo

PGC-1 α ha sido descrito como un regulador maestro del metabolismo oxidativo. Una de sus funciones principales es la estimulación de la biogénesis mitocondrial y la inducción

de la expresión de una gran variedad de proteínas mitocondriales, incluyendo las implicadas en el proceso de la respiración (Puigserver et al., 1998; Scarpulla, 2002; Vega et al., 2000; Wu et al., 1999). De acuerdo con este papel descrito para PGC-1 α , este coactivador se expresa a niveles elevados en tejidos ricos en mitocondrias y con una alta demanda energética, como el tejido adiposo marrón, el corazón, el músculo esquelético, el hígado, el riñón y el cerebro (Baar et al., 2002; Lin et al., 2003; Lin et al., 2004; Puigserver et al., 1998; Wu et al., 1999).

Aparte de regular la función mitocondrial, PGC-1 α está implicado en el control de numerosas vías metabólicas de forma específica de tejido. Se ha propuesto que este regulador transcripcional es capaz de coordinar la respuesta a varios estímulos ambientales activando determinados programas metabólicos en ciertos tejidos, a menudo mediante la estimulación de la actividad mitocondrial. Por ejemplo, en respuesta al frío PGC-1 α se induce en BAT y músculo esquelético, donde estimula la biogénesis mitocondrial y promueve la expresión de genes mitocondriales clave que contribuyen al programa de termogénesis adaptativa (Puigserver et al., 1998; Wu et al., 1999). PGC-1 α también regula la adaptación del músculo esquelético a un incremento en la actividad muscular promoviendo la formación de fibras musculares de contracción lenta (tipo I), que presentan un alto contenido en mitocondrias y utilizan el metabolismo oxidativo como principal fuente de energía (Akimoto et al., 2005; Handschin et al., 2007; Lin et al., 2002b). Asimismo, PGC-1 α activa tanto la β -oxidación de ácidos grasos como la gluconeogénesis en hígado en respuesta al ayuno (Herzig et al., 2001; Rhee et al., 2003; Yoon et al., 2001; Zhang et al., 2004).

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Valle et al., 2005), así como estudios de otros grupos (Kukidome et al., 2006; St-Pierre et al., 2006), han descrito la implicación de PGC-1 α en la regulación del metabolismo de las especies reactivas de oxígeno. En el trabajo de Valle y colaboradores se demostró por primera vez que PGC-1 α actúa como regulador positivo de la expresión de todo el conjunto de genes detoxificantes responsables de la eliminación de los ROS generados a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, siendo necesaria la presencia de este coactivador para la inducción de dichos genes en la vasculatura. Asimismo, la sobre-expresión de PGC-1 α en células del endotelio vascular reduce los niveles intracelulares de ROS y previene la muerte celular por apoptosis que tiene lugar en respuesta a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o los niveles elevados de glucosa (Valle et al., 2005).

Posteriormente St-Pierre y colaboradores describieron que PGC-1 α se induce en las células como consecuencia del tratamiento con inductores de estrés oxidativo como el H₂O₂, probablemente a través de un mecanismo mediado por la activación del factor de transcripción CREB (Irrcher et al., 2009; St-Pierre et al., 2006). Estos autores también

mostraron la relevancia del papel de PGC-1 α en la regulación del metabolismo de los ROS *in vivo* mediante estudios en ratones deficientes en el gen PGC-1 α . Cabe destacar que estos animales, aparte de tener comprometida la función cardíaca y ser extremadamente sensibles al frío, presentaban una elevada sensibilidad al daño por estrés oxidativo ocasionado a nivel del sistema nervioso por el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) y el ácido kaínico, neurotoxinas ampliamente utilizadas en modelos de estudio de la enfermedad de Parkinson y la epilepsia, respectivamente. Se confirmaba así el papel crítico jugado por PGC-1 α en el control del programa de defensa antioxidante mitocondrial (St-Pierre *et al.*, 2006).

Dado que PGC-1 α también es capaz de promover procesos que aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno, como la biogénesis y la respiración mitocondrial, se ha propuesto que este coactivador podría estar ejerciendo un efecto dual sobre el metabolismo de los ROS, permitiendo que en respuesta a estímulos externos se produzca un incremento en el metabolismo mitocondrial sin que tenga lugar un aumento del daño por estrés oxidativo.

Esta hipótesis está apoyada por varios estudios que muestran que, en diversas patologías que han sido asociadas con el estrés oxidativo, como la diabetes, la enfermedad coronaria y desórdenes neurológicos, se observan tanto disminuciones en los niveles de expresión como alteraciones en la actividad de este coactivador (Mootha *et al.*, 2003; Sano and Schneider, 2005; Weydt *et al.*, 2006).

PGC-1 α parece asimismo ser importante para la funcionalidad del endotelio vascular. Tras el trabajo de Valle y colaboradores mencionado anteriormente (Valle *et al.*, 2005), varios estudios han propuesto la implicación de este coactivador en la regulación del metabolismo de los ROS en células endoteliales (Kim *et al.*, 2007; Kukidome *et al.*, 2006), así como en el control de procesos como la angiogénesis (Arany *et al.*, 2008) y la migración de las células de la musculatura lisa de los vasos (Qu *et al.*, 2009). Dado el papel que el estrés oxidativo en la célula vascular desempeña en el inicio y posterior evolución patológica de la disfunción endotelial, la estimulación de la expresión de PGC-1 α podría ser una vía interesante en la prevención del desarrollo de la aterosclerosis.

Regulación de PGC-1 α

La expresión y la actividad de PGC-1 α deben estar estrechamente reguladas dada la gran variedad de efectos específicos de tejido mediados por este coactivador.

- Son varias las vías de señalización que han sido implicadas en la regulación de la **expresión** de PGC-1 α . El AMP cíclico (AMPc) es un activador clave de la transcripción de PGC-1 α a través de la activación de CREB, un potente transactivador de su expresión (Herzig *et al.*, 2001). Esta regulación tiene lugar en numerosos tejidos, entre ellos el hígado

(en respuesta al glucagón) y el tejido adiposo marrón (en respuesta a la estimulación de receptores β -adrenérgicos) (Wu et al., 1999). Como se ha mencionado anteriormente, se ha propuesto que los ROS inducen la expresión de PGC-1 α también a través de la activación de CREB (St-Pierre et al., 2006). Otro regulador de la expresión de este coactivador, con gran relevancia a nivel vascular, es el óxido nítrico. Se ha descrito que el NO promueve la biogénesis mitocondrial mediante la inducción de la expresión de PGC-1 α en diferentes tipos celulares, incluyendo adipocitos marrones (Nisoli et al., 2003), la línea miocítica L6 (Nisoli et al., 2004) y el endotelio vascular (Borniquel et al., 2006). El factor de transcripción FoxO1 ha sido también descrito como un modulador positivo de la expresión de PGC-1 α (Daitoku et al., 2003), mientras que el factor de respuesta a hipoxia HIF-1 parece ser un regulador negativo de su expresión (Mason et al., 2007) (Fig. 5).

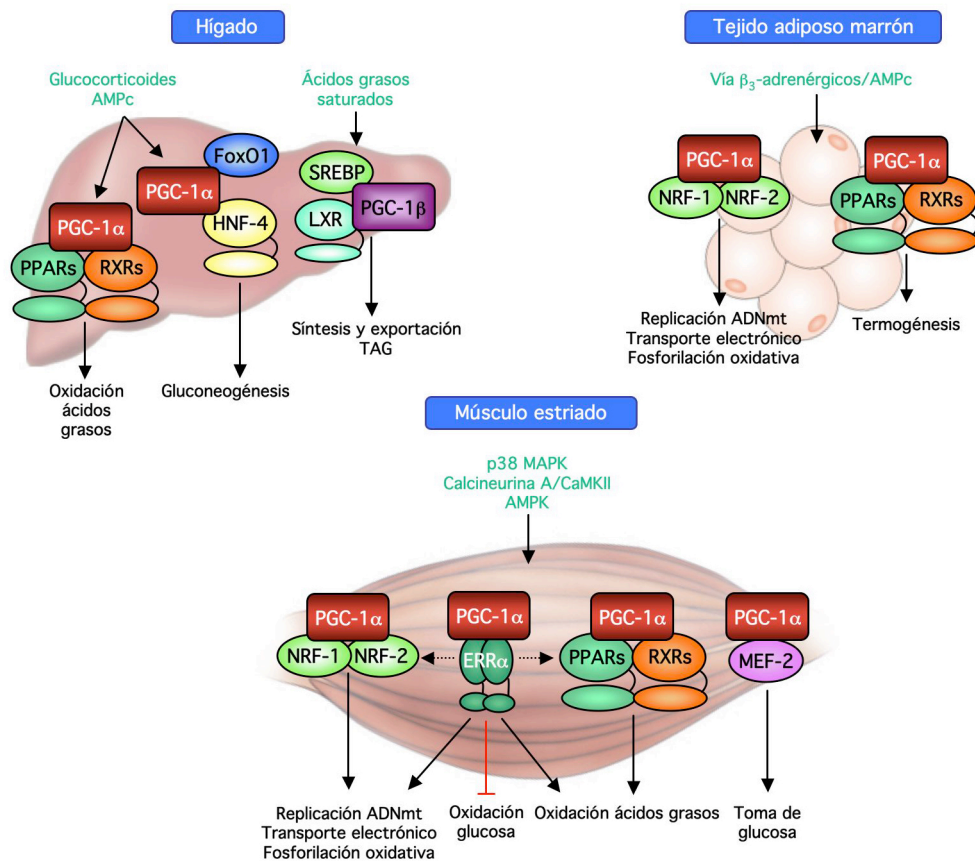


Figura 5. Regulación de PGC-1 α . El esquema representa las principales vías de regulación de PGC-1 α en hígado, tejido adiposo marrón y músculo esquelético. En respuesta a distintos estímulos fisiológicos y nutricionales, se induce la expresión y/o actividad de PGC-1 α , que interacciona con los factores de transcripción indicados dando lugar a la activación de rutas metabólicas específicas de tejido. *Adaptado de (Finck and Kelly, 2006)*

Distintos sistemas de transducción de señales se han relacionado también con la regulación de la expresión de PGC-1 α aunque los mecanismos a través de los cuales ejercen este efecto aún no han sido completamente elucidados. Entre ellos se encuentran la quinasa

dependiente de calcio/calmodulina, así como la calcineurina A en respuesta a Ca^{2+} , y la quinasa activada por AMP (AMPK), que inducen la expresión de PGC-1 α en el músculo estriado (Czubryt et al., 2003; Handschin et al., 2003; Schaeffer et al., 2004; Zong et al., 2002).

- Hasta la fecha se ha descrito que la **actividad** de PGC-1 α se regula de manera post-traducciona por fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitinación. Varias quinasas fosforilan directamente a PGC-1 α y modifican su actividad. En respuesta a IL-1, la p38 MAPK activa a PGC-1 α en células musculares incrementando la estabilidad de la proteína por desplazamiento del supresor transcripcional p160 (Fan et al., 2004; Knutti et al., 2001; Puigserver et al., 2001). La quinasa Akt fosforila a PGC-1 α en respuesta a insulina/aumento en los niveles de glucosa, lo que en este caso conlleva la inhibición de su actividad sobre genes de gluconeogénesis y β -oxidación de ácidos grasos en hígado (Li et al., 2007). La regulación de PGC-1 α por Akt no sólo es fundamental para entender el efecto Warburg descrito anteriormente, sino que también es relevante en la regulación de la respuesta a estrés (Akt se activa en presencia de estrés oxidativo, promoviendo supervivencia celular) (Wang et al., 2000) y en el control de la proliferación vía IGF-1 (Borowiec et al., 2007), aunque estos efectos están aún por explorar. PGC-1 α también se activa como consecuencia de la fosforilación por AMPK en respuesta a la disminución de nutrientes (Jager et al., 2007). Por otra parte, se ha propuesto que la glicógeno-sintasa quinasa-3 (GSK-3) inactiva a PGC-1 α , marcándolo para su degradación por el proteasoma (Anderson et al., 2008). Esta regulación es relevante tanto para el control metabólico (GSK se inhibe por Akt, controlando la producción hepática de glucosa y la síntesis proteica, y se activa en respuesta a restricción calórica) (Anderson et al., 2008; Lochhead et al., 2001) como para el control de la proliferación del epitelio (Mill et al., 2005), y quizá la respuesta a estrés (Anderson et al., 2008; Essers et al., 2005).

Además de la fosforilación, se han descrito otras modificaciones post-traduccionales que modulan la actividad de PGC-1 α y que se ha propuesto podrían conferir a este coactivador una preferencia para unirse a factores de transcripción específicos o reclutar determinados *binding partners* en la regulación de distintos programas de expresión génica. La deacetilación de PGC-1 α por la enzima SIRT1 aumenta su actividad transcripcional sobre genes de gluconeogénesis y β -oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo (Gerhart-Hines et al., 2007; Rodgers et al., 2005; Rodgers and Puigserver, 2007), mientras que su acetilación por GCN5 disminuye su actividad sobre los genes de gluconeogénesis hepática (Lerin et al., 2006; Rodgers et al., 2005). La proteína arginina metiltransferasa-1 (PRMT1) metila PGC-1 α en la región C-terminal y promueve su actividad transcripcional sobre genes implicados en la biogénesis mitocondrial (Teyssier et al., 2005).

Cabe destacar asimismo que la vía ubiquitina-proteasoma es importante para el mantenimiento de unos niveles adecuados de la proteína PGC-1 α en la célula (Sano et al., 2007), ya que los efectos que este coactivador ejerce en respuesta a las demandas metabólicas son transitorios, siendo la vida media de la proteína relativamente corta (2,28 horas) (Puigserver et al., 2001). Finalmente, hay que mencionar que se ha descrito recientemente que PGC-1 α también puede regularse por sumoilación (Rytinki and Palvimo, 2009).

Asociación de PGC-1 α a factores de transcripción

Una característica fundamental de los coactivadores PGC-1 es su habilidad para interactuar con una gran variedad de factores de transcripción que se unen a los promotores de sus genes diana, lo que les permite inducir y coordinar de forma específica distintos programas biológicos en diferentes tejidos. PGC-1 α , por ejemplo, regula la función mitocondrial a través de su interacción con los factores de respiración nuclear NRF-1 y -2 (Wu et al., 1999) y con los receptores relacionados con el receptor de estrógenos ERR- α y - γ (Huss et al., 2002; Mootha et al., 2004; Schreiber et al., 2004); se une y coactiva a varios miembros de la familia de los PPARs (α , β y δ) en la regulación de la β -oxidación de ácidos grasos (Guan et al., 2005; Wang et al., 2003), y promueve la gluconeogénesis hepática mediante su interacción con el factor de la familia *Forkhead* FoxO1 (Puigserver et al., 2003), el factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF4 α) (Yoon et al., 2001) y el receptor de glucocorticoides (Kressler et al., 2002). Asimismo, PGC-1 α modula la secreción de lipoproteínas mediante la coactivación del receptor X hepático (LXR) (Oberkofler et al., 2003) y promueve la expresión de proteínas específicas de las fibras musculares de contracción lenta a través de la interacción con el factor activador de miocitos 2 (MEF-2) (Lin et al., 2002b).

A pesar del papel bien establecido de PGC-1 α como regulador de los genes de detoxificación que protegen a la célula del daño causado por los ROS, al iniciar este trabajo se desconocía la identidad del factor o los factores de transcripción que actúan como mediadores de este efecto de PGC-1 α . Recientemente se ha propuesto que el factor ERR α podría ser importante para la regulación de los genes de estrés por PGC-1 α (Rangwala et al., 2007). En el presente estudio nos propusimos identificar un factor de transcripción que tuviera la capacidad de actuar como *binding partner* de PGC-1 α en la regulación de los sistemas de protección frente al estrés oxidativo de origen mitocondrial. Nuestros datos indican que este factor podría ser el regulador transcripcional de la familia *Forkhead* FoxO3a.

3.2. FoxO3a

Los factores de transcripción pertenecientes a la familia *Forkhead* se caracterizan por la presencia de un dominio conservado de unión a ADN denominado “*forkhead box*” (Kaestner et al., 2000). La subfamilia FoxO (*Forkhead*, clase O), descrita inicialmente por su homología con el factor DAF-16 de *Caenorhabditis elegans*, está formada por cuatro miembros en mamíferos: FoxO1 (también llamado FKHR, *Forkhead in rhabdomyosarcoma*), FoxO3a (FKHRL1, *Forkhead transcription factor like 1*), FoxO4 (AFX) y FoxO6. Todos ellos se unen a una misma secuencia consenso de reconocimiento en el ADN (GTAAACA) (Brunet et al., 1999; Furuyama et al., 2000). Los FoxO son ubicuos, pero se expresan a diferentes niveles según los tejidos, siendo FoxO1 particularmente abundante en el tejido adiposo, FoxO3a en el cerebro y FoxO4 en el corazón, mientras que FoxO6 se expresa predominantemente en el cerebro en desarrollo (Furuyama et al., 2000; Jacobs et al., 2003). FoxO1 y FoxO3a son las isoformas FoxO que se expresan mayoritariamente en el endotelio vascular, siendo los niveles de FoxO4 muy bajos en células endoteliales (Potente et al., 2005).

Funciones celulares de los FoxO

Los factores FoxO están implicados en la regulación de procesos celulares muy diversos mediante la modulación de la expresión de numerosos genes diana (Fig. 6).

Los FoxO juegan un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa, induciendo la expresión de dos enzimas clave en la gluconeogénesis, la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) y la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK). Los efectos de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa están mediados en parte por la inactivación de los factores FoxO por la vía PI3K/Akt (Barthel et al., 2005).

Otra de las funciones atribuidas a los miembros de la subfamilia FoxO es el control del ciclo celular. En células con la capacidad de dividirse, estos factores promueven la parada de ciclo en las transiciones G1/S y G2/M mediante la regulación tanto de activadores como de inhibidores del ciclo celular, entre ellos p21, p27, p130, y las ciclinas D1, D2 y G2 (Kops et al., 2002b; Medema et al., 2000; Ramaswamy et al., 2002; Seoane et al., 2004; Tran et al., 2002).

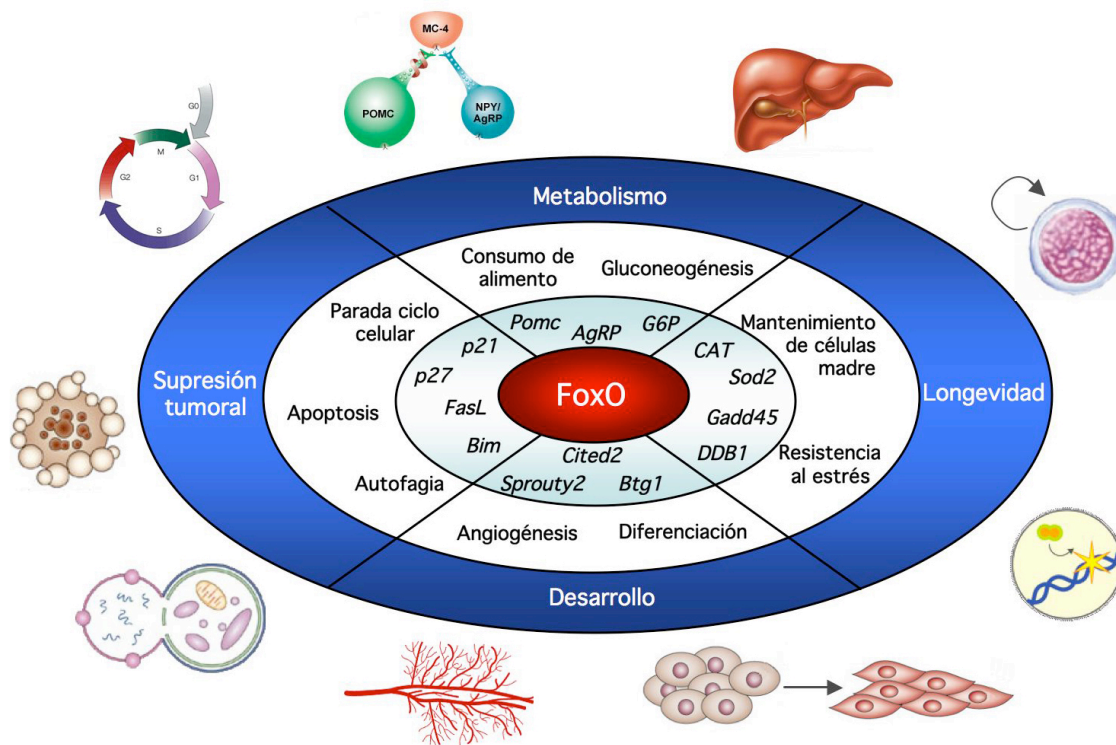


Figura 6. Funciones de los factores FoxO en las células y en el organismo. Los factores de transcripción FoxO promueven una gran variedad de procesos celulares mediante la regulación positiva de genes diana (en cursiva). Las respuestas celulares mediadas por FoxO afectan a numerosos procesos en el organismo, entre ellos la supresión tumoral, la longevidad, el desarrollo y el metabolismo. Cabe reseñar que algunos procesos celulares pueden no ser exclusivos de una única función en el organismo (por ejemplo, la parada de ciclo celular). Modificado de (Calnan and Brunet, 2008).

Por otro lado, los FoxO han sido implicados en la inducción de respuestas de supervivencia celular. Concretamente, se ha descrito que el factor FoxO3a protege a células quiescentes frente a situaciones de estrés oxidativo (Kops et al., 2002a) y actúa como regulador transcripcional directo de tres importantes enzimas antioxidantes, la MnSOD, la catalasa y la Prx3 (Chiribau et al., 2008; Kops et al., 2002a; Nemoto and Finkel, 2002). Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se propone que células madre hematopoyéticas deficientes en FoxO1, FoxO3a y FoxO4 tienen una capacidad de automantenimiento reducida, debido a que presentan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de una disminución en la expresión de genes implicados en la regulación de los ROS (Tothova et al., 2007). Los factores FoxO promueven además la expresión de varios genes relacionados con la reparación de daños en el ADN, como GADD45 (gen inducible por daño en el ADN y parada en el crecimiento-45) y DDB1 (proteína de unión al ADN específica de daño-1) (Ramaswamy et al., 2002; Tran et al., 2002). Por ello, se ha propuesto que la inducción de la parada de ciclo celular por los FoxO podría dar tiempo a la célula tanto para reparar el daño en el ADN ocasionado por los niveles elevados de ROS como para la detoxificación de los mismos.

Es también importante destacar que la presencia de distintas fuentes de estrés, incluyendo el estrés oxidativo, el choque térmico y la exposición a la radiación ultravioleta, promueve la relocalización de las proteínas FoxO del citoplasma al núcleo (Brunet et al., 2004), efecto que parece estar mediado por las proteínas quinasas de respuesta a estrés JNK (quinasa c-Jun) y MST1 (quinasa de mamíferos similar a Ste20) (Essers et al., 2004; Lehtinen et al., 2006). El hecho de que el estrés promueva el transporte de FoxO al núcleo, donde es activo como factor de transcripción, apoya la idea de que estos factores podrían jugar un papel como reguladores de la respuesta celular a los niveles elevados de ROS.

El ortólogo de FoxO en *C. elegans*, DAF-16, aumenta longevidad a través de la inducción del gen de la MnSOD (*SOD3* en nematodos) (Honda and Honda, 1999). Por ello, se ha propuesto que los factores FoxO podrían estar también implicados en el control de la longevidad en mamíferos; la base de esta regulación sería la inducción de los mecanismos de protección frente a estrés oxidativo, dado que el envejecimiento se ha asociado con la acumulación del daño oxidativo en las células y organismos, y la pérdida de la capacidad regenerativa de las células madre (Ashok and Ali, 1999). Sin embargo, la relevancia de los factores FoxO como reguladores de longevidad en mamíferos está todavía por demostrar.

Los FoxO también han sido relacionados con la regulación de la diferenciación celular, actuando como inhibidores o promotores de la misma dependiendo del tejido y de la isoforma FoxO. Así, mientras FoxO1 inhibe diferenciación en adipocitos y mioblastos (Hribal et al., 2003; Nakae et al., 2003), FoxO3a parece promover la diferenciación eritroide (Bakker et al., 2004). Tothova y colaboradores han descrito que ratones deficientes en FoxO1/3/4 presentan alteraciones en los linajes mieloide y linfoide y una deficiencia en la capacidad de las células madre hematopoyéticas para repoblar la médula ósea, sugiriendo un papel de la subfamilia FoxO tanto en promover la diferenciación como en el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas indiferenciadas (Tothova et al., 2007).

Las funciones que llevan a cabo los FoxO en la regulación del ciclo celular, la reparación del ADN dañado y la apoptosis han llevado a proponer un posible papel de estos factores en la supresión tumoral. En línea con esta idea, se ha descrito que la expresión de formas activas de FoxO1, FoxO3 y FoxO4 reduce la formación de tumores en ratones *nude* (Hu et al., 2004; Ramaswamy et al., 2002; Yang et al., 2005). El hecho que los FoxO puedan asociarse con distintos supresores tumorales, como p53 (Brunet et al., 2004) y SMAD (Seoane et al., 2004), y oncogenes como β -catenina (Essers et al., 2005), así como la observación de una desregulación de estos factores en distintos tipos de tumores, entre ellos el cáncer de mama (Hu et al., 2004), de próstata (Modur et al., 2002) y el glioblastoma (Seoane et al., 2004), apoya la implicación de los reguladores FoxO en el cáncer.

Dada la gran diversidad de funciones celulares de la subfamilia FoxO, se ha propuesto que tanto la interacción específica con otros reguladores transcripcionales como unos complejos mecanismos de regulación son críticos para determinar la función final derivada de la actividad de los FoxO en tejidos específicos y en respuesta a distintos tipos o intensidades de estímulos (Calnan and Brunet, 2008; van der Vos and Coffey, 2008).

Regulación de los factores de transcripción FoxO

Los factores FoxO traducen una gran variedad de señales ambientales en programas específicos de expresión génica. Estos estímulos externos controlan la actividad de FoxO mayoritariamente mediante cambios en su localización subcelular, aunque también pueden modular los niveles de proteína, la unión al ADN y la actividad transcripcional de estos factores (Calnan and Brunet, 2008). La regulación precisa de los FoxO se consigue mediante cambios en las modificaciones post-traduccionales de estas proteínas, incluyendo la fosforilación, la acetilación, la mono- y la poli-ubiquitinación, y posiblemente otras modificaciones todavía no identificadas.

Los FoxO son regulados negativamente por una vía de señalización muy conservada a lo largo de la evolución: la ruta PI3K-Akt/SGK. Como se muestra en la figura 7, en respuesta a insulina, IGFs (del inglés *insulin-like growth factors*), factores de crecimiento y factores neurotróficos (Brunet et al., 1999; Guo et al., 1999; Jackson et al., 2000; Yellaturu et al., 2002; Zheng et al., 2002), la fosforilación de los factores FoxO por las proteínas quinasas Akt (fosfatidil-inositol 3 quinasa) y SGK (quinasa inducible por suero y glucocorticoides) promueve su rápida relocalización desde el núcleo al citoplasma, lo que impide la transactivación por FoxO de sus genes diana (Biggs et al., 1999; Brunet et al., 1999; Brunet et al., 2001). En ausencia de insulina/factores de crecimiento, cuando Akt y SGK son inactivas, los factores FoxO se localizan mayoritariamente en el núcleo, donde actúan preferentemente como potentes activadores transcripcionales.

Aparte de Akt y SGK, otras quinasas fosforilan a los FoxO en respuesta a la estimulación por factores de crecimiento, contribuyendo a su secuestro en el citoplasma. Entre ellas se encuentran la caseína quinasa 1 (CK1) (Rena et al., 2002) y la quinasa-2 dependiente de ciclina (Cdk2) (Huang et al., 2006).

Cabe destacar que la fosforilación de FoxO por Akt en respuesta a insulina/factores de crecimiento no sólo promueve la localización en el citoplasma de las proteínas FoxO, sino también su degradación por un mecanismo dependiente del proteasoma (Matsuzaki *et al.*, 2003; Plas and Thompson, 2003) (Fig. 7). La E3 ubiquitin-ligasa responsable de la poliubiquitinación y degradación vía proteasoma de FoxO1 en respuesta a insulina es el complejo de poliubiquitinación SCF^{Skp2} (Skp1/Cull/F-box) (Huang et al., 2005).

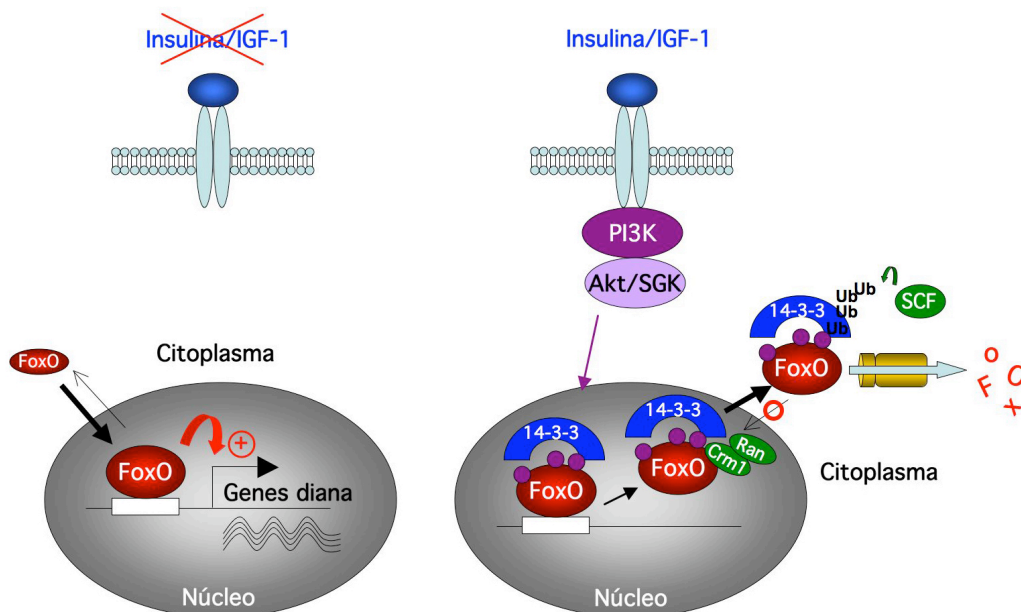


Figura 7. Inhibición de los factores de transcripción FoxO en respuesta a insulina/factores de crecimiento. Los factores FoxO son transportados continuamente entre el citoplasma y el núcleo. En ausencia de insulina/factores de crecimiento, FoxO se localiza mayoritariamente en el núcleo, donde actúa activando la transcripción de diversos genes diana. La activación de la vía PI3K-Akt/Sgk por insulina y factores de crecimiento promueve la fosforilación de FoxO en el núcleo, la unión de la proteína 14-3-3 y la liberación de FoxO de sus sitios de unión al ADN. La unión de 14-3-3 puede conducir a la exposición de NES (sitios de exportación nuclear) en FoxO y facilitar su interacción con Ran/Crm1 en el poro nuclear. En el citoplasma, la proteína FoxO fosforilada es degradada vía proteasoma.
Adaptado de (Greer and Brunet, 2005) y (Calnan and Brunet, 2008).

Es interesante reseñar que, como se ha comentado previamente, la fosforilación de FoxO por las quinasas activadas por estrés JNK y MST1 tiene el efecto opuesto a la vía PI3K-Akt/Sgk, promoviendo la localización de FoxO en el núcleo (Essers et al., 2004; Lehtinen et al., 2006). El estrés oxidativo induce asimismo la monoubiquitinación de la proteína FoxO4, lo que contribuye a su relocalización en el núcleo por un mecanismo que todavía no ha sido completamente elucidado (van der Horst et al., 2006).

Por otra parte, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) ha sido implicada en la regulación de la actividad transcripcional de FoxO. Se ha descrito que esta quinasa fosforila a FoxO3a en respuesta a la privación de nutrientes, lo que promueve su actividad transcripcional sobre genes implicados en metabolismo y resistencia al estrés. Esto permitiría a la célula adaptarse a cambios en los niveles de energía (Greer et al., 2007b).

La acetilación/deacetilación de los FoxO es otro mecanismo importante de regulación de estos factores, que afecta tanto a su localización subcelular como a su capacidad de unión al ADN y a su actividad transcripcional. Los niveles de acetilación de FoxO se modulan por la acción contrapuesta de proteínas acetilasas –CBP (proteína de unión a CREB), p300 y PCAF (factor asociado a p300/CBP)- y proteínas deacetilasas, entre las

que destacan varios miembros de la familia de las sirtuinas (SIRT) (Fukuoka et al., 2003; Motta et al., 2004).

Se ha descrito que p300 y CBP ejercen un efecto dual sobre FoxO, ya que mientras la acetilación de FoxO1 y FoxO3a por estas enzimas interfiere con la unión de dichos factores al ADN inhibiendo su función (Matsuzaki et al., 2005; Tsai et al., 2007), la interacción FoxO-p300/CBP permite el reclutamiento de un complejo coactivador a los promotores de genes dianas específicos (*IGFBP-1*, proteína-1 de unión a IGF, y *AgRP*, proteína relacionada con Agouti), iniciando su transactivación (Kitamura et al., 2006; Nasrin et al., 2000). Se ha sugerido que el papel antagonista de p300/CBP sobre FoxO podría ser importante para el control preciso de los niveles de expresión de sus genes diana (Calnan and Brunet, 2008).

En respuesta al estrés oxidativo, FoxO se acetila y se transloca al núcleo (Fukuoka et al., 2003; Motta et al., 2004; van der Horst et al., 2004; Wang et al., 2007). La presencia de un estímulo oxidante promueve asimismo la interacción y deacetilación de FoxO por las enzimas deacetilasas SIRT1 y SIRT2, lo que, como se comenta más adelante, favorece la actividad transcripcional de este factor sobre ciertos genes diana implicados en la resistencia al estrés y la parada de ciclo celular (Brunet et al., 2004; Daitoku et al., 2004). Se ha sugerido que el número de sitios acetilados en FoxO, modulado entre otras enzimas por SIRT, podría representar un “código molecular” que dirigiese el reclutamiento de FoxO sobre diferentes promotores diana y/o complejos proteicos sobre estos promotores.

FoxO y endotelio

Según varios estudios recientes, los factores FoxO juegan un papel determinante en la función endotelial. Ratones deficientes en FoxO1 mueren durante la embriogénesis debido a defectos en el desarrollo vascular, sugiriendo un papel clave de este factor en la formación y maduración de la vasculatura naciente (Furuyama et al., 2004; Hosaka et al., 2004). Los FoxO también han sido relacionados con la actividad angiogénica de las células endoteliales y la formación de vasos en el adulto. Se descrito que los factores FoxO1 y FoxO3a son reguladores clave de la formación de túbulos y la migración endotelial *in vitro*. Ambos factores regulan específicamente una serie de genes implicados en los procesos de angiogénesis y remodelado vascular, incluyendo el gen de la angiopietina 2, y el de la eNOS, que es esencial para la neovascularización postnatal. *In vivo*, se ha demostrado que la deficiencia de FoxO3a aumenta la formación y la maduración de la vasculatura en dos modelos de neovascularización postnatal (Potente et al., 2005). Asimismo, se ha descrito que la triple inactivación condicional de FoxO1, FoxO3a y FoxO4 en ratones adultos conduce a la formación de hemangiomas, sugiriendo que estos factores de transcripción actúan como supresores tumorales en células endoteliales (Paik et al., 2007).

Sin embargo, y a pesar de la relevancia fisiológica que tiene la producción de ROS en la homeostasis vascular, hasta el momento no se ha determinado el papel de los factores FoxO en la regulación de la función de la célula endotelial en condiciones de estrés oxidativo. En base a los datos que describen a los FoxO como importantes reguladores del metabolismo, la respuesta celular al estrés y la función del endotelio, y dado que FoxO3a es el miembro de la subfamilia FoxO que más claramente ha sido involucrado en la protección frente al estrés oxidativo, nos propusimos estudiar si este factor está implicado en la regulación transcripcional del programa de defensa antioxidante en el endotelio vascular.

FoxO y PGC-1 α

Se sabe que los factores FoxO interactúan con una serie de reguladores transcripcionales que contribuyen a la activación, y en algunos casos represión, específica de determinados genes diana. En la mayoría de los casos estas interacciones son promovidas por la proximidad de sitios de unión para FoxO y otros elementos de respuesta en los promotores de genes específicos (Calnan and Brunet, 2008).

Se ha descrito que la interacción entre FoxO y varios coactivadores transcripcionales (p300/CBP/SRC, β -catenina, miocardina) es crítica para el control de la actividad transcripcional de estos reguladores (Essers et al., 2005; Liu et al., 2005; Nasrin et al., 2000). Uno de los factores que se ha propuesto que coopera con FoxO en la regulación de sus genes diana es el coactivador PGC-1 α .

Tanto PGC-1 α como FoxO han sido implicados en la regulación del metabolismo, así como en el control de la función endotelial. Como se ha comentado anteriormente, ambos factores se han relacionado asimismo con la modulación de la respuesta de la célula a situaciones de estrés oxidativo.

Son varias las evidencias que apuntan a una posible relación entre FoxO y PGC-1 α . Estos factores parecen actuar conjuntamente en la regulación transcripcional de distintos programas de expresión génica. Así, se ha propuesto que la interacción FoxO1-PGC-1 α es fundamental para la activación de la transcripción de genes implicados en la gluconeogénesis hepática (Puigserver et al., 2003), mientras que en músculo esquelético la expresión de PGC-1 α inhibe la transcripción dependiente de FoxO3a de los genes atrogina-1 y MuRF-1, relacionados con la atrofia muscular (Sandri et al., 2006). Aparte de funcionar como *binding partners* en la regulación de estos procesos, se ha descrito que FoxO y PGC-1 α pueden ser regulados por vías de señalización comunes; por ejemplo, ambos son fosforilados por las quinasas Akt y AMPK (Greer et al., 2007a; Jager et al., 2007; Li et al., 2007).

En base a los datos que sugieren que PGC-1 α y varios factores de la familia FoxO pueden cooperar para regular la transcripción de determinados genes diana, y dados los resultados previos de nuestro grupo que identificaban a PGC-1 α como regulador clave del sistema de defensa antioxidante en el endotelio vascular, nos planteamos la posibilidad de que, si efectivamente FoxO3a ejercía un papel en la regulación de dicho sistema en células endoteliales, pudiese estar actuando conjuntamente con PGC-1 α para regular de forma coordinada la respuesta celular al estrés oxidativo.

3.3. SIRT1

SIRT1 pertenece a la familia de enzimas deacetilasas conocidas como sirtuinas. El primer miembro caracterizado de esta familia, Sir2 (regulador 2 de silenciamiento de información), fue descrito inicialmente en levaduras como un importante modulador del silenciamiento génico. Posteriormente se identificó como regulador clave de la longevidad en *Saccharomyces cerevisiae* y otros organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila*, donde actúa mediando el aumento de longevidad que se produce en condiciones de restricción calórica (Guarente and Picard, 2005; Kaeberlein *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000).

En mamíferos se han descrito siete miembros de la familia de las sirtuinas, SIRT1-7, de los cuales el mejor caracterizado y más próximo evolutivamente a Sir2 es SIRT1. Aunque los niveles de expresión de esta proteína se incrementan en diversos tejidos humanos y murinos en respuesta a la restricción calórica (Cohen *et al.*, 2004; Heilbronn *et al.*, 2005; Nisoli *et al.*, 2005), actualmente no hay evidencias definitivas de que las sirtuinas actúen como mediadores de longevidad en mamíferos. Así, no se ha demostrado que el tratamiento con activadores farmacológicos de estas enzimas ni la sobre-expresión de SIRT1 prolonguen la vida en ratones (Knutson and Leeuwenburgh, 2008).

Las siete sirtuinas descritas en mamíferos se expresan de forma ubicua en los tejidos humanos, aunque los niveles de expresión más elevados de la mayoría de ellas se han detectado en el cerebro y en los testículos (Frye, 1999; Michishita *et al.*, 2005).

Mecanismos moleculares de acción de la sirtuinas

Se han atribuido a las sirtuinas dos actividades enzimáticas distintas: deacetilasa (Imai *et al.*, 2000; Landry *et al.*, 2000) y/o ADP-ribosil transferasa (Liszt *et al.*, 2005). SIRT1 se clasifica como una deacetilasa de histonas de clase III dependiente de NAD⁺ (Vaziri *et al.*, 2001). SIRT2, SIRT3, SIRT5, SIRT6 y SIRT7 también actúan como deacetilasas, mientras que SIRT4 y SIRT6 muestran actividad ADP-ribosil transferasa (Fig. 8).

La reacción de deacetilación catalizada por las sirtuinas usa el NAD⁺ para convertir una proteína sustrato acetilada en una proteína deacetilada, nicotinamida y el metabolito 2'-O-acetil-ADP-ribosa, formado por la transferencia del grupo acetilo a la ADP-ribosa del NAD⁺. Esta reacción es específica de las sirtuinas en el sentido de que el NAD⁺, cofactor de numerosas reacciones bioquímicas en la célula, actúa como co-sustrato (Borra et al., 2004; Landry et al., 2000; Tanner et al., 2000). La actividad deacetilasa de estas enzimas es controlada por la relación [NAD⁺]/[NADH], funcionando el NAD⁺ como activador, mientras que la nicotinamida y el dinucleótido NADH reducido actúan como inhibidores del proceso de deacetilación (Anderson et al., 2003; Lin et al., 2000). Las características de esta reacción enzimática han llevado a los investigadores a proponer que las sirtuinas podrían actuar como sensores del estado energético de la célula.

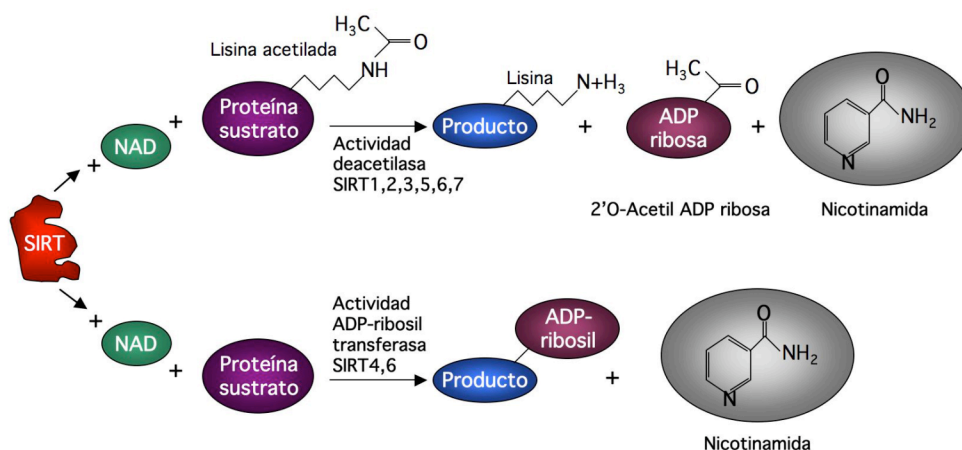


Figura 8. Actividad enzimática de las sirtuinas. Las sirtuinas catalizan una reacción de deacetilación única donde el NAD se consume como co-sustrato. Durante la reacción, la proteína sustrato es deacetilada y el NAD se rompe en nicotinamida y 2'-O-acetil-ADP-ribosa. La actividad deacetilasa NAD-dependiente es característica de todas las sirtuinas excepto de SIRT4, que es una ADP-ribosil transferasa. Esta reacción implica la creación de una unión N- o S-glicosídica entre un aminoácido específico (como la arginina o la cisteína) en la proteína aceptora y el residuo ADP-ribosa del NAD. SIRT6 muestra tanto actividad deacetilasa como actividad auto-ADP ribosilasa. Adaptada de (Lavu et al., 2008).

Sustratos y funciones celulares de las sirtuinas

La función de las sirtuinas se relacionó inicialmente con la represión transcripcional, dada su capacidad para deacetilar histonas. Concretamente, la enzima SIRT1 ha sido implicada en el silenciamiento de regiones de ADN altamente repetitivas (Oberdoerffer et al., 2008) y en el silenciamiento epigenético del ADN hipermetilado de genes supresores tumorales en células cancerígenas (Pruitt et al., 2006). Este efecto de las sirtuinas se ha asociado con su actividad deacetilasa sobre las histonas H1, H3 y H4. La lisina 16 de la histona H4 es el residuo que parece ser más crítico para el silenciamiento génico mediado por estas enzimas (Liou et al., 2005; O'Hagan et al., 2008; Vaquero et al., 2004).

Posteriormente se ha descubierto que numerosas proteínas no-histonas son también deacetiladas por las sirtuinas. Entre sus sustratos se encuentran varios reguladores transcripcionales, como FoxO1, FoxO3 y FoxO4, p53, la subunidad p65 del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y PGC-1 α (Brunet et al., 2004; Luo et al., 2001; Rodgers et al., 2005; Yeung et al., 2004), pero también enzimas, como la acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) y proteínas estructurales como la α -tubulina (Hallows et al., 2006; North et al., 2003). En la figura 9 se muestran algunos ejemplos de vías celulares reguladas por SIRT1 mediante su actuación sobre distintos sustratos.

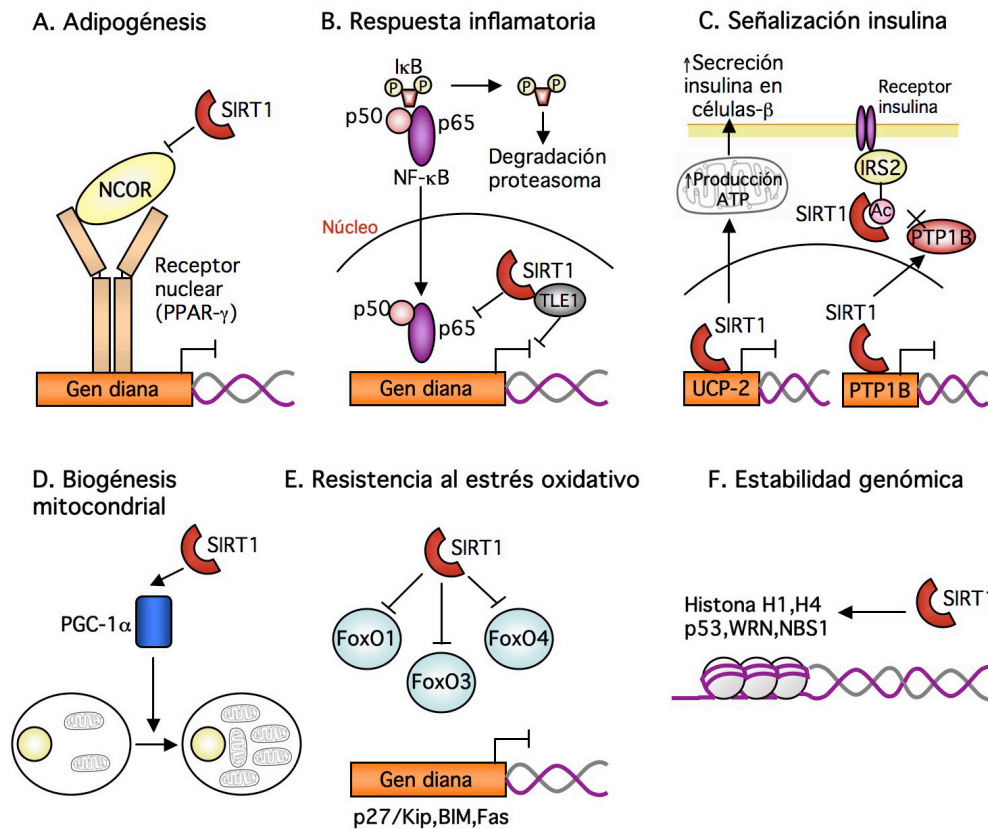


Figura 9. SIRT1 regula importantes vías de señalización celular mediante la deacetilación de proteínas diana o la inhibición de la transcripción génica. **A.** SIRT1 moviliza la grasa del tejido adiposo blanco inhibiendo la actividad de PPAR- γ mediante su interacción con el co-represor del receptor nuclear (NCOR). **B.** SIRT1 reprime la actividad transcripcional de NF- κ B mediante la deacetilación de la subunidad p65 y la interacción con el activador de *split 1* similar a transducina (TLE1). **C.** Se muestra el efecto de SIRT1 sobre la secreción de la insulina por las células- β pancreáticas, vía represión de UCP-2. Existen evidencias que apuntan a un papel de SIRT1 en la regulación de las vías de señalización de la insulina a través de la deacetilación del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) y la represión de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B). **D.** A través de la deacetilación de PGC-1 α SIRT1 controla el número y la función mitocondrial. **E.** La interacción de SIRT1 con las proteínas FoxO promueve la supervivencia celular en condiciones de estrés. **F.** Las proteínas del Síndrome de Werner (WRN) y el Síndrome de rotura de Nijmegen (NBS1) son dianas de SIRT1, contribuyendo estas interacciones a la estabilidad genómica. Adaptada de (Lavu et al., 2008).

Una de las funciones más importantes atribuidas a SIRT1 es el mantenimiento de la estabilidad del genoma, efecto que parece estar mediado tanto por la deacetilación de histonas como por otros mecanismos independientes. Como se ha comentado anteriormente, SIRT1 puede deacetilar a histonas relacionadas con el mantenimiento de la estructura de la cromatina (H1, H4) (Fraga *et al.*, 2005; Harvey and Downs, 2004; Vaquero *et al.*, 2004). SIRT1 ha sido asimismo implicada en la regulación del patrón de metilación en zonas de ADN dañadas ricas en CpG (O'Hagan *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha descrito que SIRT1 es capaz de deacetilar al factor NBS1 (producto del gen del Síndrome de rotura de Nijmegen), manteniéndolo en un estado hipoacetilado, lo que permite su fosforilación por la quinasa ATM y por tanto su actividad como sensor y reparador del ADN dañado (Yuan *et al.*, 2007). Esta enzima también está implicada en la deacetilación y estabilización de la proteína del Síndrome de Werner (WRN), helicasa relacionada con la reparación de daños en el ADN (Furukawa-Hibi *et al.*, 2002). Un estudio reciente ha demostrado que en respuesta al daño oxidativo SIRT1 es reclutada a las zonas de rotura del ADN de doble hélice (DSB) en un proceso mediado por la quinasa ATM y la histona H2AX. La asociación SIRT1-DSB podría contribuir a la deacetilación por SIRT1 de histonas o factores de reparación del ADN. De hecho, se ha descrito que SIRT1 y NBS1 coexisten en los sitios de rotura (Oberdoerffer *et al.*, 2008). La observación de un incremento en las aberraciones cromosómicas y un deterioro en la reparación del ADN en embriones deficientes en el gen *Sirt1* apoya el papel de este factor como regulador de la estabilidad genómica (Wang *et al.*, 2008).

Otra de las funciones atribuidas a SIRT1 es la regulación metabólica. Esta sirtuina ha sido relacionada con el control de una gran variedad de procesos metabólicos en diferentes tejidos. Se ha descrito que SIRT1 aumenta la secreción de insulina por el páncreas en respuesta a glucosa a través de la disminución en la expresión de UCP-2 (Bordone *et al.*, 2006). En el hígado, SIRT1 induce la gluconeogénesis, inhibe la glicolisis y promueve la oxidación de ácidos grasos en cooperación con PGC-1 α (Rodgers *et al.*, 2005; Rodgers and Puigserver, 2007), mientras que en el tejido adiposo inhibe el almacenamiento de grasa e incrementa la lipólisis mediante la represión de PPAR γ (Picard *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha propuesto que las sirtuinas de mamíferos pueden jugar un papel importante en la protección celular frente a niveles elevados de ROS, así como en el control del destino de la célula ante una situación de estrés. Se ha sugerido que posiblemente esta función de SIRT1, junto con su papel en la estabilización del genoma, sea relevante para su capacidad de aumentar la longevidad de los organismos (Brunet *et al.*, 2004).

El incremento en la resistencia al estrés inducido por SIRT está mediado al menos en parte por su interacción con distintos miembros de la subfamilia FoxO de factores de transcripción. Tal y como se describe más adelante, es especialmente relevante la

interacción y deacetilación por SIRT1 del factor FoxO3a, que conduce a una inducción selectiva de los genes diana de FoxO que están implicados en la resistencia al estrés (Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004). Recientemente se ha sugerido que SIRT1 también puede proteger a las células frente al estrés mediante la regulación de la respuesta al choque térmico (Westerheide et al., 2009).

SIRT1 no sólo parece estar implicada en la estabilización de la cromatina, la detoxificación de los ROS y la reparación del daño al ADN, sino que también se ha relacionado con la inducción de mecanismos que previenen la muerte celular en respuesta a estrés. Se ha descrito que la deacetilación de p53 por SIRT1 promueve su degradación a través de una vía mediada por la ubiquitin-ligasa MDM2 e inhibe su actividad transcripcional, suprimiendo su efecto inductor de la apoptosis en respuesta a daño en el ADN y estrés oxidativo (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Aparte de p53, SIRT1 puede regular supervivencia mediante la deacetilación de otros factores implicados en el control de la apoptosis, como Ku70 (Cohen et al., 2004), E2F1 (Wang et al., 2006) y p73 (Dai et al., 2007). Asimismo, la deacetilación de FoxO3a por SIRT1 inhabilita a este factor de transcripción para la inducción de genes pro-apoptóticos (Brunet et al., 2004). Sin embargo, cabe destacar que SIRT1 no solo induce vías que antagonizan la muerte celular por estrés, ya que también es capaz de deacetilar componentes del complejo NF- κ B, lo que favorece la activación de la cascada apoptótica en estas condiciones (Yeung et al., 2004), probablemente previniendo así la supervivencia de células irreversiblemente dañadas.

Regulación de SIRT1

Mientras las funciones celulares de SIRT1 han sido ampliamente estudiadas, los mecanismos que regulan la actividad de esta sirtuina están sólo parcialmente elucidados. Como se ha comentado anteriormente, la actividad de SIRT1 aumenta considerablemente en condiciones de restricción calórica, al ser modulada por los niveles celulares de NAD⁺ (Nemoto et al., 2004). En este sentido, se ha propuesto que tanto la AMPK como la enzima multifuncional CD38 promueven la actividad de SIRT1 mediante el aumento en los niveles de NAD⁺ (Aksoy et al., 2006; Canto et al., 2009).

También se ha descrito que la proteína DBC1 (del inglés *Deleted in Breast Cancer-1*) interacciona directamente con SIRT1 e inhibe su actividad anti-apoptótica ante un estímulo de estrés, promoviendo la supervivencia de células tumorales (Kim et al., 2008).

Varios estudios sugieren que SIRT1 puede ser regulada a nivel transcripcional por FoxO3a, p53, HIC1 y E2F1 (Chen et al., 2005; Nemoto et al., 2004; Wang et al., 2006), todos ellos dianas a su vez de esta sirtuina. Se ha propuesto asimismo que el óxido nítrico puede actuar como regulador positivo de la expresión de SIRT1 en tejido adiposo blanco (WAT) (Nisoli et al., 2005).

Por último, cabe reseñar que tanto la expresión como la actividad de SIRT1 se regulan positivamente en respuesta al estrés oxidativo. Se ha descrito que el tratamiento con H₂O₂ provoca un aumento en los niveles de expresión de SIRT1 en células endoteliales (Zhang et al., 2008) y en células tubulares renales (Hasegawa et al., 2008). La actividad de SIRT1 también aumenta en respuesta al estrés. Así, se ha descrito que la exposición a agentes oxidantes promueve la deacetilación por SIRT1 de FoxO3a, lo que a su vez favorece la inducción por este factor de transcripción de genes de resistencia a estrés (Brunet et al., 2004). Asimismo, SIRT1 reprime la apoptosis dependiente de p53 en respuesta al daño en el ADN y al estrés oxidativo (Luo et al., 2001). Recientemente se ha propuesto que la activación de SIRT1 por estrés promueve la deacetilación de PGC-1 α por esta enzima, lo que induce su localización nuclear y actividad transcripcional sobre genes mitocondriales (Anderson et al., 2008).

SIRT1 en el endotelio

En los últimos años varios trabajos han puesto de manifiesto la importancia de SIRT1 como reguladora de la homeostasis endotelial. Esta deacetilasa se expresa a niveles elevados en la vasculatura durante la formación de los vasos sanguíneos, controlando la actividad angiogénica de las células endoteliales. Ratones mutantes para el gen de SIRT1 - donde el dominio deacetilasa se eliminó por escisión mediada por Cre- se caracterizan por un deterioro en la capacidad para formar nuevos vasos en respuesta a estímulos angiogénicos como el estrés isquémico (Potente et al., 2007). SIRT1 ha sido también implicada en la regulación de la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y, por tanto, en la inducción de la vasodilatación dependiente del endotelio (Mattagajasingh et al., 2007). Además, se ha descrito que SIRT1 promueve biogénesis mitocondrial en células endoteliales a través de un mecanismo que implica la inducción de la eNOS (Csiszar et al., 2009). El NO parece asimismo actuar como regulador positivo de la expresión de SIRT1 (Nisoli et al., 2005), lo que sugiere la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva entre estas dos moléculas (Potente and Dimmeler, 2008b).

De acuerdo con el papel de SIRT1 en el mantenimiento de la función endotelial, se ha demostrado que la inhibición de esta enzima mediante fármacos o la supresión de su expresión por ARN de interferencia induce fenotipos de senescencia prematura en células endoteliales (Ota et al., 2007; Ota et al., 2009). Por el contrario, la sobre-expresión de SIRT1 previene la senescencia endotelial inducida por peróxido de hidrógeno (Ota et al., 2007; Ota et al., 2008) y por condiciones de hiperglicemia (Orimo et al., 2009), sugiriendo que la activación de esta sirtuina podría ejercer un efecto protector frente a la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo y la vasculopatía diabética.

En línea con esta idea, varios trabajos han propuesto un posible papel de SIRT1 en la protección frente al desarrollo de la aterosclerosis (Brandes, 2008; Yu et al., 2009). Zhang y colaboradores han demostrado que SIRT1 inhibe la apoptosis de células endoteliales inducida por lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL). Estudios realizados en ratones transgénicos revelaron que la sobre-expresión de SIRT1 en el endotelio protege frente al daño que la dieta rica en grasa (HFD, del inglés *high-fat diet*) provoca en la vasodilatación dependiente del endotelio -en un mecanismo probablemente mediado por la inducción de la eNOS-, y reduce la formación de lesiones ateroscleróticas en respuesta a HFD en ratones ApoE^{-/-} (deficientes en la apolipoproteína E, modelo ampliamente utilizado para el estudio de la aterosclerosis) (Zhang et al., 2008). De acuerdo con estos resultados, se ha descrito que el tratamiento con el activador de SIRT1 resveratrol enlentece el desarrollo de aterosclerosis en ratones (Fukao et al., 2004; Zang et al., 2006).

SIRT1, FoxO3a y PGC-1 α

SIRT1 y los reguladores transcripcionales PGC-1 α y FoxO3a están implicados en el control de procesos comunes, como el metabolismo de la glucosa, la resistencia al estrés y la función endotelial.

Se ha descrito que SIRT1 es capaz de interactuar, deacetilar y modular la actividad transcripcional de PGC-1 α y FoxO3a sobre genes diana específicos, efecto que podría ser importante para la determinación de respuestas celulares apropiadas ante distintos tipos de estímulos.

PGC-1 α es probablemente la diana más relevante de SIRT1 en el control de la actividad metabólica. SIRT1 interactúa directamente con PGC-1 α y lo deacetila en al menos trece residuos de lisina presentes en distintos dominios de la proteína (Nemoto et al., 2005; Rodgers et al., 2005). Se ha sugerido que la interacción funcional entre PGC-1 α y SIRT1 y la subsiguiente deacetilación de PGC-1 α podría ser importante para la adaptación metabólica de tejidos específicos a las fluctuaciones de energía y la disponibilidad de nutrientes. Así, como se ha mencionado anteriormente, ambos factores parecen actuar de forma conjunta en la regulación de los procesos de gluconeogénesis y β -oxidación de ácidos grasos en el hígado en ayunas (Rodgers *et al.*, 2005; Rodgers and Puigserver, 2007) y en la oxidación de ácidos grasos mitocondrial que se produce en el músculo en respuesta a niveles bajos de glucosa (Gerhart-Hines et al., 2007). Además de deacetilarlo, se ha descrito que SIRT1 puede regular los niveles de expresión génica de PGC-1 α (Amat et al., 2009). Por todo ello, se ha propuesto que la interacción SIRT1-PGC-1 α media la respuesta celular a la restricción calórica.

Hay que señalar que otro miembro de la familia de las sirtuinas, SIRT3, ha sido relacionado previamente con PGC-1 α . La expresión ectópica de SIRT3 en adipocitos marrones induce la expresión de UCP-1, efecto que se ha propuesto está mediado por la inducción de PGC-1 α a través de la activación de CREB (Shi et al., 2005).

Por otra parte, se ha demostrado que el estrés oxidativo induce la interacción y subsiguiente deacetilación del factor FoxO3a por SIRT1 en al menos cinco residuos de lisina distintos, lo que promueve su translocación del citoplasma al núcleo. (Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004; van der Horst et al., 2004).

El papel de SIRT1 en la regulación de la actividad de los factores FoxO no está claro, ya que mientras algunos estudios sugieren que SIRT1 activa FoxO (Daitoku et al., 2004; Kobayashi et al., 2005), otros proponen que inhibe su actividad (Motta et al., 2004), o que el efecto de SIRT1 sobre FoxO depende del contexto (Brunet et al., 2004). En relación a esta última idea, se ha propuesto que SIRT1 promueve la inducción por FoxO3a de genes implicados en parada de ciclo celular y resistencia al estrés, como p27 y GADD45, mientras que inhibe la capacidad de FoxO3a para inducir genes pro-apoptóticos como Bim o Fas ligando (Brunet et al., 2004). En línea con estos resultados, se ha descrito que SIRT1 regula la resistencia al estrés oxidativo en cardiomiocitos en parte mediante la inducción de la enzima catalasa por un mecanismo dependiente de FoxO1 (Alcendor et al., 2007).

Por todo ello, se ha propuesto que la regulación diferencial que SIRT1 ejerce sobre los genes diana de FoxO3a podría promover la inducción por este factor transcripcional de respuestas de supervivencia celular frente a respuestas de muerte ante una situación de estrés oxidativo (Giannakou and Partridge, 2004).

Aparte de SIRT1, otros miembros de la familia de las sirtuinas han sido relacionados con FoxO3a y la respuesta celular al estrés. Así, se ha descrito que SIRT2 deacetila a FoxO3a en respuesta al estrés oxidativo y a la restricción calórica, y aumenta su unión al promotor de p27 (Wang et al., 2007). También se ha propuesto que SIRT3 es capaz de interaccionar con FoxO3a y promover su unión al promotor de la enzima de detoxificación MnSOD (Jacobs et al., 2008). Un estudio reciente (Sundaresan et al., 2009) ha sugerido que SIRT3 protege frente a la hipertrofia cardíaca mediante la activación de la expresión de dos dianas de FoxO3a, la MnSOD y la catalasa, y la disminución de los niveles intracelulares de ROS.

Por tanto, se ha descrito que SIRT1 puede cooperar con PGC-1 α en la regulación de diversos programas metabólicos en hígado y músculo; asimismo, esta deacetilasa modula la actividad transcripcional de FoxO3a sobre determinados genes diana implicados en la resistencia al estrés. Teniendo en cuenta que tanto SIRT1 como FoxO3a y PGC-1 α parecen estar implicados en la respuesta celular a condiciones de estrés, y dado que se ha propuesto previamente que SIRT1 es clave para la funcionalidad del endotelio vascular, nos planteamos

Introducción

la posibilidad de que esta deacetilasa pudiese actuar como moduladora de la actividad de PGC-1 α y de FoxO3a en células endoteliales, y más concretamente, en el contexto de la protección frente al estrés oxidativo.

OBJETIVOS

En el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el papel de FoxO3a en la regulación transcripcional de los genes de defensa antioxidante en el endotelio vascular.

- Determinar si el factor de transcripción FoxO3a actúa como regulador de la expresión de genes clave en la defensa antioxidante, especialmente a nivel mitocondrial, tales como MnSOD, CAT, Prx3, Prx5, Trx2, TR2 y UCP-2.
- Analizar si el efecto de FoxO3a sobre el sistema de protección frente a estrés modula los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno.
- Determinar si el factor FoxO3a endógeno es necesario para el mantenimiento de los niveles basales de expresión del sistema antioxidante en células endoteliales primarias.

2. Analizar la posible cooperación entre los reguladores transcripcionales FoxO3a y PGC-1 α en la inducción de los genes de protección frente a estrés oxidativo

- Estudiar si los factores FoxO3a y PGC-1 α son capaces de interactuar en células endoteliales primarias.
- Investigar si PGC-1 α puede funcionar como coactivador transcripcional de FoxO3a.
- Determinar si estos reguladores transcripcionales son mutuamente dependientes en la regulación de la expresión del sistema de defensa antioxidante y los niveles intracelulares de ROS.

3. Estudiar la implicación de SIRT1 en el control del programa transcripcional de respuesta a estrés oxidativo en células endoteliales

- Identificar nuevos genes de respuesta a estrés regulados por SIRT1 en el endotelio.
- Estudiar si SIRT1 es capaz de deacetilar tanto a FoxO3a como a PGC-1 α en células endoteliales primarias.
- Analizar si el efecto de SIRT1 sobre los genes de respuesta a estrés está mediado por su interacción con los factores FoxO3a y/o PGC-1 α .

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVOS CELULARES

En todos los casos las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

a. Establecimiento de cultivos primarios

- Las *células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)* se aislaron a partir de cordones umbilicales según se ha descrito previamente (Jaffe et al., 1973). Brevemente, se introdujo una cánula en la vena umbilical del cordón y, tras lavado con solución salina, se incubó con colagenasa tipo IA (Invitrogen) al 0,1% en PBS durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, las células endoteliales desprendidas se recogieron en solución Hank's (Sigma), se centrifugaron y se resuspendieron en medio M199 (Gibco) suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS, Gibco), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Biowhittaker) y 50 µg/ml de factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF, preparado en el laboratorio). Las células se cultivaron en placas previamente gelatinizadas (0,2% en PBS, Sigma) y se utilizaron en pase 3-5.
- Las *células endoteliales de aorta bovina (BAEC)* se obtuvieron a partir de aortas torácicas de vaca siguiendo un protocolo similar al descrito para las HUVEC. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina. Se emplearon células en pase 3-6.
- Las *células endoteliales de aorta de ratón (MAEC)* se aislaron a partir de la aorta torácico-abdominal murina según protocolos previamente descritos (Suh et al., 1999). En resumen, la aorta extraída se limpió y fragmentó en secciones de aproximadamente 1 mm de longitud que se embebieron en matrigel (Matrigel Basement Membrane Matrix, BD Biosciences). Tras incubación 30 minutos a 37 °C, se añadió medio DMEM-F12 (Biowhittaker-Cambrex) suplementado con 20% de suero fetal bovino, 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina y 100 µg/ml de ECGF, de forma que cubriese totalmente el matrigel con las aortas. Tras varios días de cultivo, las células crecidas a partir de las secciones de aorta se extrajeron del matrigel mediante incubación con BD Cell Recovery Solution (BD Biosciences) durante 1 hora a 4°C y posterior centrifugación. Las células obtenidas se crecieron en placas gelatinizadas (0,2% en PBS) y, una vez confluentes, se purificaron mediante separación magnética con Dynabeads (DYNAL Biotech) utilizando el anticuerpo anti-PECAM-1 (CD31) de BD Biosciences, en dilución 1:300. En los experimentos se emplearon MAEC en pase 3-6.

- Los *fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)* se obtuvieron a partir de embriones de 12,5-13,5 días de desarrollo. Tras separar los embriones de la placenta y lavarlos con solución salina, se eliminaron la cabeza y los tejidos no fibroblásticos; el resto del cuerpo se fraccionó y se incubó en tripsina (0,25% 1mM EDTA, Gibco) a 37°C durante 45 minutos, resuspendiendo cada 15 minutos para disgregar el tejido. La suspensión resultante se diluyó en medio DMEM (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina, y se sembró en placas de cultivo. A las 24 horas se renovó el medio para eliminar los restos celulares derivados del proceso de aislamiento. Las células MEF se utilizaron en pase 2-5.

Los fibroblastos embrionarios procedentes de ratones deficientes en el gen FoxO3a (FoxO3a^{-/-}) fueron donados por la Dra. K. Arden (Hosaka et al., 2004).

b. Líneas celulares

Las *células HEK-293A* (células embrionarias humanas de riñón, Invitrogen) se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina.

ANIMALES

Se utilizaron ratones C57BL/6 (cepa silvestre, WT o PGC-1 α ^{+/+}) y ratones deficientes en el gen PGC-1 α (KO o PGC-1 α ^{-/-}), cedidos generosamente por el Dr. B. Spiegelman (St-Pierre et al., 2006).

Los protocolos utilizados para la manipulación de los animales están de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) (número de publicación 85-23).

AISLAMIENTO DE ARN TOTAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN A ADNc

Para el aislamiento del ARN total de células se usó el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo un protocolo basado en las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron con TRIzol. A continuación, mediante la adición de cloroformo (MERCK) seguida de centrifugación, se separó la solución en dos fases, recuperando el ARN de la fase acuosa por precipitación con alcohol isopropílico (Sigma-Aldrich). Tras lavado con etanol al 70% (MERCK), el ARN extraído se resuspendió en agua

libre de RNAsas. Posteriormente se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop) y se comprobó su pureza y calidad mediante electroforesis en gel de agarosa.

La retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 1 µg de ARN total previamente calentado 2 minutos a 72°C. Se usó la transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase, Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial, utilizando hexámeros no específicos como oligonucleótidos iniciadores (GE Healthcare).

La cantidad relativa de ADNc se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR).

RT-PCR CUANTITATIVA

El análisis cuantitativo de la expresión génica se realizó mediante qRT-PCR en Sistemas de Detección de Secuencia (SDS) 7900 y 7900FAST de Applied Biosystems.

Para la mayor parte de los genes estudiados, se diseñaron oligonucleótidos específicos que fueron sintetizados por Isogen o por Invitrogen (ver Tabla 1), utilizándose para la reacción SYBR Green I Dye (SYBR Green master Mix 2X, Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 minutos (min.) a 50°C, 10 min. a 95°C, y 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 55-60°C y 30 s a 72°C.

Para algunos genes se emplearon sondas comerciales Taqman (ver Tabla 2). En estos casos la amplificación se llevó a cabo con TaqMan Master Mix 2X (Applied Biosystems) en las mismas condiciones.

Los datos fueron analizados con el programa *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) por el método de la cuantificación relativa por comparación de C_T (*threshold cycle*, umbral de detección establecido). Para la normalización de los niveles de expresión del gen de interés se utilizó como control el gen constitutivo 18S (18S rRNA VIC-MGB, Applied Biosystems).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR, diseñados para secuencias de humano (h), ratón (m) o vaca (b)

GEN DIANA	OLIGO DIRECTO	OLIGO REVERSO
PGC-1 α	5'-ggcagtagatcctcttcaagatc-3'	5'-tcacacggcgctcttcaattg-3'
hmMnSOD	5'-tggccaagggagatgtgttac-3'	5'-cagcaactctcctttgggttc-3'
bMnSOD	5'-ggaacaacaggtcttatccccct-3'	5'-ttacttgctgcaagccgtgtatc-3'
hmCAT	5'-attgccggccacctgaagga-3'	5'-cttgtccagaagagcctggat-3'
mCAT	5'-catgcatgacaaccagggtgtg-3'	5'-gaattgcgttcttaggcttctca-3'
hPrx3	5'-cctttggatttcacctttgtgtg-3'	5'-ccaatcaaggtggagatgcc-3'
mPrx3	5'-tctggtcctcggttgctcgt-3'	5'-gtggaagaggaactggtgct-3'
Prx5	5'-ccaatcaaggtgggagatgcc-3'	5'-gcaggtgtgtcttggaaatc-3'
mPrx5	5'-ccaatcaaggtgggagatgcc-3'	5'-ccaggcacttagaacagcca-3'
bmtTrx2	5'-cagggagatggctcagcga-3'	5'-gaccacaccattgtgcatgga-3'
bTR2	5'-tgcaggacaggaaagtcaagta-3'	5'-caaggcaccttcgatgtgcgt-3'
hUCP-2	5'-tacaagccggattccggcagc-3'	5'-ctccttgatctgtaaccggac-3'
mUCP-2	5'-cagttctacaccaagggctcag-3'	5'-catggagaggctcagaaggtgc-3'
bUCP-2	5'-cggctacagatccaaggagaa-3'	5'-ccgatgccagatgctcaga-3'
hmFoxO3a	5'-ccggctggaagaactccatc-3'	5'-catcagggttgatgatccaccaag-3'
hmSIRT1	5'-ccattctcaagtttgcaaagga-3'	5'-tgcaaaggaacctgacactga-3'

Tabla 2. Oligonucleótidos comerciales (Sondas Taqman) utilizados para qRT-PCR

GEN DIANA	SONDA	PROVEEDOR
18S	18S rRNA pre-developed Endogenous Control, VIC-MGB	Applied Biosystems
hTR2	Hs00272352_m1, 50290330_A	
mTR2	Mm00496771_m1, 73717G4	

INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Las condiciones experimentales utilizadas para ChIP fueron las previamente descritas (Valle et al., 2005). En resumen, las células se fijaron con una solución de formaldehído al 1% (Fluka) durante 15 min. Después se lavaron, recogieron y resuspendieron en una solución hipotónica (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS e inhibidores de proteasas). A continuación las muestras se sometieron a sonicación para fragmentar el ADN. La preparación de cromatina obtenida se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C y en agitación orbital. Los complejos proteína-ADN se recogieron mediante incubación durante 2,5 horas a temperatura ambiente con proteína A/G-Agarosa (Santa Cruz) y posterior centrifugación. A continuación se trató con

pronasa (Roche) durante a 1 hora a 42°C y después se incubó 5 horas a 65°C para revertir las uniones proteína-ADN. Por último, el ADN inmunoprecipitado se aisló mediante fenolización y se analizó por qRT-PCR usando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para ChIP

GEN DIANA	OLIGO DIRECTO	OLIGO REVERSO
CAT	5'-gctgtgtaactttgggcaagtatt-3'	5'-cctcccaacaaccctatgagttag-3'
MnSOD	5'-gacttttgccttccccttgc -3'	5'-gatgcaggctttctgtcttcaa -3'
Prx3	5'-acagaagccggaagtctctacct-3'	5'-tcccactgttttgtaaccttgg-3'
Prx5	5'-tgcattgctctcagaaactcct -3'	5'-gagataatttggcctcttggc-3'
Trx2	5'-gcaaatccaaaccacggg-3'	5'-ccctagaggaggaccggaag-3'
UCP-2	5'-gcaggcctttgcatctgttct-3'	5'-tagcttttgcgctgagctctg-3'
β-actina	5'-cacctccagcagatgtgga-3'	5'-agcatttgcggtggacgatgg-3'
PGC-1α	5'-aaaataggagccgggaatcaaag-3'	5'-ataaggagaacaagccacaaaacc-3'

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES TOTALES E INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT)

Para la obtención de los extractos celulares totales las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron en presencia de una solución de 20 mM HEPES pH 7,9, 125 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 5 mM β-glicerolfosfato, 0,2 mM NaV, 0,2 mM NaF, 10 mM NaP e inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma).

Las muestras de proteínas obtenidas se cuantificaron por colorimetría mediante una modificación del método de Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay). Posteriormente, 20-25 µg de proteína desnaturalizada se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Hybond™-P (Amersham Biosciences). Con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios o secundarios a las membranas, éstas se bloquearon durante 1 hora en leche al 5% en Tris Buffer Salino con 0,1% de Tween 20 (TBS-T). A continuación, se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos de las proteínas de interés (Tabla 4). Tras lavar las membranas tres veces con TBS-T, se realizó la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP-conjugados) (Tabla 5), durante 45 min. a temperatura ambiente. Después se realizaron otros tres lavados con TBS-T de 10-15 min. cada uno. El revelado se llevó a cabo mediante el sistema de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Biosciences) y la exposición de películas autorradiográficas (AGFA).

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados para inmunodetección (WB) e inmunoprecipitación de proteínas (IP)

ANTÍGENO	FUENTE	PROVEEDOR	DILUCIÓN	
			WB	IP
PGC-1 α	Conejo	Santa Cruz (H-300)	1:200	1:20
		Cayman Chemical	1:200	
FKHRL1 (FoxO3a)	Conejo	Santa Cruz (H-144)	1:1000	1:100
		Cell Signaling	1:1000	
		Millipore	1:500	1:50
Trx2	Conejo	LabFrontier	1:500	
TR2	Conejo	LabFrontier	1:500	
Prx3	Conejo	LabFrontier	1:2000	
Prx5	Ratón	BD Biosciences	1:1000	
	Conejo	Santa Cruz (FL-214)	1:200	
Catalasa	Conejo	Chemicon International	1:1000	
MnSOD	Conejo	Stressgen	1:5000	
UCP2	Cabra	Santa Cruz (C-20)	1:500	
	Conejo	BioLegend	1:500	
SIRT1	Conejo	Santa Cruz (H-300)	1:200	
Lisina acetilada (Ac-Lys)	Conejo	Cell Signaling	1:1000	
β -actina	Ratón	Sigma	1:1000	
HA	Ratón	Hibridoma 12CA5	1:20	1:2

Tabla 5. Anticuerpos secundarios HRP-conjugados utilizados para WB

ANTICUERPO	FUENTE	PROVEEDOR	DILUCIÓN
IgG de ratón	Oveja	GE-Healthcare	1:4000
IgG de conejo	Burro	GE-Healthcare	1:4000
IgG de cabra	Burro	Santa Cruz Biotechnology	1:4000

INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS (IP)

Las células resuspendidas en solución de lisis (20 mM HEPES pH 7,9, 125 mM NaCl, 0,1% NP-40, 1 mM EDTA, 5 mM β -glicerolfosfato, 0,2 mM NaV, 0,2 mM NaF, 10 mM NaP e inhibidores de proteasas) se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación rápida en nitrógeno líquido, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron para eliminar los restos celulares, conservando el sobrenadante. Para las inmunoprecipitaciones (IPs) se utilizó 1 mg de proteína, que se incubó con el anticuerpo correspondiente durante toda la noche a 4°C y en agitación orbital (ver diluciones utilizadas en la Tabla 4). Tras la adición de proteína A/G-Agarosa (Santa Cruz) y posterior incubación dos horas a temperatura ambiente, los inmunocomplejos se recogieron por centrifugación, se lavaron tres veces con PBS frío y

finalmente se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE, siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la detección de proteínas por Western Blot.

Como anticuerpo control para las inmunoprecipitaciones se usó la Inmunoglobulina G (IgG) normal de conejo o de ratón de Santa Cruz.

ENSAYOS DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS *IN VITRO*

Las proteínas de fusión GST-PGC-1 α (GST, Glutation S-transferasa) se generaron mediante el clonaje de distintos dominios de la proteína PGC-1 α (aminoácidos 1-186, 1-350, 350-580 y 561-797) entre los sitios XhoI y NotI del vector de expresión pGEX-6P-2 (GE Healthcare). Estas proteínas se expresaron en bacterias *E.coli* BL21DE3 y se purificaron mediante cromatografía en columnas de afinidad de glutation-agarosa (GE Healthcare).

Mediante el sistema TNT de transcripción y traducción *in vitro* (Promega), se generaron proteínas FoxO3a marcadas radioactivamente con metionina[S³⁵]. El vector utilizado contiene el ADNc de FoxO3a bajo el control del promotor T7 y ha sido descrito previamente (Anderson et al., 1998). Las proteínas FoxO3a-S³⁵ se incubaron con 1 μ g de las proteínas de fusión GST-PGC-1 α previamente inmovilizadas sobre bolas de glutation-agarosa. La mezcla se incubó 1 hora a temperatura ambiente en tampón de unión (20 M Tris-HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 2 mM ditiotretitol, 0.1-0.4% NP-40, 100 mM KCl). Tras varios lavados, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles SDS-PAGE y visualizadas mediante autorradiografía.

VECTORES ADENOVIRALES

a. Vectores adenovirales utilizados

- Ad-FoxO3a-WT: Este vector, donado por el Dr. K. Walsh (Skurk et al., 2004), contiene la secuencia humana de FoxO3a *wild-type* unida al péptido de hemaglutinina (HA) bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), además de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de un promotor CMV independiente (Fig. 10).
- Ad-FoxO3a-TM: Vector, también cedido por el Dr. K. Walsh (Skurk et al., 2004), que permite la expresión de una forma constitutivamente activa de la proteína FoxO3a, ya que los tres sitios susceptibles de fosforilación por Akt, Thr-32, Ser-253 y Ser-315, están sustituidos por residuos de alanina. Contiene la secuencia humana de FoxO3a y la de la proteína GFP bajo el control de promotores CMV independientes (Fig. 10).

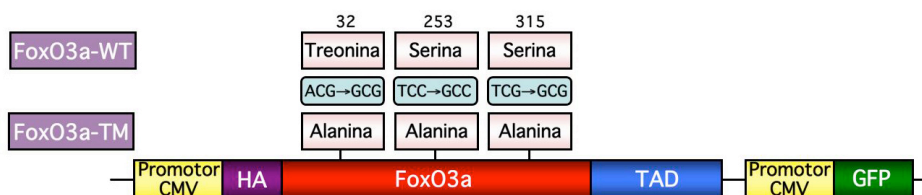


Figura 10. Estructura de los vectores adenovirales de FoxO3a utilizados. El esquema muestra la estructura de los vectores adenovirales que expresan la forma *wild-type* (FoxO3a-WT) o la forma constitutivamente activa de FoxO3a (FoxO3a-TM). Las sustituciones de nucleótidos realizadas para obtener el mutante no fosforilable están indicadas. Las proteínas transgénicas están marcadas con hemaglutinina (HA). Los vectores expresan además la proteína verde fluorescente (GFP). TAD: Dominio de transactivación.

- Ad-PGC1 α : El adenovirus recombinante de sobre-expresión de PGC-1 α ha sido descrito previamente (Valle et al., 2005). Contiene, bajo el control del promotor CMV, la secuencia murina de PGC-1 α unida en el extremo N-terminal a tres copias de HA.
- Ad-GFP-PGC1 α : Este vector, procedente del laboratorio del Dr. M. Montminy (Herzig et al., 2001), co-expresa PGC-1 α murino y GFP bajo el control de dos promotores CMV independientes.
- Ad-SIRT1: El vector adenoviral empleado para la sobre-expresión de SIRT1, cedido por el Dr. Francesc Villarroya, también ha sido referido con anterioridad (Amat et al., 2007). Contiene la secuencia murina de SIRT1 bajo el control del promotor CMV.

Los vectores adenovirales descritos fueron generados según el método detallado en (He et al., 1998). Esta técnica se basa en el clonaje del ADNc de interés en un vector Shuttle (en estos casos se utilizaron pAdTrack-CMV y pShuttle-CMV) y posterior recombinación homóloga entre el vector generado y un vector adenoviral Backbone (pAd-Easy-1) mediante co-transformación de ambos plásmidos en bacterias *Escherichia coli* (*E.coli*) BJ5183. Para la generación de las partículas virales, el vector adenoviral resultante se transfecta en células empaquetadoras HEK-293A.

- Ad-shRNAs: Los adenovirus que permiten la expresión de ARNs de interferencia (shRNAs) se generaron utilizando el *pSilencer™ Adeno 1.0 Cytomegalovirus (CMV) Promoter System* de Ambion. En resumen, se diseñaron oligonucleótidos de ADN directos y reversos que codifican un shRNA específico para nuestro gen de interés (Tabla 6). Los insertos de shRNA, generados por hibridación y ligación de dichos oligonucleótidos, se clonaron en el vector Shuttle 1.0 CMV linealizado. Con los productos de ligación se transformaron bacterias *E.coli* DH5 α y se obtuvieron

preparaciones plasmídicas de los clones para comprobar la presencia del inserto por PCR y verificar su correcta orientación y ausencia de mutaciones por secuenciación. A continuación se comprobó su capacidad para inducir interferencia del ARN mediante transfección en células que expresan el gen de interés y posterior análisis de la disminución en la expresión de dicha diana tanto a nivel de ARN como de proteína. Finalmente, las partículas virales se generaron por recombinación de los vectores Shuttle 1.0 CMV-shRNA y *Adenoviral LacZ Backbone* mediante co-transfección en células HEK-293A.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la generación de adenovirus de expresión de shRNAs

OLIGO	DIRECTO	REVERSO
shPGC-1 α	5'tcgagttcatggagcaataaagcgttcaagaga cgctttattgctccatgaatta-3'	5'ctagtaattcatggagcaataaagcgtctcttga acgctttattgctccatgaac-3'
shFoxO3a	5'tcgaggagctcttggtgatcatcttcaagaga gatgatccaccaagagctctta-3'	5'ctagtaagagctcttggtgatcatctcttga agatgatccaccaagagctcc-3'
shControl	5'tcgagcaccacagagctgccatccttcaagaga ggatggcagctctgtggtgta-3'	5'ctagtaacaccacagagctgccatcctctcttg aaggatggcagctctgtggtgc-3'

b. Obtención de preparaciones de adenovirus y titulación

En todos los casos se emplearon adenovirus no-replicativos que se amplificaron en la línea celular HEK-293A, que expresa constitutivamente los elementos E1 virales, suprimidos en este tipo de vectores. La expansión se llevó a cabo mediante infección sucesiva de un número creciente de placas de 293A. Una vez observados los efectos citopáticos, las células se recogieron, centrifugaron y resuspendieron en PBS. A continuación, se lisaron para liberar los virus mediante tres ciclos consecutivos de congelación rápida en nieve carbónica, descongelación a 37°C y agitación vigorosa. Finalmente, se centrifugó para eliminar los restos celulares, obteniéndose una suspensión de partículas virales.

La concentración de las suspensiones virales obtenidas se determinó por el método de titulación en placa sobre células 293A. Brevemente, células en confluencia se infectaron con diluciones seriadas de la suspensión del virus y se mantuvieron en cultivo durante 15 días. Transcurrido este tiempo, se realizó un recuento del número de halos de lisis formados con las distintas diluciones, lo que permitió determinar el número de partículas virales activas presentes en la preparación original. En general se obtuvieron títulos del orden de 10¹¹PFU/ml. (PFU, partículas virales infecciosas, del inglés *plaque-forming units*).

c. Protocolo de infección

Las células HUVEC, MAEC, BAEC y MEF se infectaron con los adenovirus descritos anteriormente a una multiplicidad de infección (moi) de 1-50 durante 12-16 horas, salvo en el caso del Ad-FoxO3a-TM, con el que se realizaron infecciones de 6 horas. Tras la infección se lavó con PBS y se renovó el medio de cultivo; transcurridas 24 ó 48 horas, según el experimento y el adenovirus utilizado, las células se recogieron para realizar los ensayos correspondientes (análisis de los niveles de ARNm, proteína, ROS, etc).

En todos los experimentos se comparó el efecto del adenovirus de expresión de la proteína de interés con el de un adenovirus control: para los ensayos con los vectores adenovirales de FoxO3a-WT, FoxO3a-TM y GFP-PGC1 α se utilizó el correspondiente adenovirus que expresa únicamente el transgen GFP (Ad-GFP); el vector adenoviral vacío Ad-Shuttle se usó como control del Ad-PGC1 α y del Ad-SIRT1; y como referencia para las infecciones con Ad-shFoxO3a y Ad-shPGC-1 α se usó un adenovirus que expresa un ARN de interferencia control (Ad-shControl).

TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

Las transfecciones de ADN se realizaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en células a un 70-80 % de confluencia. Brevemente, se prepararon diluciones de ADN y de Lipofectamina 2000 en medio Opti-MEM I sin suero (Invitrogen). Después de 5 minutos de incubación, se mezclaron ambas diluciones y tras agitación suave se incubó 20 minutos a temperatura ambiente para la formación de los complejos de ADN-Lipofectamina (relación 1 μ g :2 μ l). A continuación se añadió la mezcla con los complejos a los pocillos con las células en medio sin antibiótico. Tras incubación durante 4-6 horas a 37° C, las células se lavaron con PBS y se añadió medio fresco completo.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

Para la medida de la actividad luciferasa se empleó el sistema Dual-luciferase Reporter Assay System de Promega, siguiendo las instrucciones del proveedor. La cuantificación se realizó transcurridas 24 horas desde la transfección de los plásmidos correspondientes, en un luminómetro Orion Microplate (Berthold Detection Systems).

MUTAGÉNESIS DIRIGIDA SOBRE EL PROMOTOR DE LA MnSOD

La mutación puntual en el sitio de unión para FoxO del promotor de *sod2* (DBE, posición -1330), se introdujo con el kit Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis de Stratagene.

Los oligonucleótidos empleados fueron los siguientes:

- Sod2m1/f: 5'-cttctgacgtctgtaa**aaGaag**cccagcccttcc-3'

- Sos2m1/r: 5'-ggaagggctggg**cttCtt**ctttacagacgtcagaag-3'

La sustitución de un único nucleótido (Citosina por Guanina) en la secuencia AAACAA del DBE imposibilita el reconocimiento del sitio por parte de FoxO3a, según se ha descrito previamente (Kops et al., 2002a).

ANÁLISIS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Los niveles celulares de ROS se determinaron mediante citometría de flujo usando dos fluorocromos distintos.

En un primer método las células se marcaron con 5-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetyl ester (CM-H₂DCFDA, Molecular Probes). Las células se incubaron con CM-H₂DCFDA 2 μM (diluido en el medio de cultivo) durante 30 min. a 37°C; después se tripsinizaron, centrifugaron y resuspendieron en PBS para analizar posteriormente la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. En el caso de células infectadas con adenovirus que expresan la proteína GFP, y para evitar posibles interferencias con la señal del CM-H₂DCFDA, se determinó la señal correspondiente únicamente a GFP y se restó de la señal total obtenida con el CM-H₂DCFDA.

En un segundo método las células se marcaron con dihidrorodamina 6G (DhR6G, Molecular Probes). Tras el correspondiente ensayo, las células se tripsinizaron, centrifugaron y resuspendieron en PBS. A continuación se incubaron con DhR6G 1 μM durante 15 min. a temperatura ambiente, para posteriormente analizarlas en el citómetro de flujo. Con el fin de controlar posibles variaciones en la señal de la DhR6G debidas a cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), éste se monitorizó mediante marcaje de parte de las células con tetrametilrodamina metil ester (TMRM, Molecular Probes). Para ello, las células se incubaron en PBS con TMRM 5 nM durante 30 min. a 37°C antes de analizar la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el test de Student (t-test), el análisis de la varianza (ANOVA) o test no paramétricos, según los casos. Los valores de probabilidad (p) iguales o inferiores a 0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independiente.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL PAPEL DE FOXO3A EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES DE LA DEFENSA ANTIOXIDANTE EN EL ENDOTELIO.

FoxO3a regula la expresión del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial en HUVEC

Diversos trabajos sustentan la hipótesis de que el factor de transcripción FoxO3a es un mediador de la respuesta celular a situaciones de estrés. Hay que resaltar que FoxO3a ha sido descrito como regulador transcripcional directo de los genes de tres enzimas clave del sistema de defensa antioxidante, la MnSOD, la catalasa y la Prx3, así como de otros genes que promueven la supervivencia de la célula ante un estímulo de estrés (Chiribau *et al.*, 2008; Kops *et al.*, 2002a; Nemoto and Finkel, 2002).

Por otra parte, en los últimos años varios estudios han mostrado que la actividad de FoxO3a es particularmente relevante para la regulación de la función endotelial, modulando los procesos de angiogénesis y el remodelado vascular (Paik *et al.*, 2007; Potente *et al.*, 2005).

En base a estas observaciones, y dado nuestro interés en el estudio de los mecanismos que regulan la defensa frente al exceso de ROS en el endotelio vascular, nos propusimos estudiar el papel de FoxO3a en la regulación transcripcional de los genes de protección frente a estrés oxidativo en células endoteliales primarias.

En primer lugar, decidimos evaluar el efecto de FoxO3a sobre los niveles de expresión del sistema de defensa antioxidante. Para ello, se infectaron células HUVEC con un adenovirus que dirige la expresión de una forma constitutivamente activa de FoxO3a (Ad-FoxO3a-TM) o con un adenovirus control (Ad-GFP). Posteriormente se analizaron los niveles de ARNm y proteína de los distintos componentes del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial mediante qRT-PCR y Western Blot, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 11, se observó que FoxO3a-TM inducía la expresión de todos los genes de protección frente a ROS estudiados, incluyendo tanto factores que ya habían sido descritos previamente como dianas de FoxO3a (MnSOD, CAT y Prx3), como dianas no caracterizadas con anterioridad (Prx5, Trx2, TR2 y UCP-2) (Fig. 11.A). En todos los casos el incremento en la expresión génica inducido por la forma constitutivamente activa de FoxO3a se tradujo en el correspondiente aumento en los niveles de proteína (Fig. 11.B).

Dado que el coactivador transcripcional PGC-1 α ha sido descrito previamente por nuestro grupo y otros como un regulador general del sistema de detoxificación mitocondrial

y de la homeostasis de los ROS (St-Pierre et al., 2006; Valle et al., 2005), consideramos relevante determinar si FoxO3a estaba implicado asimismo en la modulación de los niveles de expresión de este factor. Como se puede observar en la Figura 11 (A y B), la expresión de FoxO3a-TM causó un aumento significativo en los niveles tanto de ARNm como de proteína PGC-1 α .

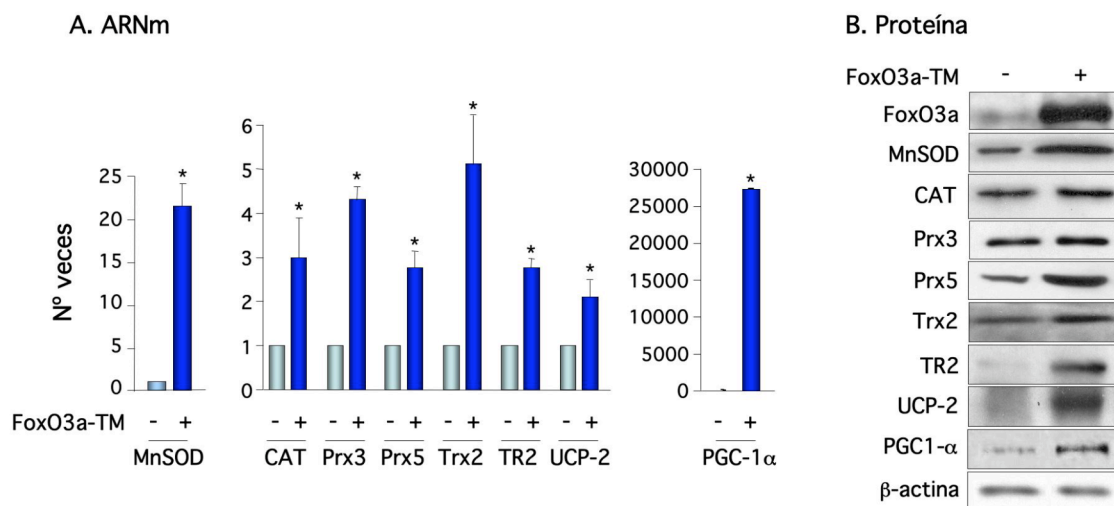


Figura 11. FoxO3a regula el sistema de protección frente a estrés oxidativo en HUVEC. Células HUVEC se infectaron durante 6 horas con Ad-FoxO3a-TM o Ad-GFP como control. Transcurridas 48h desde la infección, se recogieron las células para el aislamiento de ARN o la obtención de extractos totales de proteínas. **(A)** Los niveles de ARNm de los genes de detoxificación de ROS se analizaron por qRT-PCR, usando como normalizador el ARNr 18S. Se representa la media \pm la desviación estándar respecto a los valores obtenidos para las células control, a los que se asignó el valor arbitrario de 1. (*) $p \leq 0,05$ vs. control. **(B)** Análisis por Western Blot de los niveles de proteínas del sistema de defensa antioxidante. Se usó la expresión de la β -actina como control de carga.

Los resultados obtenidos sugieren que FoxO3a actúa como regulador positivo de la expresión de un conjunto de proteínas que participan en la defensa frente al estrés oxidativo celular. El hecho de que FoxO3a induzca la expresión del factor PGC-1 α plantea la posibilidad de que la actividad de FoxO3a sobre el sistema de protección frente a los ROS pueda estar mediada bien por un efecto directo de este factor de transcripción sobre los genes estudiados, bien por un mecanismo de tipo indirecto a través de la modulación de los niveles de PGC-1 α , o ambos. Para tratar de dilucidar esta cuestión empezamos por analizar si FoxO3a regula la expresión de los genes antioxidantes de forma directa a través de la unión a sus regiones promotoras.

FoxO3a se asocia directamente a las regiones promotoras de los genes de la defensa antioxidante

Con el fin de determinar si los genes de protección frente a estrés cuya expresión parecía estar regulada por FoxO3a eran dianas directas de este factor de transcripción, estudiamos si FoxO3a era capaz de unirse directamente a las regiones promotoras de dichos genes mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

En estos ensayos se utilizaron células HUVEC infectadas con el Ad-FoxO3a-TM o el Ad-GFP como control. A partir de estas células se obtuvieron preparaciones de cromatina que se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a FoxO3a, o con IgG normal (no inmunizada) como control. Posteriormente, se analizó la presencia en los inmunoprecipitados de las regiones promotoras de los distintos genes de detoxificación mediante RT-PCR cuantitativa. Para ello se utilizaron oligonucleótidos dirigidos contra regiones del promotor que, o bien son ricas en sitios de unión de factores de transcripción, o bien contienen secuencias similares a las descritas para la unión de los factores FoxO.

En las células infectadas con el adenovirus control Ad-GFP no fue posible detectar enriquecimientos significativos en ninguno de los fragmentos analizados en las condiciones del estudio (20% FBS) (datos no mostrados). Sin embargo, y como se observa en la Figura 12, en las muestras obtenidas a partir de células que expresaban FoxO3a-TM e inmunoprecipitadas con el anticuerpo específico frente a FoxO3a, se detectó un enriquecimiento en las regiones promotoras analizadas de CAT, Prx3, MnSOD, Prx5, Trx2, UPC-2, así como en el promotor de PGC-1 α . No fue posible determinar la asociación de FoxO3a al promotor de la enzima TR2, ya que en este caso no se pudieron obtener oligonucleótidos específicos contra las regiones reguladoras mencionadas que dieran lugar a buenas amplificaciones por qRT-PCR.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos de ChIP sugieren que la regulación que FoxO3a ejerce sobre la expresión de los genes de detoxificación de ROS está mediada por su asociación directa a las regiones promotoras de dichos genes. No obstante, no se puede descartar que parte del efecto observado para FoxO3a se deba a un aumento en los niveles del coactivador PGC-1 α , que según los ensayos realizados es también una diana directa de regulación por FoxO3a.

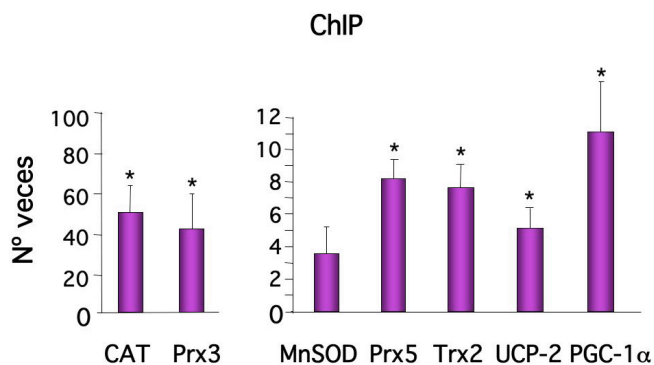


Figura 12. Localización de FoxO3a en las regiones promotoras de los genes de protección frente a estrés. Células HUVEC se infectaron durante 6 horas con Ad-FoxO3a-TM. Tras 48 h, se llevaron a cabo ensayos de ChIP frente a FoxO3a. Los valores muestran el grado de enriquecimiento de una secuencia determinada en el inmunoprecipitado de FoxO3a respecto al control de IgG. (*) $p \leq 0,05$ vs. control. Se usaron oligonucleótidos contra el gen de la β -actina como control negativo de enriquecimiento.

FoxO3a reduce los niveles intracelulares de ROS

Los resultados obtenidos sugerían que FoxO3a actúa modulando positivamente la expresión de una serie de factores implicados en la defensa frente al estrés oxidativo, incluyendo tanto enzimas que detoxifican los ROS generados a nivel mitocondrial, como la proteína desacoplante UCP-2, que disminuye la producción de O_2^- . En base a estos datos, decidimos evaluar qué efecto tenía la expresión de FoxO3a sobre los niveles intracelulares de ROS en células endoteliales.

Con este fin, se infectaron células HUVEC con el Ad-FoxO3a-TM o el Ad-GFP como control, y posteriormente se determinaron los niveles de ROS mediante citometría de flujo usando los indicadores fluorescentes dihidrorodamina 6G (DhR6G) y 5-clorometil-2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester (CM- H_2 DCFDA).

La DhR6G es un compuesto que se utiliza para monitorizar la producción celular de ROS. La captación por las células vivas y posterior oxidación de este sustrato incoloro da lugar a la formación del compuesto fluorescente rodamina 6G, cuantificable por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 13.A, la intensidad de fluorescencia detectada tras el marcaje de las células con este fluorocromo fue significativamente menor en las HUVEC que expresaban FoxO3a-TM que en las HUVEC control, lo que sugiere una menor acumulación de especies reactivas de oxígeno en estas células.

Dado que la DhR6G es sensible a cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), éste se monitorizó mediante marcaje de parte de las células con tetrametilrodamina metil ester (TMRM), compuesto cuya acumulación en la mitocondria es proporcional al $\Delta\Psi_m$, lo que implica un cambio en su espectro de emisión de fluorescencia. Como se puede observar en la Figura 13.B, la expresión de FoxO3a-TM indujo un aumento en la señal del TMRM, excluyendo así que la reducción observada en la intensidad de fluorescencia emitida por la DhR6G fuese consecuencia de una disminución en el potencial de membrana mitocondrial.

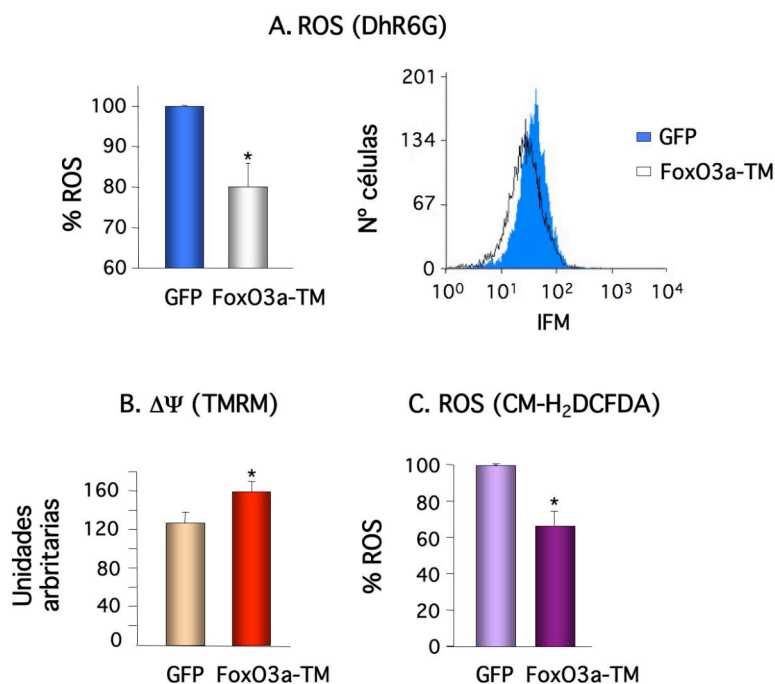


Figura 13. La expresión de FoxO3a-TM reduce la acumulación de ROS en la célula. Células HUVEC se infectaron durante 6 horas con Ad-FoxO3a-TM o Ad-GFP como control. Tras 48 h, se determinó el contenido intracelular de ROS (**A y C**) o el $\Delta\Psi_m$ (**B**) mediante citometría de flujo. Las células se marcaron con DhR6G 1 μ M, 15 min. a temperatura ambiente (**A**), con TMRM 5 nM, 30 min. a 37°C (**B**), o con CM-H₂DCFDA 2 μ M, 30 min. a 37°C (**C**). Los valores obtenidos se representan en porcentajes, asignando a las células control (GFP) el valor de 100% (**A [panel izquierdo] y C**), o en unidades arbitrarias (**B**). Las barras de error representan las medias \pm las desviaciones estándar; (*) $p \leq 0,05$ vs. control. (**A, panel derecho**) Curva representativa de análisis por citometría de flujo de la cuantificación de los niveles de ROS en células marcadas con DhR6G.

Para confirmar el resultado obtenido con la DhR6G, se realizó un experimento similar marcando las células con el fluorocromo CM-H₂DCFDA, compuesto que se vuelve fluorescente tras la oxidación celular y la actuación de esterasas intracelulares que retiran los grupos acetato de su estructura. En este caso también se detectó una menor intensidad de fluorescencia, y por consiguiente, unos menores niveles de ROS, en las células infectadas con el Ad-FoxO3a-TM en comparación con las células control (Fig. 13.C).

Los experimentos de citometría de flujo realizados mostraron una menor acumulación de especies reactivas de oxígeno en células que expresan FoxO3a-TM, lo que sugiere que en estas condiciones puede que esté aumentada la capacidad de detoxificación de los ROS y/o reducida la producción de los mismos. Este resultado concuerda con el efecto observado para FoxO3a como regulador positivo de la expresión de las enzimas de la defensa antioxidante, apoyando la hipótesis de que este factor juega un papel importante en el control de la homeostasis de los ROS en la célula endotelial.

FoxO3a endógeno es necesario para el mantenimiento de los niveles basales del sistema de protección frente a ROS en el endotelio

Hasta ahora, los experimentos de expresión de FoxO3a-TM nos habían permitido identificar a FoxO3a como un posible modulador del programa transcripcional de defensa frente al estrés y de la homeostasis de los ROS en células del endotelio vascular. A continuación decidimos determinar si la presencia de la proteína FoxO3a endógena es necesaria para el mantenimiento de los niveles normales de expresión de los genes de protección frente a estrés oxidativo, o si su actividad puede ser complementada por alguno de los otros factores FoxO presentes en el endotelio (FoxO1, FoxO4).

Con este fin se silenció la expresión de FoxO3a en células HUVEC mediante infección con un adenovirus que expresa un ARN de interferencia específico para FoxO3a (shFoxO3a), o con un adenovirus control (shControl). Posteriormente las células se sometieron a privación de suero (0,5% de FBS) durante 12-16 horas, condiciones en las cuales se induce la relocalización de FoxO3a desde el citosol al núcleo celular (Skurk et al., 2004). Los niveles de ARNm de los genes de protección frente a estrés se analizaron por qRT-PCR.

Como se muestra en la Figura 14, la interferencia de la expresión de FoxO3a resultó en una disminución de los niveles de expresión de todo el conjunto de genes del sistema de detoxificación mitocondrial (MnSOD, CAT, Prx3, Prx5, Trx2, TR2), de UCP-2 y del coactivador transcripcional PGC-1 α .

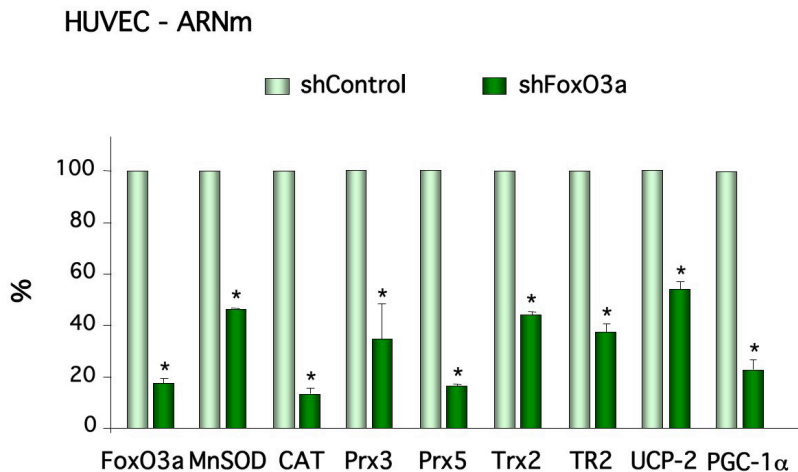


Figura 14. El silenciamiento de FoxO3a reduce la expresión de los genes de detoxificación de ROS en células endoteliales. Células HUVEC se infectaron durante 12-16 horas con el Ad-shFoxO3a o un Ad-shControl. Tras una privación de suero de 12-16 h, y transcurridas un total de 48 h desde la infección, se aisló el ARN total y se determinaron los niveles de expresión de los genes de protección frente a estrés y de PGC-1 α por RT-PCR cuantitativa. La normalización se realizó respecto a los niveles de expresión obtenidos para el 18S. Se representa la media \pm la desviación estándar respecto a los valores obtenidos para las muestras control (shControl), a los que se asignó el valor de 100 %. (*) $p \leq 0,05$ vs. control.

Estos resultados sugieren que el factor FoxO3a endógeno se requiere para el mantenimiento de los niveles basales del sistema de protección frente a ROS en células endoteliales.

Con el objeto de evaluar el efecto de la ausencia crónica de FoxO3a sobre el sistema de detoxificación, y para confirmar que la regulación observada no estaba restringida al endotelio sino que también tenía lugar en otros tipos celulares, se determinaron los niveles de expresión de los genes de protección frente a estrés oxidativo en células MEFs aisladas a partir de ratones *wild-type* (FoxO3a^{+/+} o WT) o de ratones deficientes en el gen FoxO3a (FoxO3a^{-/-}).

Mediante qRT-PCR se determinó que las MEF procedentes de ratones FoxO3a^{-/-} mostraban niveles de expresión reducidos de todos los genes estudiados, en comparación con las MEF obtenidas a partir de animales WT (Fig. 15). Estos datos apoyan la idea de que FoxO3a es un regulador general del sistema de detoxificación de ROS mitocondrial y que su presencia es necesaria para el mantenimiento de los niveles basales del sistema.

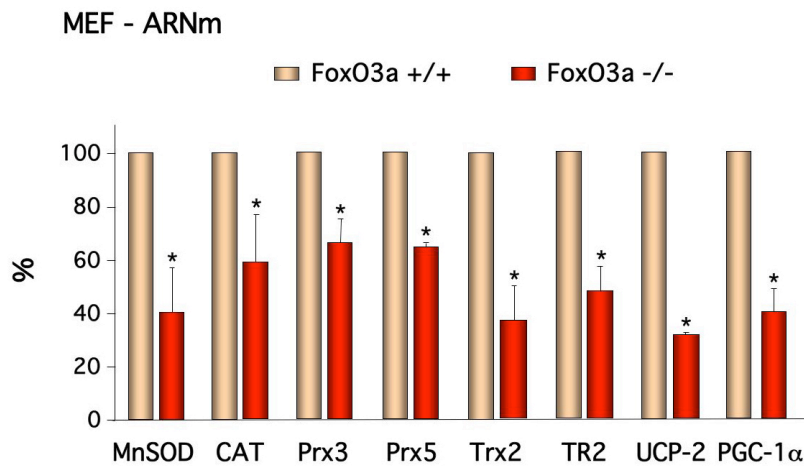


Figura 15. MEFs FoxO3a^{-/-} muestran una disminución en los niveles de expresión de los genes de protección frente a estrés oxidativo. La expresión relativa de los componentes del sistema de defensa frente a ROS se determinó en células MEFs aisladas a partir de ratones WT (FoxO3a^{+/+}) o ratones deficientes en el gen FoxO3a (FoxO3a^{-/-}) mediante análisis por RT-PCR cuantitativa. La normalización se realizó respecto a los niveles de expresión obtenidos para el 18S. Se representa la media \pm la desviación estándar respecto a los valores obtenidos para las muestras control, a los que se asignó el valor de 100 %. (*) $p \leq 0,05$ vs. control.

2. ANÁLISIS DE LA POSIBLE COOPERACIÓN ENTRE FOXO3A Y PGC-1 α EN LA INDUCCIÓN DE LOS GENES DE PROTECCIÓN FRENTE A ESTRÉS OXIDATIVO

Los resultados presentados sugieren que FoxO3a actúa como modulador de la expresión de un conjunto de genes de protección frente a estrés que, tal y como se ha descrito en diferentes estudios y se ha mencionado anteriormente, también se encuentran bajo el control del coactivador transcripcional PGC-1 α . Es importante reseñar que los análisis de ChIP comentados anteriormente (Fig. 12), y otros descritos previamente por nuestro grupo (Valle et al., 2005), revelaron que FoxO3a y PGC-1 α se unen a las mismas regiones, o a regiones solapantes, de los promotores de estos genes diana.

PGC-1 α es incapaz de unirse al ADN por sí mismo y ejerce sus efectos pleiotrópicos sobre múltiples vías mediante la interacción con distintos factores de transcripción implicados en el metabolismo celular. Asimismo, la actividad de los FoxO sobre programas específicos de expresión génica depende de su interacción con determinados factores de transcripción y cofactores (coactivadores, correpresores) (Finck and Kelly, 2006; van der Vos and Coffey, 2008).

El hecho de que tanto PGC-1 α como FoxO3a necesiten asociarse con otros reguladores transcripcionales para controlar la activación o represión de genes específicos, unido a las evidencias obtenidas en los experimentos de ChIP, nos llevaron a plantearnos la posibilidad de que FoxO3a y PGC-1 α pudiesen estar actuando de forma conjunta en la regulación de la expresión de los genes del sistema de defensa frente al estrés oxidativo. Para verificar esta hipótesis, decidimos evaluar si cada uno de estos factores requiere la presencia del otro para ejercer su efecto regulador sobre el sistema de detoxificación mitocondrial.

PGC-1 α requiere la presencia de FoxO3a para inducir la expresión de los genes del sistema de defensa antioxidante

En primer lugar analizamos si la capacidad de PGC-1 α para regular la maquinaria de protección frente a estrés se veía afectada por la ausencia de FoxO3a. Mediante infección adenoviral se sobre-expresó PGC-1 α en células MEF procedentes de ratones FoxO3a^{+/+} (*wild-type*) o FoxO3a^{-/-}, y se analizaron los niveles de expresión de las distintas dianas de estrés mediante qRT-PCR. También se analizaron por Western Blot los niveles de la proteína MnSOD, una de las enzimas más relevantes del sistema de detoxificación de ROS.

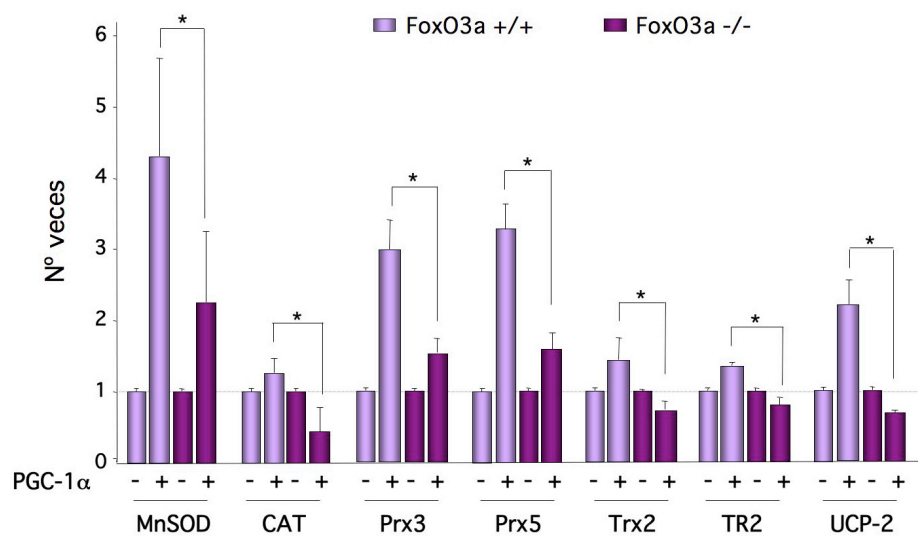
Como se observa en la Figura 16.A, en todos los casos el efecto inductor de PGC-1 α sobre la expresión de los genes de protección frente a ROS estaba reducido, o incluso completamente suprimido, en las células MEF deficientes en FoxO3a, en comparación con las

Resultados

células procedentes de animales WT. A nivel de proteína, se observó el mismo efecto sobre los niveles de la MnSOD (Fig. 16.B).

Estos resultados sugieren que PGC-1 α requiere la presencia de FoxO3a para modular la expresión del sistema de detoxificación mitocondrial, ya que la sobre-expresión de PGC-1 α no es capaz de inducir un aumento en los niveles de expresión de los genes de detoxificación en ausencia de este factor de transcripción. Es importante reseñar que de nuevo la presencia de FoxO1 o de FoxO4 no parece ser suficiente como para compensar la ausencia de FoxO3a.

A. MEF - ARNm



B. MEF - Proteína

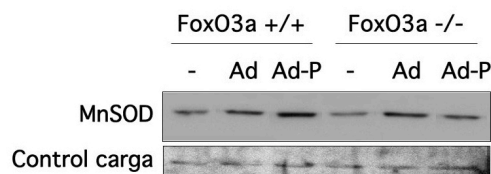


Figura 16. La inducción por PGC-1 α de los genes de protección frente a estrés está reducida en células FoxO3a $^{-/-}$. MEFs procedentes de ratones *wild-type* (FoxO3a $^{+/+}$) o deficientes en el gen FoxO3a (FoxO3a $^{-/-}$) se infectaron durante 12-16 horas con un adenovirus control (Ad) o con el adenovirus de expresión de PGC-1 α (Ad-P). A las 24 h, las células se recogieron para la obtención de ARN o de extractos proteicos totales. **(A)** Los niveles de expresión de las enzimas del sistema de detoxificación se determinaron por qRT-PCR, usando como normalizador el gen 18S. Se representa la media \pm la desviación estándar respecto a los valores obtenidos para las muestras control, a los que se asignó el valor arbitrario 1. (*) $p \leq 0,05$ vs. control. **(B)** Análisis por Western Blot de los niveles de la proteína MnSOD.

Resultados

Con el fin de analizar los niveles de otras proteínas antioxidantes distintas a la MnSOD, y dado que no disponíamos de más células MEF FoxO3a^{-/-}, decidimos utilizar un abordaje distinto para evaluar el efecto que la ausencia de FoxO3a tenía sobre la capacidad de PGC-1 α para regular el sistema de protección frente a ROS. Para ello, se silenció la expresión de FoxO3a en células MEF *wild-type* mediante infección con un Ad-shRNA. Estos experimentos se llevaron a cabo en condiciones de privación de suero (0,5 % de FBS) con el fin de favorecer la localización nuclear de FoxO3a.

En primer lugar, y a modo de control, se evaluó el efecto del Ad-shFoxO3a utilizado sobre los niveles de ARNm y proteína FoxO3a. En la Figura 17.A se puede observar que la infección con el Ad-shFoxO3a originó una reducción de un 25% en los niveles de ARNm de FoxO3a en MEF; no obstante, se detectó un efecto más acusado sobre los niveles de proteína, que estaban reducidos aproximadamente un 90% en las células infectadas con dicho adenovirus (Fig. 17.B). Estos resultados sugieren que la interferencia de la expresión de FoxO3a podría producirse a nivel del proceso de traducción del ARNm a proteína.

A continuación, y con el fin de evaluar la capacidad de PGC-1 α para inducir la expresión del sistema antioxidante en presencia/ausencia de FoxO3a, se sobre-expresó PGC-1 α en células infectadas con un Ad-shControl o con el Ad-shFoxO3a. Posteriormente se determinaron los niveles de expresión de los distintos componentes del sistema antioxidante mediante Western Blot con anticuerpos específicos (Fig. 17.C). Es importante reseñar que el efecto sobre las dianas catalasa y UCP-2 no pudo ser evaluado (datos no mostrados), ya que no fue posible observar la inducción de la enzima catalasa por PGC-1 α , ni detectar la proteína UCP-2 por Western Blot. Aunque desconocemos el mecanismo implicado, una posible explicación de estos resultados podría ser que tanto la actividad de PGC-1 α sobre la catalasa como los niveles celulares de la proteína UCP-2 se ven afectados por las condiciones de privación de suero utilizadas.

En cuanto al resto de componentes del sistema de protección frente a ROS (MnSOD, Prx3, Prx5, Trx2 y TR2), hay que destacar que la habilidad de PGC-1 α para promover la expresión de estos genes de detoxificación, observada en células control, estaba reducida en las células donde se había interferido la expresión de FoxO3a (Fig. 17.C).

Tomados en su conjunto, los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que PGC-1 α requiere la presencia de FoxO3a para regular la expresión del sistema de detoxificación mitocondrial.

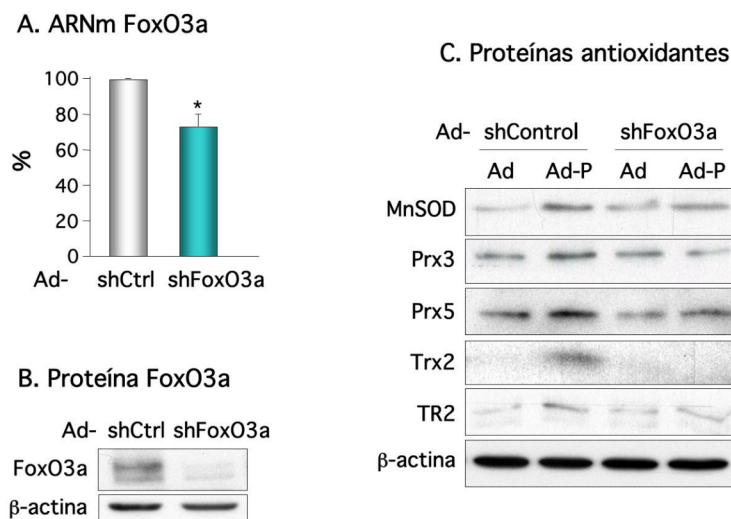


Figura 17. El silenciamiento de FoxO3a en MEFs disminuye la capacidad de PGC-1 α para inducir la expresión del sistema de defensa frente a ROS. Células MEF se infectaron durante 12-16 h con un adenovirus control (Ad) o con el adenovirus de sobre-expresión de PGC-1 α (Ad-P). Transcurridas 24 h, las células se infectaron con un Ad-shControl o con el Ad-shFoxO3a y fueron sometidas a privación de suero (0,5% FBS) durante 8-10 h. **(A y B)** Efecto de la infección con el Ad-shFoxO3a sobre los niveles de ARNm y de proteína FoxO3a. **(C)** Determinación mediante Western Blot de los niveles de las proteínas antioxidantes indicadas. Se usó la β -actina como control de carga.

FoxO3a requiere la presencia de PGC-1 α para ejercer su efecto sobre el sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial

A continuación nos propusimos determinar si la capacidad de FoxO3a para inducir la expresión de la maquinaria de protección frente a estrés era igualmente dependiente de la presencia de PGC-1 α , o estaba mediada por un mecanismo independiente de este coactivador.

Para tratar de dilucidar esta cuestión se analizó el efecto de FoxO3a sobre la expresión de los genes de la defensa antioxidante en ausencia de PGC-1 α . En estos ensayos se utilizaron células MEF y MAEC obtenidas a partir de ratones *wild-type* (PGC-1 $\alpha^{+/+}$) y ratones deficientes en el gen PGC-1 α (PGC-1 $\alpha^{-/-}$). Se usaron estos dos tipos celulares con el fin de comprobar que los efectos observados se dan tanto en nuestro sistema específico de estudio, el endotelio, como en otros sistemas celulares.

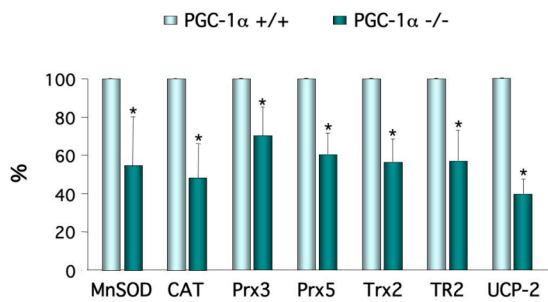
Empezamos por validar el sistema utilizado, para lo cual consideramos relevante examinar en estas células los niveles basales de expresión del sistema de defensa frente a los ROS. Mediante análisis por qRT-PCR se observó que la expresión de todos los componentes del sistema antioxidante estudiados estaba considerablemente reducida en fibroblastos embrionarios procedentes de animales PGC-1 $\alpha^{-/-}$ (Fig. 18.A). Los niveles de expresión de las enzimas MnSOD, Prx5, TR2 y la proteína desacoplante UCP-2 estaban disminuidos en células MAEC deficientes en PGC-1 α , en comparación con las células *wild-*

type (Fig. 18.B). Sin embargo, en este tipo celular no se detectaron cambios en la expresión de las enzimas Prx3 y Trx2, mientras que la expresión de la catalasa resultó estar aumentada en ausencia de PGC-1 α .

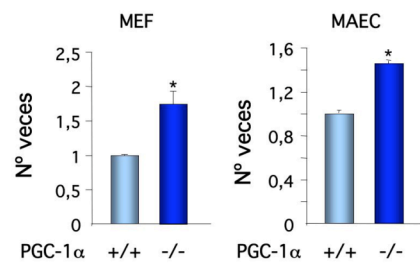
Estos cambios se correlacionan con la observación de que las células MEF y MAEC procedentes de ratones *knock-out* para PGC-1 α presentan niveles intracelulares de ROS más elevados que las células WT, como indica el aumento en la fluorescencia detectado en presencia del fluorocromo CM-H₂DCFDA (Fig. 18.C). Es posible por tanto que, dada la situación de mayor estrés oxidativo a la que se encuentran sometidas las células deficientes en PGC-1 α , se activen otro tipo de mecanismos destinados a eliminar el exceso de ROS, lo que explicaría la inducción de ciertas enzimas de detoxificación, como la Prx3, la Trx2 y la catalasa.

Los datos obtenidos concuerdan con resultados previos de nuestro grupo y otros (St-Pierre et al., 2006; Valle et al., 2005) que identifican a PGC-1 α como regulador clave de la expresión del conjunto de proteínas implicadas en la protección frente al estrés oxidativo mitocondrial y de la homeostasis de los ROS.

A. MEF - ARNm



C. ROS (CM-H₂DCFDA)



B. MAEC- ARNm

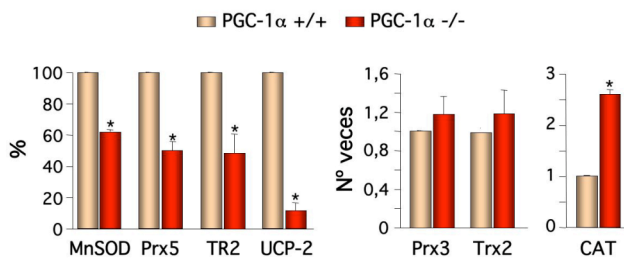


Figura 18. Células MEF y MAEC deficientes en PGC-1 α muestran una expresión reducida del sistema de protección antioxidante. Se aisló ARN total a partir de células MEF (A) y MAEC (B) procedentes de ratones *wild type* (PGC-1 α ^{+/+}) o deficientes en PGC-1 α (PGC-1 α ^{-/-}). Los niveles de expresión de los genes de detoxificación de ROS se analizaron por qRT-PCR, usando como normalizador el ARNr 18S. Se representa la media \pm la desviación estándar respecto a los valores obtenidos para las células WT, a los que se asignó el valor arbitrario de 1 o de 100 %. (C) Los niveles intracelulares de ROS de células PGC-1 α ^{+/+} o PGC-1 α ^{-/-} se determinaron por citometría de flujo mediante marcaje de las células con CM-H₂DCFDA 2 μ M, 30 min. a 37°C. A los valores obtenidos para las células WT se les asignó el valor arbitrario de 1. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar; * indica significación estadística respecto a los controles WT ($p \leq 0,05$).

Con el fin de analizar si el efecto inductor de FoxO3a sobre el sistema de protección antioxidante se veía afectado por la ausencia de PGC-1 α , se expresó la forma constitutivamente activa de la proteína FoxO3a (FoxO3a-TM) en células MEF y MAEC procedentes de ratones WT o ratones deficientes en PGC-1 α . Posteriormente se analizaron los niveles de expresión de los factores de protección frente a ROS mediante qRT-PCR y Western Blot.

En la Figura 19 se puede observar que la capacidad de FoxO3a para aumentar la expresión de los genes estudiados estaba claramente reducida, o completamente abolida, en células deficientes en PGC-1 α , tanto a nivel de ARNm (Fig. 19.A) como de proteína (Fig. 19.B). Cabe destacar que no todas las dianas de FoxO3a testadas mostraron una dependencia de PGC-1 α similar. En el caso concreto de la MnSOD, aunque la inducción por FoxO3a estaba reducida en las células PGC-1 α ^{-/-}, la diferencia observada en relación a las células WT no alcanzó la significación estadística.

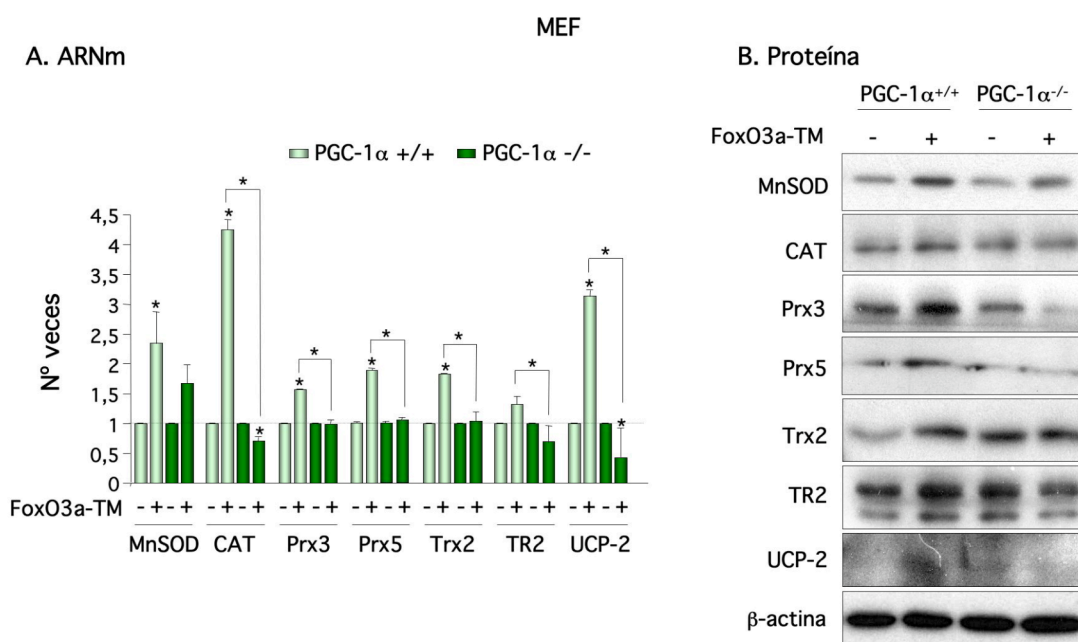


Figura 19. FoxO3a requiere la presencia de PGC-1 α para inducir la expresión del sistema de detoxificación en MEFs. Se infectaron células MEF con un adenovirus control (Ad-GFP) o un adenovirus de expresión de la forma constitutivamente activa de FoxO3a (Ad-FoxO3a-TM) durante 6 horas. 48 h post-infección, se analizaron los niveles de ARNm (A) y proteína (B) de los factores de detoxificación mediante qRT-PCR y Western Blot, respectivamente. (A) Como normalizador de los niveles de ARN se utilizó el gen 18S. Se representa la media \pm la desviación estándar respecto a los valores obtenidos para las muestras control, a los que se asignó el valor arbitrario 1. (*) $p \leq 0,05$. (B) La β -actina se usó como control de carga en los Western Blot.

En lo referente a los ensayos realizados en células MAEC (Fig. 20, A y B), en general se obtuvieron resultados equivalentes a los descritos para las MEF. Sin embargo, hay que subrayar que las MAEC respondieron bastante peor que las MEF y las HUVEC a la infección

Resultados

con el Ad-FoxO3a-TM, observándose en algunos casos inducciones de las enzimas de detoxificación muy pequeñas (Prx5, TR2 y UCP-2). Este efecto podría estar relacionado con el hecho de que las MAEC pasan un largo período de tiempo en cultivo antes de poder ser utilizadas. En línea con esta idea, hemos observado en estudios previos realizados en el laboratorio que en MAEC y otras células endoteliales primarias (HUVEC, BAEC) la respuesta a PGC-1 α disminuye progresivamente con el número de pase, aunque las células no hayan alcanzado la fase de senescencia. Para todos los genes analizados se observó que en ausencia de PGC-1 α la inducción de las dianas por FoxO3a estaba reducida, o incluso completamente anulada. El hecho de que tan solo se detectasen diferencias significativas respecto a las células control en el caso de CAT, Prx3 y TR2 probablemente se explique por los bajos niveles de inducción observados en respuesta al Ad-FoxO3a-TM.

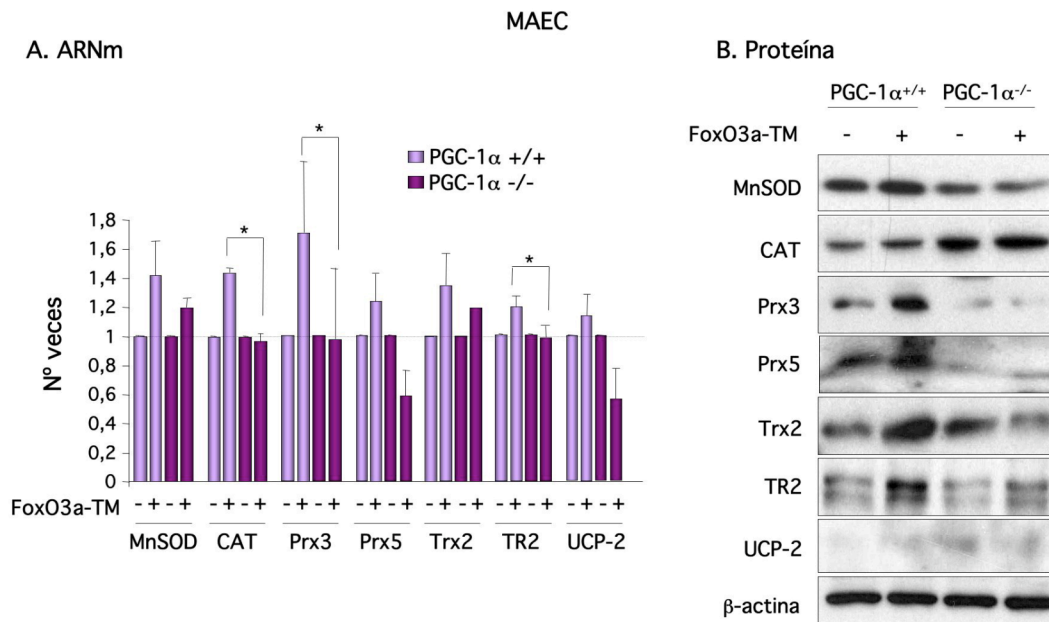


Figura 20. La capacidad de FoxO3a para inducir la expresión del sistema de defensa antioxidante está reducida en MAEC deficientes en PGC-1 α . Células MAEC procedentes de ratones *wild-type* o *knock-out* para PGC-1 α se infectaron durante 6 horas con el adenovirus control Ad-GFP o el Ad-FoxO3a-TM. A las 48 h de la infección, se analizaron los niveles de ARNm (A) y proteína (B) de las enzimas de detoxificación mediante qRT-PCR y Western Blot, respectivamente. (A) Como normalizador de los niveles de ARN se utilizó el gen 18S. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar. A las muestras control se les asignó el valor arbitrario de 1. * indica significación estadística ($p \leq 0,05$). (B) La expresión de la β -actina se usó como control de carga.

Por último, cabe señalar que, tanto en MEF como en MAEC, para algunos de los factores estudiados (Trx2 y TR2, por ejemplo) las inducciones detectadas en respuesta al FoxO3a-TM en células PGC-1 α +/+ fueron notablemente mayores a nivel de proteína que a nivel de ARNm. Es posible por tanto que exista algún tipo de mecanismo de regulación que actúe a nivel post-transcripcional promoviendo un aumento en los niveles de ciertas proteínas de detoxificación de manera dependiente de la presencia de PGC-1 α .

Los resultados de los experimentos realizados en MEF y MAEC procedentes de ratones deficientes en PGC-1 α sugieren que, efectivamente, FoxO3a requiere la presencia de este coactivador transcripcional para poder ejercer su efecto inductor de la expresión de los genes de protección frente a los ROS mitocondriales. Por tanto, podemos concluir que PGC-1 α y FoxO3a son mutuamente dependientes en la regulación del programa transcripcional de respuesta a estrés.

La capacidad de FoxO3a para reducir los niveles de ROS es menor en ausencia de PGC-1 α

A continuación nos propusimos comprobar si la dependencia mutua observada entre FoxO3a y PGC-1 α en la modulación de la expresión del sistema de defensa antioxidante afectaba a la regulación de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno.

Para ello, se comparó el efecto que la expresión de FoxO3a-TM tenía sobre los niveles de ROS en presencia y en ausencia de PGC-1 α , bien mediante la interferencia de su expresión con shRNAs, bien utilizando células procedentes de ratones *knock-out* para PGC-1 α .

Se llevó a cabo un primer experimento en células HUVEC donde se expresó FoxO3a-TM y posteriormente se silenció la expresión de PGC-1 α mediante infección adenoviral. A continuación se determinaron los niveles de ROS por citometría de flujo mediante marcaje de las células con el fluorocromo CM-H₂DCFDA. Como se muestra en la Figura 21.A, se observó una menor reducción en los niveles de ROS en respuesta a FoxO3a en células deficientes en PGC-1 α que en células control, aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. Una posible explicación de este resultado es que, dado que FoxO3a induce la expresión de PGC-1 α , esto compense parcialmente el efecto supresor del shPGC-1 α , lo que estaría a su vez promoviendo una disminución en los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno.

Por ello, a continuación se decidió testar el efecto que FoxO3a ejerce sobre los niveles de ROS en células MEF y MAEC procedentes de ratones PGC-1 $\alpha^{+/+}$ o ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$. Estas células se infectaron con el adenovirus control Ad-GFP o el Ad-FoxO3a-TM, para posteriormente determinar los niveles de ROS utilizando el mismo método que en el caso anterior. Como se observa en la Figura 21 (B y C), la capacidad de FoxO3a para reducir los niveles intracelulares de ROS estaba significativamente disminuida en ausencia de PGC-1 α , tanto en células MEF (B) como en MAEC (C).

Los datos obtenidos en los experimentos de citometría de flujo apoyan la idea de que el efecto protector frente a los ROS de FoxO3a es dependiente, al menos en parte, de la presencia del coactivador transcripcional PGC-1 α .

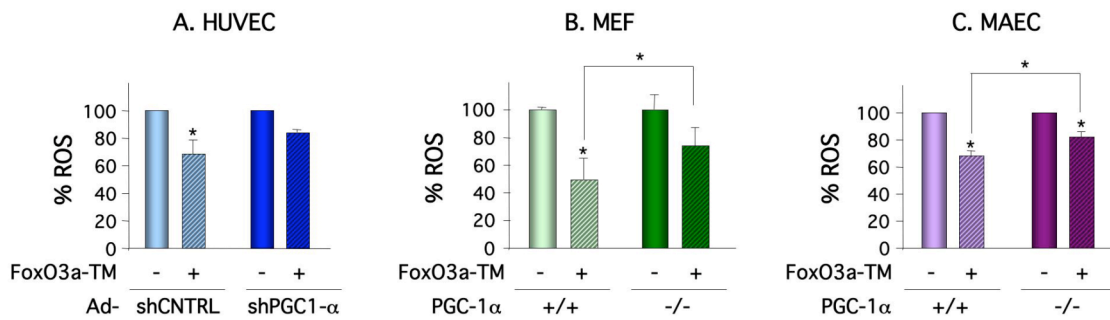


Figura 21. FoxO3a es más eficiente reduciendo los niveles de ROS cuando PGC-1 α está presente. (A) Células HUVEC se infectaron con Ad-GFP/Ad-FoxO3a-TM durante 6 horas y, a continuación, con Ad-shControl/Ad-shPGC-1 α durante 12-16 horas. Transcurridas 24 h desde la segunda infección, se analizaron los niveles de ROS por citometría de flujo tras marcaje de las células con CM-H₂DCFDA 2 μ M, 30 min. a 37°C. Células MEF (B) o MAEC (C) se infectaron durante 6 h con Ad-GFP/Ad-FoxO3a-TM. Transcurridas 48 h desde la infección, se analizaron los niveles de ROS según se ha descrito en (A). A los valores obtenidos para las células control se les asignó el valor arbitrario de 100%. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar; (*) $p \leq 0,05$.

FoxO3a y PGC-1 α interactúan directamente en células endoteliales

Dado que PGC-1 α no puede unirse directamente al ADN, y en base a los resultados obtenidos que sugerían una dependencia mutua entre este coactivador y el factor FoxO3a en la regulación de la expresión del sistema antioxidante, nos preguntamos si el efecto cooperativo observado podría estar mediado por una interacción directa entre estos reguladores transcripcionales.

Con el fin de determinar si FoxO3a y PGC-1 α forman parte del mismo complejo transcripcional en células endoteliales, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación.

Se infectaron células HUVEC con un adenovirus de sobre-expresión de PGC-1 α o con un adenovirus control. Posteriormente se obtuvieron extractos celulares totales que se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a FoxO3a o PGC-1 α . A continuación, el material inmunoprecipitado se analizó mediante Western Blot con anticuerpos específicos frente a ambas proteínas. Como se puede observar en la Figura 22 (A y B), se detectó FoxO3a en los inmunoprecipitados anti-PGC-1 α , tanto en condiciones basales como en condiciones de sobre-expresión de PGC-1 α . Asimismo, se detectó la presencia de PGC-1 α en el material inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-FoxO3a (Fig. 22.B).

Estos resultados indican que FoxO3a y PGC-1 α interactúan en células endoteliales, siendo detectable esta interacción incluso en condiciones en las que estos factores no son sobre-expresados.

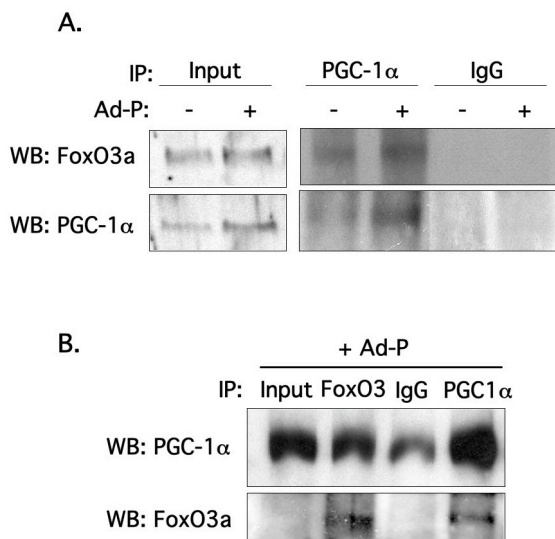


Figura 22. FoxO3a y PGC-1 α interactúan en células vivas. (A) Extractos celulares totales obtenidos a partir de HUVEC infectadas con un adenovirus control o un adenovirus de sobre-expresión de PGC-1 α (Ad-P), se sometieron a inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo anti-PGC-1 α o IgG de conejo como control; la presencia de FoxO3a o PGC-1 α en el material inmunoprecipitado se detectó por Western Blot (WB) (B) Células HUVEC se infectaron con Ad-PGC-1 α (Ad-P), se obtuvieron extractos celulares totales, y se inmunoprecipitó con los anticuerpos indicados; mediante WB se detectó la presencia de PGC-1 α y de FoxO3a en los inmunoprecipitados. *Input*: extracto celular total no sometido a inmunoprecipitación.

Con el objeto de confirmar el resultado de los experimentos de co-inmunoprecipitación, y para identificar el dominio de PGC-1 α implicado en la interacción con FoxO3a, se llevaron a cabo ensayos de interacción de proteínas *in vitro*.

Se generaron proteínas de fusión a glutatión S-transferasa (GST) de cuatro dominios distintos de PGC-1 α y, mediante ensayos de *pull-down* de GST, se testó su unión a proteína FoxO3a marcada con S³⁵ y traducida *in vitro*. Como se muestra en la Figura 23, se detectó que el dominio C-terminal de PGC-1 α (residuos 580-797 de la proteína) unido a GST, se unía a la proteína FoxO3a-S³⁵. Esta asociación era específica, ya que FoxO3a-S³⁵ no fue capaz de unirse al control que llevaba únicamente proteína GST, ni a ninguno de los otros dominios analizados.

Los ensayos de interacción realizados mostraron que FoxO3a y PGC-1 α interactúan entre sí en células endoteliales primarias, y que se trata de una interacción directa que tiene lugar a través del dominio C-terminal de PGC-1 α . Era posible por tanto que esta interacción estuviera mediando la asociación de ambas proteínas en la regulación de la expresión de los genes del sistema de protección frente a estrés oxidativo.

Resultados

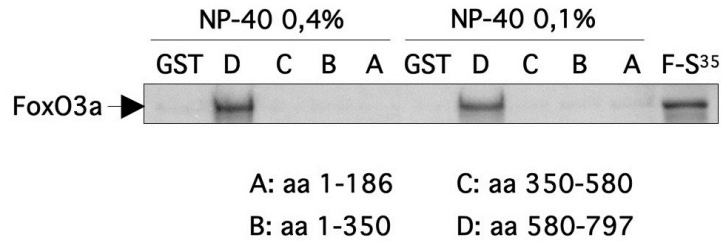


Figura 23. Interacción de FoxO3a y PGC-1 α *in vitro*. Se generaron proteínas de fusión a GST de distintos dominios de PGC-1 α (A-D, que contienen los residuos indicados). FoxO3a-S³⁵, traducido *in vitro* en un sistema de reticulocitos de conejo, se sometió a ensayos de *pull-down* de GST con una matriz de glutation-agarosa unida a las proteínas de fusión indicadas. Las proteínas unidas se separaron por SDS/PAGE y se visualizaron mediante autorradiografía. El ensayo se realizó en dos condiciones distintas: 0,1 ó 0,4% de NP-40. La proteína FoxO3a unida se indica mediante una flecha a la izquierda del panel. Carriles 1 y 6, control de GST; carril 11, input de FoxO3a-S³⁵.

PGC-1 α actúa como coactivador transcripcional de FoxO3a

Dado que FoxO3a y PGC-1 α parecían depender mutuamente entre sí para regular el sistema de protección frente a estrés, y además eran capaces de interactuar en las células endoteliales, nuestro siguiente objetivo fue comprobar si ambos factores podían formar un complejo funcional para regular la expresión de sus genes diana comunes.

Como se ha comentado anteriormente, PGC-1 α ejerce sus efectos mediante la coactivación de distintos factores de transcripción. Por tanto, decidimos determinar si PGC-1 α puede actuar como coactivador transcripcional de FoxO3a. Para ello se utilizó un vector reportero portador del gen de la luciferasa bajo el control de un promotor que contiene tres sitios de reconocimiento para FoxO o DBE (p3xDBE-luc). Este vector se co-transfectó con los vectores de expresión de FoxO3a y/o de PGC-1 α en células BAEC. Como se muestra en la Figura 24, en las co-transfecciones realizadas de forma conjunta con los vectores de FoxO3a y de PGC-1 α se observó un incremento en la actividad luciferasa que fue superior al detectado al co-transfectar con el vector reportero únicamente el vector de expresión de FoxO3a.

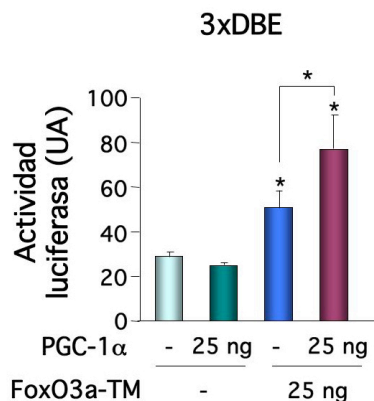


Figura 24. PGC-1 α coactiva a FoxO3a. Células BAEC se co-transfectaron con el vector reportero p3xDBE-luc y las cantidades indicadas de los vectores de expresión de PGC-1 α y de FoxO3a, o el correspondiente plásmido vacío como control. La actividad luciferasa, expresada en unidades arbitrarias (UA), se determinó 24 h después de la transfección. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar; (*) $p \leq 0,05$.

Los resultados obtenidos indican que FoxO3a y PGC-1 α actúan de forma cooperativa sobre la construcción promotora estudiada, sugiriendo que PGC-1 α puede funcionar como coactivador transcripcional de FoxO3a.

PGC-1 α coactiva a FoxO3a en el promotor de *sod2*

Con el fin de investigar si la co-regulación de los genes antioxidantes observada es dependiente de la coactivación de FoxO3a por PGC-1 α , se analizó la actividad transactivadora de estos dos factores sobre un fragmento de 2 kb del promotor del gen codificante de la MnSOD (*sod2*), enzima del sistema de detoxificación de ROS y diana de ambos. Dicho fragmento del promotor contiene un sitio de unión funcional para FoxO (DBE) previamente caracterizado (Kops et al., 2002a).

Para realizar este ensayo se generó un vector reportero portador del gen de la luciferasa bajo el control del promotor de *sod2* (*psod2-luc*), y se co-transfectó con los vectores de expresión de PGC-1 α y/o de FoxO3a en células BAEC. Como cabía esperar, tanto PGC-1 α como FoxO3a dieron lugar a un aumento en la expresión de la luciferasa (Fig. 25). Es importante destacar que el incremento en la actividad luciferasa observado fue aún mayor cuando se co-transfectaron de forma conjunta los vectores de expresión de PGC-1 α y de FoxO3a con el vector *psod2-luc*.

Estos resultados indican que FoxO3a y PGC-1 α son capaces de cooperar para regular la actividad del promotor de *sod2*, y sugieren que PGC-1 α puede actuar como coactivador transcripcional de FoxO3a sobre este promotor.

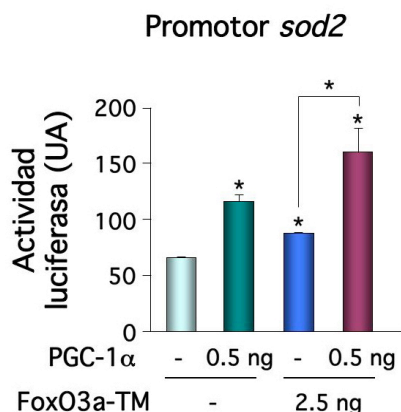


Figura 25. PGC-1 α actúa como coactivador de FoxO3a en la regulación del gen *sod2*. Células BAEC se co-transfectaron con el vector reportero *psod2-luc* y las cantidades indicadas de los vectores de expresión de PGC-1 α y FoxO3a, o el correspondiente plásmido vacío como control. La actividad luciferasa, expresada en unidades arbitrarias (UA), se determinó 24 h después de la transfección. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar; (*) $p \leq 0,05$.

La inducción de *sod2* por PGC-1 α requiere un sitio FoxO funcional

A continuación, y una vez observado que PGC-1 α y FoxO3a actuaban conjuntamente en la regulación transcripcional de *sod2*, decidimos comprobar si el efecto inductor de PGC-1 α sobre *sod2* estaba mediado por su interacción con el factor FoxO3a unido a la región promotora de dicho gen.

Para ello se generó un vector reportero de luciferasa que contenía el fragmento de 2 kb del promotor de *sod2* mutado en el sitio de unión funcional descrito para FoxO (*psod2mut-luc*). Esta mutación, originada por sustitución del nucleótido C por G en la secuencia AAACAA del DBE, redujo aproximadamente 3 veces la actividad basal del promotor (Fig. 26.A). A continuación se realizaron experimentos de co-transfección en BAEC del vector portador del promotor intacto o el promotor mutado con los vectores de expresión de FoxO3a o PGC-1 α .

Como se muestra en la Figura 26.B, la mutación introducida en el DBE disminuyó drásticamente la inducción del promotor de *sod2* mediada por FoxO, confirmando que es a través de la unión a dicha secuencia como FoxO3a ejerce su efecto regulador sobre este promotor.

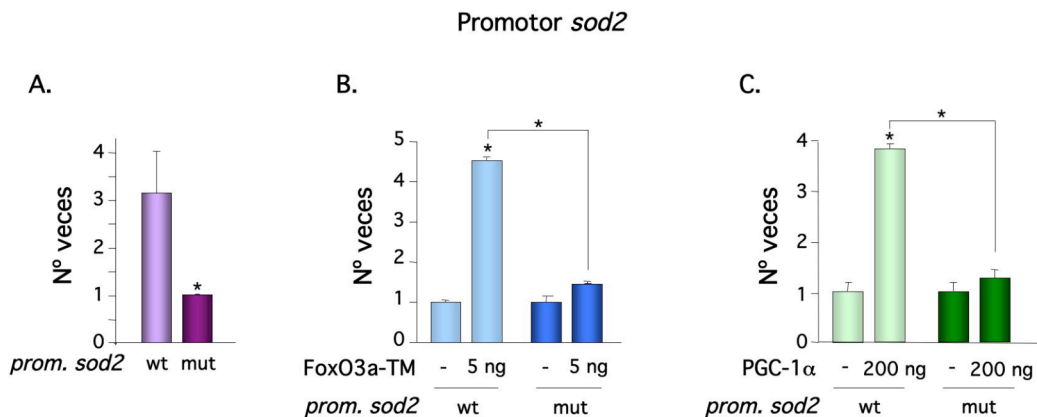


Figura 26. PGC-1 α requiere un sitio FoxO funcional para regular la actividad del promotor de *sod2*. (A) Células BAEC se transfectaron con el vector reportero portador del promotor de *sod2* intacto (wt), o el promotor mutado en un sitio FoxO (mut). (B y C) Co-transfección en BAEC de los vectores reporteros *psod2-luc* (wt) o *psod2mut-luc* (mut) y las cantidades indicadas de los vectores de expresión de FoxO3a (B) y PGC-1 α (C), o los correspondientes plásmidos control. La actividad luciferasa se determinó 24 h después de la transfección. Se representa la tasa de aumento de la actividad luciferasa respecto al control, al que se asignó el valor arbitrario de 1. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar; (*) $p \leq 0,05$.

De la misma manera, en los ensayos de co-transfección con el vector de expresión de PGC-1 α se observó una reducción drástica en la actividad transactivadora de PGC-1 α sobre el promotor de *sod2* mutado, en comparación con el promotor intacto (Fig. 26.C),

indicando que PGC-1 α requiere la presencia de un sitio FoxO funcional para poder ejercer su actividad reguladora sobre el promotor de la MnSOD.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que FoxO3a puede actuar como mediador de la actividad transcripcional de PGC-1 α sobre el gen *sod2*, ya que este coactivador parece requerir la unión de FoxO3a a la región promotora de dicho gen para inducir su expresión.

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE SIRT1 EN LA REGULACIÓN DEL PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE RESPUESTA A ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS ENDOTELIALES.

Se ha propuesto que la enzima deacetilasa SIRT1 podría estar implicada en la regulación de la supervivencia celular en respuesta a situaciones de estrés oxidativo mediante la activación de los sistemas intracelulares destinados a la reparación del daño. De hecho, se cree que éste podría ser uno de los mecanismos mediadores del efecto de esta sirtuina sobre la longevidad de diversos organismos (Brunet et al., 2004; Cohen et al., 2004; Lin et al., 2002c).

Varios estudios han demostrado que SIRT1 puede deacetilar y regular la actividad tanto de FoxO3a como de PGC-1 α en el control transcripcional de distintos programas biológicos. De hecho, su interacción con FoxO3a parece promover respuestas de supervivencia frente a muerte celular ante un estímulo de estrés (Brunet et al., 2004; Gerhart-Hines et al., 2007; Rodgers et al., 2005).

En base a estas observaciones, nos planteamos la hipótesis de que SIRT1 estuviese involucrada en la regulación de la expresión de los genes del sistema de defensa antioxidante mitocondrial y que, en este contexto, pudiese actuar modulando la actividad del complejo FoxO3a/PGC-1 α .

SIRT1 regula positivamente la expresión de varias enzimas clave en la defensa antioxidante en BAEC

En primer lugar decidimos evaluar el papel de SIRT1 en el control de la expresión de la maquinaria de protección frente a estrés oxidativo. Para ello, se infectaron células BAEC con un adenovirus que dirige la sobre-expresión de la proteína SIRT1 (Ad-SIRT1) o con un adenovirus control (Ad-Shuttle). Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de los componentes del sistema antioxidante por qRT-PCR y Western Blot.

Resultados

Como se muestra en la Figura 27, SIRT1 fue capaz de modular positivamente la expresión de varias de las enzimas clave en la detoxificación de los ROS de origen mitocondrial, como la MnSOD, la CAT, Prx5 y TR2. Sin embargo, la sobre-expresión de SIRT1 no indujo cambios significativos en los niveles de expresión de la enzima Prx3 y causó una disminución en la expresión de la Trx2 y de la proteína desacoplante UCP-2.

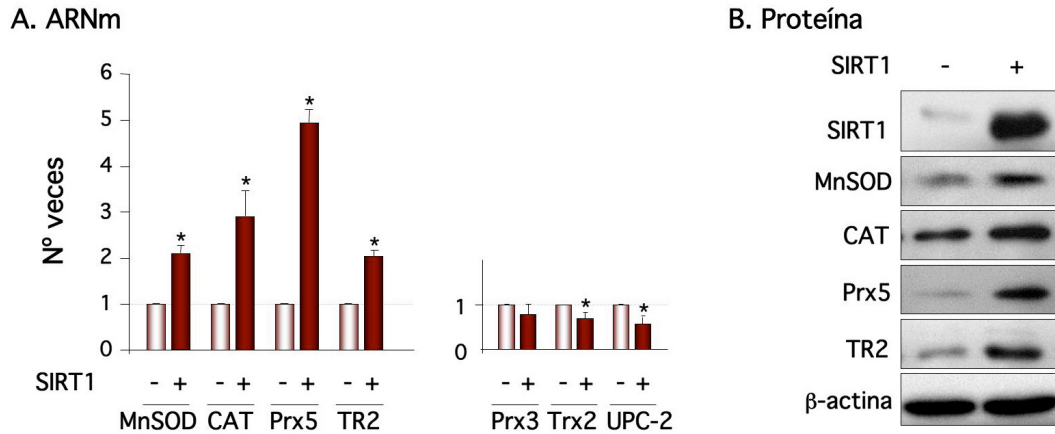


Figura 27. SIRT1 regula el sistema de protección frente a estrés oxidativo en BAEC. Células BAEC se infectaron durante 12-16 horas con un adenovirus de sobre-expresión de la proteína SIRT1 (Ad-SIRT1) o con un adenovirus control (Ad-Shuttle). Transcurridas 24 h desde la infección, las células se recogieron para el aislamiento de ARN o la obtención de extractos totales de proteínas. **(A)** Los niveles de ARNm de los genes antioxidantes se analizaron por qRT-PCR, usando como normalizador el ARNr 18S. Se representa la media \pm la desviación estándar respecto a los valores obtenidos para las células control, a los que se asignó el valor arbitrario de 1. (*) $p \leq 0,05$ vs. control. **(B)** Análisis por Western Blot de los niveles de proteínas del sistema de detoxificación. Se usó la expresión de la β -actina como control de carga.

De igual forma, se analizó si la sobre-expresión de SIRT1 afectaba a la expresión de FoxO3a y de PGC-1 α , ambos reguladores positivos del sistema. En la Figura 28 se puede observar que SIRT1 causó un aumento en los niveles de ARNm tanto de FoxO3a como de PGC-1 α . Aunque se trata de resultados todavía por confirmar, experimentos preliminares que hemos realizado sugieren que esta regulación positiva se da también a nivel de proteína (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos indican que SIRT1 está implicada en la regulación de la expresión de las proteínas del sistema de defensa frente a los ROS, así como en la modulación de los niveles de los reguladores FoxO3a y PGC-1 α en células endoteliales.

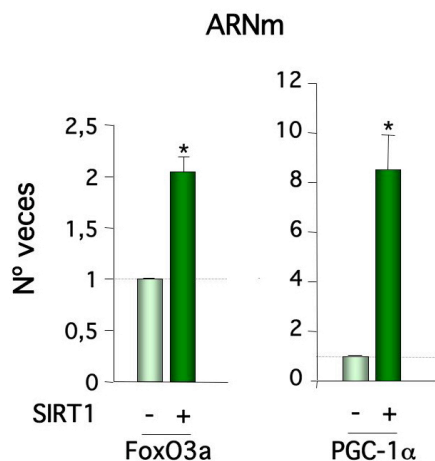


Figura 28. SIRT1 induce la expresión de FoxO3a y PGC-1 α en BAEC. Células BAEC se infectaron durante 12-16 horas con un adenovirus de sobre-expresión de la proteína SIRT1 (Ad-SIRT1) o con un adenovirus control (Ad-Shuttle). Transcurridas 24 h desde la infección, las células se recogieron para el aislamiento de ARN. Los niveles de ARNm de FoxO3a y PGC-1 α se analizaron por qRT-PCR, usando como normalizador el ARNr 18S. Se representa la media \pm la desviación estándar respecto a los valores obtenidos para las células control, a los que se asignó el valor arbitrario de 1. (*) $p \leq 0,05$ vs. control.

SIRT1 requiere la presencia de PGC-1 α y de FoxO3a para inducir la expresión de los genes del sistema de defensa antioxidante

SIRT1 parece estar involucrada en la regulación de la expresión de varios de los genes del sistema de defensa antioxidante que, según nuestros resultados previos, son dianas directas de los factores PGC-1 α y FoxO3a. Por ello, a continuación decidimos evaluar si el efecto inductor de SIRT1 sobre dicho sistema es dependiente de la presencia de estos dos reguladores transcripcionales.

Para ello se sobre-expresó SIRT1 en células BAEC donde se interfirió la expresión de PGC-1 α o de FoxO3a mediante infección con vectores adenovirales que expresan ARNs de interferencia específicos.

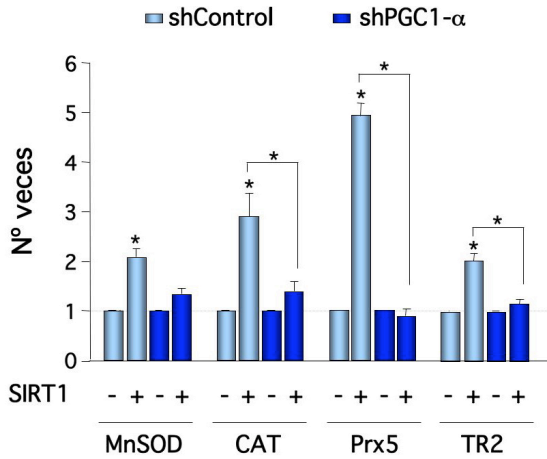
Por qRT-PCR y Western Blot se analizaron los niveles de expresión de las enzimas del sistema de detoxificación que en los experimentos de sobre-expresión habíamos identificado como genes regulados positivamente por SIRT1 (MnSOD, CAT, Prx5 y TR2). Como se observa en la Figura 29, la capacidad de SIRT1 para aumentar la expresión de los genes estudiados estaba claramente reducida, o incluso completamente abolida, en células que tenían suprimida la expresión de PGC-1 α , tanto a nivel de ARNm como de proteína.

De forma similar, se observó que el efecto inductor de SIRT1 sobre la expresión de los genes de protección frente a ROS estaba disminuido o totalmente cancelado en las células deficientes en FoxO3a, en comparación con las células control. A nivel de proteína, el efecto observado fue el mismo (Fig. 30).

Estos resultados indican que tanto PGC-1 α como FoxO3a son requeridos, al menos en parte, para la regulación por SIRT1 de un conjunto de genes implicados en la detoxificación de los ROS de origen mitocondrial. Cabe reseñar que estos genes han sido ya

identificados como dianas directas del complejo FoxO3a/PGC-1 α , lo que parece apoyar la idea de que SIRT1 podría jugar un papel en la regulación de la formación de dicho complejo.

A. ARNm



B. Proteína

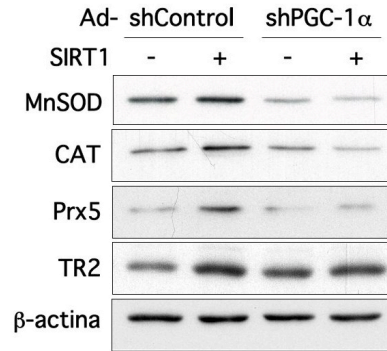
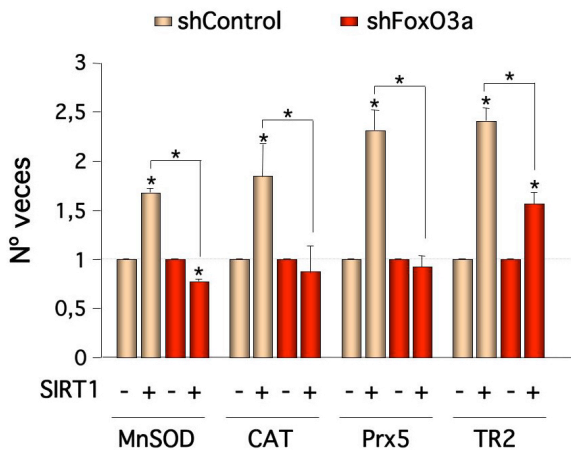


Figura 29. SIRT1 requiere la presencia de PGC-1 α para inducir la expresión de los genes del sistema antioxidante. Células BAEC se infectaron durante 12-16 horas de forma simultánea con Ad-SIRT1/Ad-Shuttle y Ad-shPGC-1 α /Ad-shControl. A las 24 h de la infección, y tras 12-16 horas en 0,5% de suero, las células se recogieron para la obtención de ARN o extractos totales de proteína. **(A)** Análisis por qRT-PCR de los niveles de expresión de las enzimas del sistema de detoxificación. A los valores obtenidos para las células control se les asignó el valor arbitrario de 1. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar; (*) $p \leq 0,05$. **(B)** Determinación de los niveles de las proteínas de la defensa antioxidante mediante Western Blot. La expresión de la β -actina se utilizó como control de carga.

A. ARNm



B. Proteína

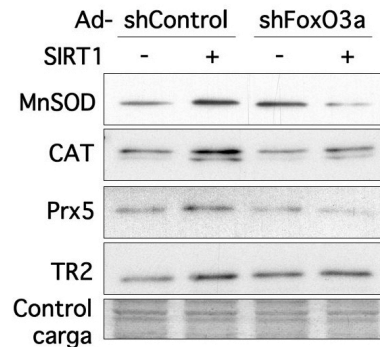


Figura 30. La presencia de FoxO3a es necesaria para la inducción por SIRT1 de los genes del sistema de protección frente a ROS. Células BAEC se infectaron durante 12-16 horas con el Ad-SIRT1 o con el control Ad-Shuttle. Tras 32-36 h de recuperación, se infectó con el Ad-shFoxO3a o con Ad-shControl durante 12-16 h; posteriormente se renovó el medio de cultivo y se sometió a las células a deprivación de suero (0,5% FBS) durante 8 h. **(A)** Análisis de los niveles de ARNm de las enzimas de detoxificación por qRT-PCR. A los valores obtenidos para las células control se les asignó el valor arbitrario de 1. Las barras de error representan la media \pm la desviación estándar; (*) $p \leq 0,05$. **(B)** Extractos celulares totales se analizaron por Western Blot con los anticuerpos indicados.

El tratamiento con el inhibidor de SIRT1 nicotinamida aumenta la acetilación de PGC-1 α

La mayoría de las funciones biológicas atribuidas a SIRT1 dependen de su actividad enzimática como deacetilasa dependiente de NAD⁺. Se ha descrito que esta sirtuina puede regular la expresión génica tanto positiva como negativamente a través de la deacetilación de distintos factores, entre los que se incluyen varios reguladores transcripcionales como FoxO3a y PGC-1 α . Mediante estudios de espectrometría de masas se ha demostrado que FoxO3a y PGC-1 α pueden ser acetilados en cinco y trece residuos de lisina, respectivamente (Brunet et al., 2004; Rodgers et al., 2005).

En base a estos datos, y teniendo en cuenta nuestras observaciones que sugerían un efecto regulador de SIRT1 sobre la expresión de los genes de detoxificación de ROS controlados por PGC-1 α y FoxO3a, nos preguntamos si SIRT1 podría estar actuando sobre estos genes a través de la modulación del estado de acetilación y la actividad de PGC-1 α y/o de FoxO3a.

En primer lugar decidimos comprobar si en nuestro sistema de estudio –células endoteliales primarias- y condiciones experimentales, SIRT1 era capaz de modificar el nivel de acetilación de PGC-1 α y de FoxO3a.

Para ello analizamos la acetilación de ambos factores en células BAEC en presencia de nicotinamida, un inhibidor de SIRT1. Este compuesto se genera como producto intermediario en la reacción de deacetilación catalizada por SIRT1 y otras sirtuinas, siendo capaz de inhibir su actividad enzimática por un mecanismo de retroalimentación negativa (Bitterman et al., 2002).

Cabe reseñar que, como los niveles endógenos de PGC-1 α en el endotelio son muy bajos (Valle et al., 2005), fue necesario sobre-expresar este factor para poder inmunoprecipitarlo eficientemente y detectar variaciones en su nivel de acetilación. Para ello, y únicamente en las inmunoprecipitaciones de PGC-1 α , las células BAEC se infectaron con un adenovirus de sobre-expresión de esta proteína (Ad-GFP-PGC-1 α) previamente a la adición de nicotinamida. Tras el tratamiento de las células con dicho inhibidor, se obtuvieron extractos totales de proteína a partir de los cuales se inmunoprecipitó PGC-1 α o FoxO3a, para a continuación determinar los niveles de la forma total y acetilada de estas proteínas mediante Western Blot, utilizándose un anticuerpo específico para detectar proteínas modificadas por acetilación en residuos de lisina.

Tal y como se muestra en la Figura 31.A (panel izquierdo), al inhibir SIRT1 se observó un incremento en la cantidad de proteína PGC-1 α total inmunoprecipitada, resultado que sugiere que SIRT1 podría estar implicada en la regulación negativa de los niveles celulares de PGC-1 α cuando este coactivador transcripcional se encuentra sobre-expresado.

Resultados

Asimismo, el tratamiento con nicotinamida causó un aumento en la acetilación de PGC-1 α (panel derecho), lo que indica que SIRT1 es capaz de deacetilar a esta proteína en células endoteliales. Hay que destacar también el hecho de que en los inmunoprecipitados de PGC-1 α se observan bandas de alto peso molecular acetiladas, que son más abundantes en los lisados procedentes de células tratadas con el inhibidor de SIRT1 que en células control. Se ha descrito previamente que PGC-1 α puede ser ubiquitinado y enviado a degradación por el proteasoma, siendo la acetilación una de las modificaciones que podría inducir la degradación de esta proteína (Anderson et al., 2008; Olson et al., 2008). Teniendo en cuenta estas observaciones, es posible que las bandas de alto peso molecular observadas correspondan a especies ubiquitinadas de PGC-1 α , y que por tanto la acetilación pueda estar jugando un papel en la activación de los mecanismos de poliubiquitinación y degradación por el proteasoma de esta proteína.

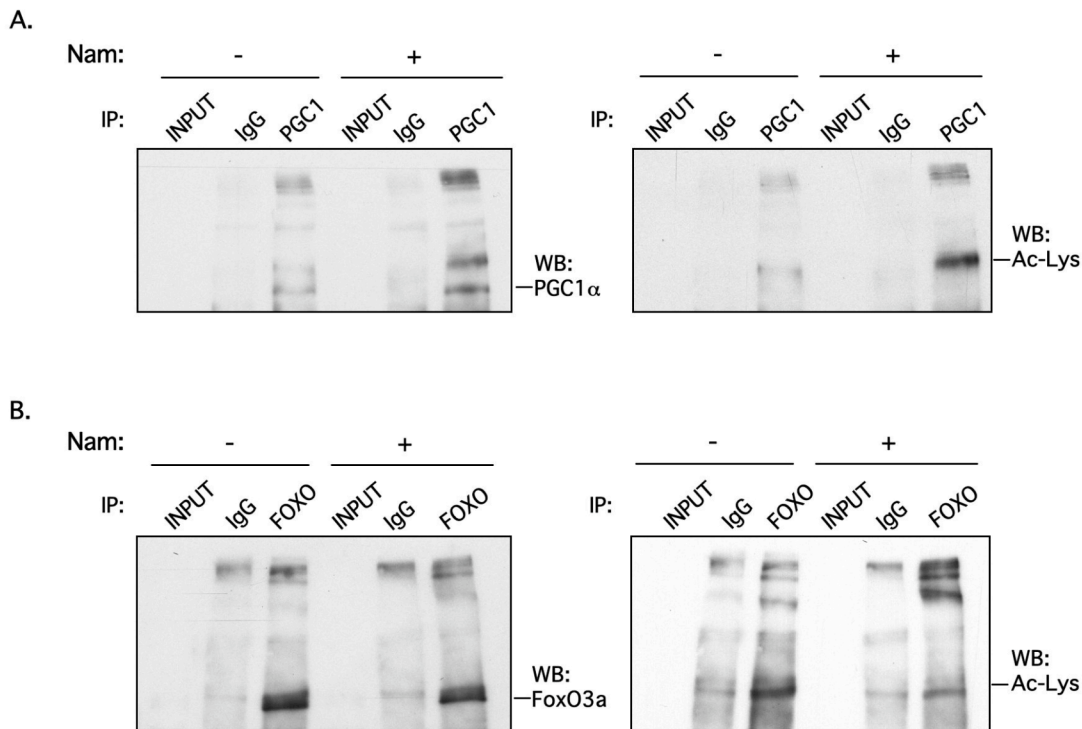


Figura 31. SIRT1 deacetila a PGC-1 α en células endoteliales. (A) Células BAEC se infectaron durante 12-16 h con el adenovirus de sobre-expresión de PGC-1 α (Ad-GFP-PGC-1 α). Transcurridas 8 h desde la infección, las células se trataron con nicotinamida 10 mM (Nam) durante 15 h; extractos totales de proteína se sometieron a inmunoprecipitación (IP) con anticuerpo anti-PGC-1 α (PGC1) o IgG normal de conejo como control (IgG). Las muestras se analizaron por Western Blot (WB) con el anticuerpo anti-PGC-1 α (**panel izquierdo**) o un anticuerpo que detecta proteínas acetiladas en residuos de lisina (Ac-Lys) (**panel derecho**). **(B)** Células BAEC se trataron durante 15 h con nicotinamida 10 mM, se obtuvieron extractos totales de proteína y se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-FoxO3a (FOXO) o IgG de conejo. Las muestras se analizaron por WB con el anticuerpo anti-FoxO3a (**panel izquierdo**) o anti-Ac-Lys (**panel derecho**). *INPUT*: extracto celular total no sometido a inmunoprecipitación.

En el caso de FoxO3a (Figura 31.B), el tratamiento con nicotinamida redujo ligeramente los niveles totales de proteína (panel izquierdo), resultado que concuerda con la

observación previa de que SIRT1 aumenta la expresión de este factor de transcripción. En cuanto a la forma acetilada, no se observó el esperado aumento en el nivel de acetilación en respuesta al tratamiento con el inhibidor de SIRT1 (panel derecho). No obstante, sí se observó un incremento en el material inmunoprecipitado de alto peso molecular, que estaba fuertemente acetilado y que podría corresponderse con formas poliubiquitinadas de FoxO3a, descrito con anterioridad como sustrato de ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Plas and Thompson, 2003). Por tanto, y aunque no hayamos observado de forma directa un incremento en la acetilación de FoxO3a en células tratadas con nicotinamida, los resultados obtenidos sugieren que SIRT1 podría estar implicada en la modulación del estado de acetilación de esta proteína, y que, al igual que en el caso de PGC-1 α , la acetilación podría constituir una marca para la inducción de la poliubiquitinación y degradación de FoxO3a.

Tomados en su conjunto, los experimentos realizados sugieren que PGC-1 α , y probablemente FoxO3a, son deacetilados por SIRT1 en células endoteliales primarias. Por tanto, estos datos apoyan la hipótesis de que SIRT1 puede actuar como modulador de la actividad de estos dos reguladores transcripcionales en nuestro sistema. Asimismo, SIRT1 parece estar relacionada con la modulación de los niveles celulares de ambas proteínas, quizás mediante la regulación de su ubiquitinación y degradación por el proteasoma; SIRT1 actuaría previniendo la poliubiquitinación y degradación tanto de FoxO3a como de PGC-1 α , aunque en el caso de PGC-1 α este efecto parece solaparse con otro que promueve la disminución en los niveles de este coactivador cuando éste se sobre-expresa. La relevancia funcional de esta regulación está aún por determinar.

El tratamiento con H₂O₂ induce la deacetilación de PGC-1 α y de FoxO3a por SIRT1

Dado que la nicotinamida puede inhibir la actividad de otras sirtuinas aparte de SIRT1, y con el fin de confirmar que esta enzima es responsable de modular el estado de acetilación y la estabilidad tanto de PGC-1 α como de FoxO3a, decidimos evaluar de forma directa su actividad sobre ambas proteínas. Para ello, analizamos el efecto de la sobre-expresión de SIRT1 sobre el estado de acetilación de PGC-1 α y FoxO3a en condiciones basales y en presencia de estrés, situación en la que se ha descrito previamente que aumenta tanto la actividad de SIRT1 como su asociación con FoxO3a (Brunet et al., 2004; Hasegawa et al., 2008).

Células BAEC se co-infectaron con el vector adenoviral que dirige la sobre-expresión de SIRT1 (Ad-SIRT1) y el vector de sobre-expresión de PGC-1 α (Ad-GFP-PGC-1 α). Tras el tratamiento de las células con H₂O₂ 50 μ M durante 4 horas, se obtuvieron extractos celulares totales a partir de los cuales se inmunoprecipitó PGC-1 α con un anticuerpo

Resultados

específico. Los niveles de PGC-1 α acetilado, así como la cantidad de proteína total inmunoprecipitada, se determinaron por Western Blot.

Como se muestra en la Figura 32, la sobre-expresión de SIRT1 en condiciones basales causó una disminución en los niveles de proteína PGC-1 α total (panel izquierdo superior), efecto que no se observó en condiciones de estrés, donde los niveles totales de esta proteína aumentaron ligeramente al sobre-expresar SIRT1 (panel derecho superior). Además, el nivel de acetilación de PGC-1 α no disminuyó de forma significativa por la expresión de SIRT1 en ausencia de estrés (panel izquierdo inferior), pero sí en células tratadas con peróxido de hidrógeno (panel derecho inferior).

Los resultados obtenidos sugieren que la presencia de un agente inductor de estrés oxidativo como el H₂O₂ promueve la deacetilación de PGC-1 α por SIRT1 en células endoteliales. Asimismo, apoyan la idea de que SIRT1 puede modular tanto positiva como negativamente los niveles celulares de PGC-1 α , dependiendo de la presencia o no de una situación de estrés en la célula.

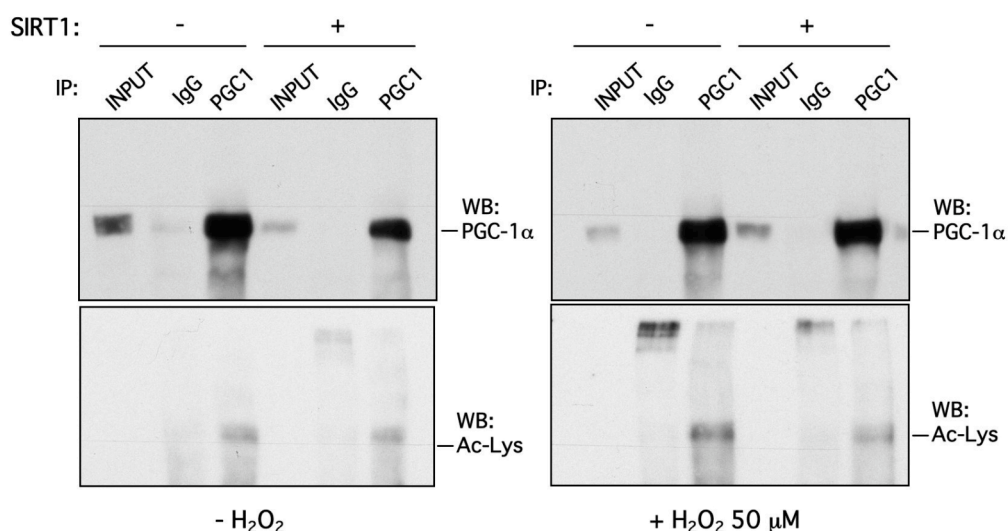


Figura 32. SIRT1 deacetila a PGC-1 α en respuesta al tratamiento con H₂O₂. Células BAEC se infectaron simultáneamente con los vectores adenovirales Ad-SIRT1 (o su control Ad-Shuttle) y Ad-GFP-PGC-1 α durante 12-16 horas. A las 24 horas de la infección, las células se mantuvieron durante 4 horas en ausencia (**panel izquierdo**) o presencia (**panel derecho**) de H₂O₂ 50 μM. Posteriormente se obtuvieron extractos celulares totales que se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo específico anti-PGC-1 α (PGC1) o IgG normal de conejo como control (IgG). A continuación las muestras se analizaron por Western Blot con los anticuerpos indicados. *INPUT*: extracto celular total no sometido a inmunoprecipitación

De la misma forma, células BAEC se infectaron simultáneamente con el vector de sobre-expresión de SIRT1 (Ad-SIRT1) y el vector Ad-FoxO3a-WT. Este adenovirus permite la sobre-expresión de la forma nativa de la proteína FoxO3a marcada con el péptido HA para facilitar su detección. Tras someter a las células a deprivación de suero (0,5% de FBS) con el fin de promover la translocación de FoxO3a al núcleo, donde es activo, se trataron con H₂O₂ 50 μM durante 4 horas. Posteriormente se obtuvieron extractos celulares totales a

partir de los cuales se inmunoprecipitó FoxO3a con un anticuerpo específico frente a HA. Mediante Western Blot se analizaron los niveles de la proteína FoxO3a total y acetilada.

En la Figura 33 se puede observar que, en condiciones basales, los niveles de proteína FoxO3a totales aumentaron ligeramente al sobre-expresar SIRT1 (panel izquierdo superior). Sin embargo, en este caso (0,5 % FBS), y a diferencia de lo mostrado en la Figura 31.B (20 % FBS), en ausencia de estrés no se detectó la forma acetilada de FoxO3a (panel izquierdo inferior). Como consecuencia de la exposición de las células al H_2O_2 , los niveles de FoxO3a total disminuyeron drásticamente, aumentando de forma considerable al expresar SIRT1 (panel derecho superior). Además, en condiciones de estrés oxidativo sí fue posible identificar la banda correspondiente a la proteína FoxO3a acetilada; esta banda desapareció al sobre-expresar SIRT1 (panel derecho inferior).

Los ensayos realizados indican que en respuesta al estrés FoxO3a se acetila, como ya se ha descrito previamente (Brunet et al., 2004), y sus niveles celulares disminuyen. Asimismo, sugieren que en condiciones de estrés oxidativo SIRT1 puede tanto deacetilar como estabilizar a la proteína FoxO3a en células endoteliales.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos en los experimentos de inmunoprecipitación de proteínas, unidos a la observación de que SIRT1 puede inducir la expresión de PGC-1 α y FoxO3a a nivel de ARNm, apoyan la idea de que SIRT1 puede actuar como moduladora de la actividad de estos dos reguladores transcripcionales mediante su deacetilación y estabilización/inducción en respuesta a situaciones de estrés oxidativo.

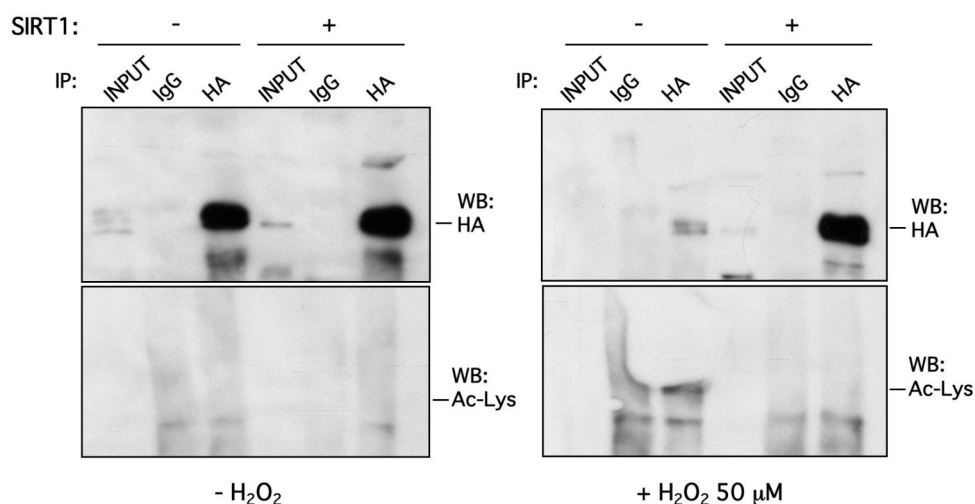


Figura 33. El tratamiento con H_2O_2 induce la deacetilación de FoxO3a por SIRT1 en BAEC. Células BAEC se co-infectaron con los vectores adenovirales Ad-SIRT1 (o su control Ad-Shuttle) y Ad-FoxO3a-WT durante 12-16 horas. A las 24 horas de la infección, y tras un período de 12-16 horas en privación de suero (0,5% FBS), las células se mantuvieron durante 4 horas en ausencia (**panel izquierdo**) o presencia (**panel derecho**) de H_2O_2 50 μ M. Posteriormente se obtuvieron extractos celulares totales que se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo específico anti-HA (HA) o IgG normal de conejo como control (IgG). A continuación las muestras se analizaron por Western Blot con los anticuerpos indicados. *INPUT*: extracto celular total no sometido a inmunoprecipitación

DISCUSIÓN

La disfunción del endotelio vascular contribuye al inicio y a la progresión de los procesos ateroscleróticos, ya que favorece la vasoconstricción, aumenta la permeabilidad del endotelio y promueve la adhesión y activación leucocitaria. El daño endotelial y la respuesta inflamatoria generada pueden estimular la migración y proliferación de las células de la musculatura lisa, que se acumulan contribuyendo al engrosamiento de la pared arterial. A largo plazo, este conjunto de procesos tiene como resultado la aparición de una lesión, la placa de ateroma, que invade el lumen del vaso y que puede llegar a desprenderse y bloquear el flujo sanguíneo (Ross, 1999).

Numerosas evidencias obtenidas a partir de modelos animales y estudios en humanos apuntan a que el exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno constituye uno de los principales mecanismos que promueven el daño endotelial y el inicio y mantenimiento de la aterosclerosis (Cersosimo and DeFronzo, 2006; Wadsworth, 2008). El papel clave de los ROS en la patología vascular pone de manifiesto la relevancia del estudio de los sistemas de protección frente al estrés oxidativo, así como de sus mecanismos de regulación, en la célula endotelial, tanto para profundizar en el conocimiento de este tipo de procesos como para facilitar la búsqueda de posibles estrategias farmacológicas que posibiliten su tratamiento y prevención.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto el papel clave del coactivador transcripcional PGC-1 α en el control de un conjunto de genes que están implicados en la protección de la célula endotelial frente a condiciones de estrés oxidativo. En el presente trabajo se propone que el factor de transcripción FoxO3a actúa también como regulador del programa antioxidante en el endotelio vascular y que forma junto con el coactivador PGC-1 α un complejo funcional responsable de la regulación coordinada de los genes de protección frente a estrés. Nuestros resultados sugieren que la enzima deacetilasa SIRT1 podría estar implicada en la modulación de la formación y/o actividad de dicho complejo transcripcional en células endoteliales.

FoxO3a actúa como regulador de la homeostasis de los ROS en el endotelio vascular

Para iniciar la caracterización del posible papel de FoxO3a en la regulación del sistema de protección frente a estrés oxidativo en el endotelio, se realizaron experimentos de expresión de una forma mutante de esta proteína que es constitutivamente activa dado que no es susceptible de fosforilación por Akt.

Estudios previos habían demostrado la implicación de FoxO3a en la regulación directa de tres enzimas que participan en la detoxificación de los ROS. En el año 2002 se describió el efecto inductor de este factor de transcripción sobre la expresión de la MnSOD

en células 293T (Kops et al., 2002a) y de la catalasa en células tumorales de rata PC12 (Nemoto and Finkel, 2002); posteriormente Chiribau y colaboradores identificaron a la peroxirredoxina 3 como diana de FoxO3a en fibroblastos cardiacos humanos (Chiribau et al., 2008).

Los ensayos realizados con la forma constitutivamente activa de FoxO3a en células HUVEC sugieren que la regulación de la MnSOD, la catalasa y la Prx3 por este factor de transcripción también tiene lugar en células endoteliales primarias, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Asimismo, muestran la participación de FoxO3a en el control de la expresión de otros componentes clave de la defensa antioxidante, incluyendo a las enzimas detoxificantes de ROS peroxirredoxina 5, tioredoxina 2 y tioredoxina reductasa 2, y a la proteína desacoplante UCP-2, importante reguladora de la formación de especies reactivas de oxígeno a nivel de la mitocondria. Por tanto, nuestros resultados indican que FoxO3a actúa regulando positivamente la expresión de un todo un conjunto de genes implicados en la protección frente al estrés oxidativo de origen mitocondrial en el endotelio.

Los datos obtenidos muestran asimismo que FoxO3a es capaz de inducir la expresión del coactivador transcripcional PGC-1 α . PGC-1 α ha sido descrito previamente como un modulador positivo del sistema de detoxificación mitocondrial en el endotelio vascular. Su sobre-expresión en células endoteliales primarias reduce los niveles intracelulares de ROS y previene la muerte celular por apoptosis que se produce como consecuencia de la exposición a condiciones de estrés oxidativo (Valle et al., 2005). Por tanto, es posible que al menos parte del efecto inductor observado para FoxO3a sobre el programa de defensa antioxidante esté mediado por la actividad reguladora de este factor de transcripción sobre la expresión de PGC-1 α .

Con el fin de determinar si FoxO3a ejerce un efecto directo sobre la transcripción de los genes antioxidantes, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina. Estos ensayos mostraron la asociación de este factor de transcripción a las regiones promotoras de todos los genes diana analizados salvo en el caso de la tioredoxina reductasa 2, que no pudo ser analizada. Asimismo, FoxO3a es capaz de asociarse al promotor de PGC-1 α . Así pues, los resultados obtenidos sugieren que tanto los genes de protección frente a estrés como PGC-1 α son dianas directas del regulador FoxO3a. Hay que resaltar que los ensayos de ChIP realizados revelaron la asociación de FoxO3a a las mismas regiones de los promotores de los genes antioxidantes, o a regiones solapantes, que habíamos caracterizado anteriormente para la unión de PGC-1 α (Valle et al., 2005), lo que sugería una posible cooperación entre ambos factores en la regulación del programa de defensa frente al estrés.

Es importante señalar que en estudios previos realizados en el laboratorio se había observado que la sobre-expresión de PGC-1 α induce a su vez un aumento en los niveles de

proteína FoxO3a. Este efecto no se corresponde con un incremento en los niveles de ARNm, por lo que parece ser de tipo post-transcripcional. Además, afecta preferentemente a la forma no fosforilada o activa de la proteína FoxO3a, de manera que PGC-1 α podría actuar estabilizando esta forma de la proteína o bloqueando su fosforilación, dado que la forma fosforilada o inactiva es diana de la maquinaria de ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Por tanto, es posible que los efectos de PGC-1 α sobre el programa de defensa frente a estrés estén mediados tanto por su asociación directa a las regiones promotoras de los genes antioxidantes, como por una elevación/estabilización de los niveles de proteína FoxO3a. La regulación mutua observada entre ambos factores es una evidencia más que apoya la hipótesis de que FoxO3a y PGC-1 α están actuando de forma conjunta en el control transcripcional del sistema de protección frente a estrés oxidativo, y quizá también de otros procesos celulares en cuya regulación están implicados.

La importancia de FoxO3a para el mantenimiento de los niveles del sistema de protección frente a estrés y del coactivador PGC-1 α se puso de manifiesto mediante los experimentos de silenciamiento génico en HUVEC. La interferencia de la expresión de FoxO3a provocó una reducción en los niveles de ARNm de todos los componentes del sistema antioxidante, así como de PGC-1 α . Estos resultados indican que la presencia del factor FoxO3a endógeno es necesaria para la inducción de la maquinaria de defensa frente a los ROS. Asimismo, sugieren que la ausencia de FoxO3a no parece compensarse por otros factores FoxO también presentes en el endotelio, como FoxO1 y FoxO4, implicados en el control de diversos aspectos de la función endotelial -como la angiogénesis y la proliferación de la células endoteliales, respectivamente- y relacionados también previamente con la resistencia al estrés oxidativo (Dejana et al., 2007; Potente et al., 2005; Tothova et al., 2007).

Aunque hemos centrado nuestro estudio en la caracterización de la actividad reguladora de FoxO3a en el endotelio, también evaluamos si el efecto observado para este factor sobre la maquinaria de detoxificación de ROS tenía lugar en otros sistemas celulares. Los ensayos realizados en fibroblastos embrionarios procedentes de ratones control (FoxO3a^{+/+}) y ratones deficientes en el gen de FoxO3a (FoxO3a^{-/-}) mostraron que los niveles de expresión tanto de PGC-1 α como de los genes de protección frente a estrés están reducidos cuando FoxO3a no está presente, en consonancia con los resultados obtenidos en los experimentos de silenciamiento génico en HUVEC. Esta reducción en respuesta a la ausencia crónica de FoxO3a indica la relevancia fisiológica de la regulación del sistema antioxidante por este factor de transcripción. Asimismo, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que no se trata de un fenómeno restringido al endotelio vascular, sino que probablemente sea relevante también en otros tejidos. De acuerdo con estos datos, Tothova y colaboradores han descrito una disminución en la expresión de genes asociados

con la respuesta celular al estrés, así como un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, en células madre hematopoyéticas (HSC) aisladas a partir de ratones deficientes en FoxO (Tothova et al., 2007). En este trabajo se puso de manifiesto la relevancia *in vivo* del control de los ROS por FoxO, al mostrar que el exceso de especies reactivas de oxígeno en las HSC de ratones FoxO^{-/-} origina una deficiencia en su capacidad autoregenerativa *in vivo*, efecto revertido por el tratamiento de estos animales con agentes antioxidantes.

Las evidencias obtenidas en los experimentos realizados con la forma constitutivamente activa de FoxO3a y en los ensayos de pérdida de función, nos llevaron a investigar si el efecto que este factor de transcripción ejerce sobre la expresión de los genes antioxidantes tiene como consecuencia una alteración en los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno. Los experimentos de citometría de flujo realizados en HUVEC muestran unos niveles de ROS menores en células que expresan la forma constitutivamente activa de FoxO3a que en células control. La disminución observada en los niveles de ROS podría atribuirse en principio tanto a una menor producción de especies reactivas a nivel de la cadena de transporte electrónico mitocondrial como a una capacidad de detoxificación incrementada de las células en estas condiciones, o incluso a ambas situaciones. Se ha observado que FoxO3a induce la expresión tanto de enzimas que actúan detoxificando los ROS generados en la cadena de transporte electrónico, como la MnSOD y la catalasa, como de la proteína UCP-2, que disminuye la producción de anión superóxido en la mitocondria; por tanto, ambos mecanismos podrían estar operando de forma conjunta. El hecho de que las células que expresan FoxO3a-TM presenten un potencial de membrana incrementado paralelamente a unos niveles disminuidos de ROS sugiere que el aumento en la capacidad de detoxificación celular en estas condiciones compensa con creces el incremento en la producción de ROS que se asocia generalmente a un aumento en el flujo electrónico a través de la ETC, siendo el efecto final una reducción en los niveles de especies reactivas de oxígeno. Las razones últimas del aumento en el potencial de membrana nos son desconocidas, pero podrían estar relacionadas con el aumento en los niveles de PGC-1 α , factor que, como ya se ha descrito previamente, aumenta la actividad y el potencial de membrana mitocondrial (Sano et al., 2004; Soriano et al., 2006; St-Pierre et al., 2003; Valle et al., 2005; Wu et al., 1999).

Trabajos previos han demostrado que los FoxO juegan un papel clave en los procesos de vasculogénesis, angiogénesis y diferenciación de la célula endotelial (Dejana et al., 2007; Paik et al., 2007; Potente et al., 2005). Tomados en su conjunto, nuestros resultados aportan evidencias que apuntan a una nueva función de estos factores en el endotelio: la regulación de la homeostasis de los ROS y de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo. Los datos obtenidos sugieren por tanto que FoxO podría ejercer

un papel protector frente al desarrollo de la aterosclerosis, proceso claramente asociado a la elevada producción de ROS en la célula endotelial. Asimismo, plantean la posibilidad de que la actividad descrita para FoxO en angiogénesis esté mediada por su papel como regulador de los niveles de ROS.

Varios estudios han descrito que las especies reactivas de oxígeno funcionan como moléculas señalizadoras que actúan mediando los procesos de angiogénesis en condiciones fisiológicas (cierre de heridas) (Duval et al., 2003) y patológicas (crecimiento tumoral) (Ushio-Fukai and Nakamura, 2008; Wu, 2006). Tanto la activación de la vía PI3K/Akt (Wu, 2006) como un aumento en los niveles de ROS (Bucci *et al.*, 2005; Polytarchou and Papadimitriou, 2005) parecen ser procesos necesarios para la angiogénesis dependiente de óxido nítrico (NO), VEGF e hipoxia. Asimismo, se ha propuesto que la angiogénesis endotelial requiere la inactivación de los factores FoxO por Akt (Hosaka et al., 2004; Potente et al., 2005). En base a estos datos y al papel que hemos descrito tanto para FoxO3a como para PGC-1 α en el control del metabolismo de los ROS en el endotelio, en nuestro laboratorio decidimos evaluar si la supresión de la expresión de PGC-1 α por óxido nítrico (Borniquel *et al.*, 2006) podría estar también implicada en la regulación de los niveles de ROS y la activación de los procesos de migración endotelial en respuesta a NO. Los resultados que se han obtenido hasta la fecha sugieren que PGC-1 α es un regulador negativo de la migración endotelial en respuesta a NO y que la modulación negativa de la expresión de PGC-1 α por NO a través de la vía PI3K/Akt/FoxO3a provoca un aumento en los niveles de ROS que media, al menos en parte, la respuesta al NO de la célula endotelial.

Los datos presentados en esta primera parte del trabajo concuerdan con estudios realizados anteriormente en otros sistemas celulares que proponen un papel protector de FoxO3a frente a situaciones donde los niveles de ROS están elevados. Entre estos trabajos destacan el de Kops y colaboradores, que muestra que FoxO3a protege a células quiescentes del daño por estrés oxidativo (Kops et al., 2002a), y más recientemente el de Tothova y colaboradores, que propone a los factores FoxO como mediadores clave de la resistencia al estrés y el mantenimiento del nicho de células madre hematopoyéticas (Tothova et al., 2007). Asimismo, el hecho de que los FoxO sean capaces de regular la expresión de genes de parada de ciclo celular (Medema et al., 2000) y de reparación de daños en el ADN (Tran et al., 2002) apoya el papel de estos factores como reguladores clave de la resistencia al estrés.

Sin embargo, hay que destacar que varios miembros de la familia FoxO están también implicados en la regulación de vías que en principio se oponen a las mencionadas, como la pro-apoptótica, mediante la inducción de la expresión de genes como Bim o Fas ligando (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2000). El hecho de que regulen funciones celulares aparentemente tan dispares refleja la dualidad de los factores FoxO. Se ha

propuesto que la activación de estos reguladores en presencia de una fuente de estrés (Brunet et al., 2004; Essers et al., 2004), podría promover distintos tipos de respuesta, de muerte o de reparación del daño y supervivencia, en función del tipo o de la intensidad del estímulo. Aunque de momento no existen evidencias claras de cuáles son los mecanismos que determinan el que FoxO promueva de forma selectiva un tipo de respuesta u otro, se ha sugerido que su interacción con determinados factores de transcripción y coactivadores, así como su deacetilación por la sirtuina SIRT1, puede influir en la activación específica de sus genes diana (Calnan and Brunet, 2008).

FoxO3a y PGC-1 α actúan conjuntamente en la regulación de los genes de la defensa antioxidante

Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito que el regulador transcripcional PGC-1 α actúa como modulador positivo del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial en células endoteliales y en otros tipos celulares (Kukidome et al., 2006; St-Pierre et al., 2006; Valle et al., 2005). Como coactivador transcripcional, PGC-1 α no puede unirse directamente al ADN y necesita interaccionar con factores específicos para regular la expresión de distintos grupos de genes diana en respuesta a diferentes estímulos. Numerosos factores de transcripción han sido identificados como *binding partners* de PGC-1 α en la regulación de múltiples vías, permitiendo el reclutamiento de este coactivador a las regiones promotoras de sus genes diana de forma específica de tejido (Finck and Kelly, 2006). A pesar del papel bien establecido de PGC-1 α como regulador del sistema de defensa antioxidante, al iniciar este trabajo se desconocían los factores de transcripción que se asocian con PGC-1 α y median sus efectos sobre los genes de detoxificación de ROS. Nuestros resultados sugieren que un factor de transcripción clave podría ser FoxO3a.

PGC-1 α se induce en las células como consecuencia del tratamiento con agentes inductores de estrés oxidativo como el H₂O₂ (Irrcher et al., 2009; St-Pierre et al., 2006). Se ha propuesto que esta inducción está mediada por los factores de transcripción CREB (St-Pierre et al., 2006) y USF-1 (Irrcher et al., 2009). La presencia de una fuente de estrés oxidativo promueve asimismo la relocalización de los FoxO al núcleo, donde son activos como factores de transcripción (Brunet et al., 2004); este efecto parece estar mediado por las proteínas quinasas de respuesta a estrés JNK y MST1 (Essers et al., 2004; Lehtinen et al., 2006) y por la deacetilasa SIRT1 (Brunet *et al.*, 2004). Los ensayos de expresión de FoxO3a-TM y de silenciamiento génico que hemos realizado, así como los análisis de CHIP anteriormente comentados, muestran que la expresión de PGC-1 α está fuertemente

regulada por FoxO3a, lo que hace sospechar que este factor de transcripción podría estar también implicado en la inducción de la expresión de PGC-1 α en condiciones de estrés.

Según nuestros resultados, la presencia de FoxO3a parece ser clave para el mantenimiento de unos niveles de expresión normales del coactivador PGC-1 α . Anteriormente, otro miembro de la subfamilia FoxO, el FoxO1a, había sido descrito como regulador positivo de PGC-1 α , uniéndose a las secuencias de respuesta a insulina en su promotor (Daitoku et al., 2003). FoxO1a muestra una alta homología con FoxO3a y reconoce las mismas secuencias consenso en el ADN. El hecho de que dos miembros distintos de la subfamilia FoxO regulen la expresión de PGC-1 α apoya la idea de que debe existir una importante relación funcional entre los factores FoxO y PGC-1 α . Estudios previos habían descrito a su vez que FoxO1a es capaz de interactuar con PGC-1 α y cooperar con éste en la regulación de genes implicados en gluconeogénesis y en la biosíntesis de grupos hemo en el hígado (Handschin et al., 2005; Puigserver et al., 2003).

Finalmente, experimentos previos de nuestro laboratorio habían mostrado que PGC-1 α puede estabilizar a la proteína FoxO3a en su forma activa o desfosforilada. La co-regulación observada entre FoxO3a y PGC-1 α sugiere por tanto que ambos factores pueden estar relacionados funcionalmente y estar implicados en la modulación de programas biológicos comunes. De acuerdo con estos datos, se ha descrito que varios factores de transcripción que son *binding partners* de PGC-1 α , como PPAR γ , PPAR δ o ERR α pueden también inducir su expresión (Hondares et al., 2006; Hondares et al., 2007; Huss et al., 2002), pudiendo representar estos “bucles” de regulación un grado adicional de especificidad en el control de vías biológicas determinadas.

Para analizar la posible cooperación entre FoxO3a y PGC-1 α en el control de los genes de la defensa antioxidante, se evaluó si cada uno de estos factores dependía de la presencia del otro para ejercer su actividad sobre el sistema de protección frente a estrés.

Los ensayos de sobre-expresión de PGC-1 α realizados en células MEF procedentes de animales control o *knock-out* para FoxO3a muestran cómo la ausencia de este factor provoca una disminución o incluso supresión total del efecto de PGC-1 α sobre la transcripción de todos los genes estudiados del sistema de defensa frente a los ROS. El efecto observado se valoró a nivel de proteína mediante el silenciamiento de la expresión de FoxO3a con un ARN de interferencia específico, observándose el mismo patrón de respuesta en el caso de las enzimas MnSOD, Prx3, Prx5, Trx2 y TR2. El efecto sobre las proteínas UCP-2 y catalasa no pudo ser evaluado (datos no mostrados), probablemente debido a que, por un mecanismo que desconocemos, las condiciones de privación de suero afectan a la regulación de la catalasa por PGC-1 α y disminuyen los niveles celulares de UCP-2. Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos indican que la presencia de FoxO3a es clave para la

inducción por PGC-1 α de la maquinaria de detoxificación de los ROS mitocondriales, sugiriendo que FoxO3a podría actuar como *partner* de PGC-1 α en esta regulación.

De forma similar, se evaluó el efecto de PGC-1 α sobre la transcripción génica dependiente de FoxO3a. Para ello se utilizaron células MEF y MAEC aisladas a partir de ratones *wild-type* o deficientes en PGC-1 α .

Nuestros datos indican que las células PGC-1 α ^{-/-} presentan una expresión basal disminuida de varios componentes del sistema de defensa antioxidante, así como unos niveles aumentados de ROS. La observación de que, tanto a nivel de ARNm como de proteína, los niveles de algunas de las enzimas analizadas no están reducidos o incluso se encuentran elevados en ausencia de PGC-1 α (Prx3, Trx2, CAT), podría ser consecuencia de la activación de mecanismos compensatorios en respuesta al mayor estrés oxidativo al que se encuentran sometidas estas células. Algunas de las vías implicadas podrían ser la de ARE (elemento de respuesta antioxidante)/Nrf2 (Mann et al., 2007) y las mediadas por los reguladores transcripcionales AP-1 y NF- κ B (Zhou et al., 2001). Nuestros resultados se correlacionan con los obtenidos por St-Pierre y colaboradores, que describen cómo en distintos tejidos deficientes en PGC-1 α , como el corazón, el cerebro y el tejido adiposo marrón, los niveles de expresión de ciertas enzimas antioxidantes son variables y no siempre disminuyen de forma paralela a los de PGC-1 α (St-Pierre et al., 2006).

Los experimentos de expresión de la forma constitutivamente activa de FoxO3a realizados en células PGC-1 α ^{-/-} muestran que la ausencia de este coactivador se relaciona asimismo con una reducción o cancelación total de la capacidad activadora de FoxO3a sobre los factores de protección frente a estrés, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

En el caso de las MAEC se observaron diferencias entre las células control y las células deficientes en PGC-1 α para todos los factores estudiados, aunque sólo fueron significativas en el caso de la CAT, la Prx3 y la TR2. Probablemente esto se deba a que en estas células el nivel de inducción de las dianas por FoxO3a fue notablemente menor que en fibroblastos o en HUVEC, hecho que podría explicarse por una característica inherente de este tipo celular o ser consecuencia del largo período de tiempo que las MAEC deben mantenerse en cultivo antes de su uso. En el laboratorio hemos observado previamente una correlación entre el número de pase de las células endoteliales primarias y una bajada en la respuesta a la sobre-expresión de PGC-1 α (Borniquel et al., 2006; Valle et al., 2005).

De la misma forma, cabe destacar las diferencias observadas en los dos tipos celulares utilizados (MEF y MAEC) entre los niveles de ARNm y proteína de algunas de las enzimas estudiadas. Así, en respuesta a la infección con el Ad-FoxO3-TM se detectaron pequeñas inducciones de los niveles de ARNm de las tioredoxinas Trx2 y TR2, que a nivel de proteína fueron notablemente mayores. Es posible por tanto la existencia de mecanismos

de regulación post-transcripcional que promuevan un incremento en los niveles de algunas de las proteínas de detoxificación.

Tomados en su conjunto, los datos presentados sugieren que FoxO3a y PGC-1 α cooperan entre sí para regular la expresión de los genes que forman parte del sistema de defensa antioxidante. El hecho de que la capacidad de FoxO3a para reducir los niveles celulares de ROS esté disminuida en ausencia de PGC-1 α pone de manifiesto la relevancia fisiológica de esta cooperación.

Es importante señalar que el grado de dependencia entre ambos factores no parece ser el mismo en la inducción de todas las dianas estudiadas, siendo notablemente menor en el caso de la MnSOD que en el de otras enzimas detoxificantes de ROS. Probablemente otros reguladores transcripcionales participen en la regulación de la expresión de éste y otros genes junto con FoxO3a y PGC-1 α , de forma que la ausencia de uno de estos dos factores no sea suficiente para abolir completamente el efecto inductor del otro. Hay que destacar que otros factores FoxO ejercen también un efecto antioxidante en la célula, como el FoxO1 (Kajihara *et al.*, 2006; Subauste and Burant, 2007; Tothova *et al.*, 2007) y el FoxO4 (Essers *et al.*, 2004; van der Horst *et al.*, 2004). Asimismo, el coactivador PGC-1 β también parece estar implicado en la protección frente al estrés oxidativo (Lelliott and Vidal-Puig, 2009; St-Pierre *et al.*, 2006).

Normalmente, los factores de transcripción y cofactores que forman parte de los sistemas de regulación transcripcional de la expresión génica se ensamblan de forma estable o transitoria en complejos multiproteicos. Dado que PGC-1 α carece de secuencia de unión al ADN, y que este coactivador y FoxO3a parecen depender mutuamente entre sí para regular la expresión del sistema de defensa antioxidante, decidimos analizar si el efecto cooperativo observado está mediado por una interacción directa entre ambos factores.

Para comprobar esta hipótesis se examinó la asociación entre PGC-1 α y FoxO3a en el endotelio. Los estudios de co-inmunoprecipitación realizados indican que estos dos factores forman parte de un mismo complejo proteico. Ensayos de interacción *in vitro* mediante *pull-down* de GST nos permitieron mapear las regiones implicadas en dicha asociación, observándose interacción de la proteína FoxO3a-S³⁵ con el dominio carboxi-terminal (aminoácidos 580-797) de PGC-1 α . Por tanto, los datos obtenidos muestran la capacidad de PGC-1 α y FoxO3a para interactuar directamente tanto *in vivo* como *in vitro*.

Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito que PGC-1 α puede interactuar con otro factor de transcripción *Forkhead*, FoxO1a, en hepatocitos de ratón (Puigserver *et al.*, 2003). De acuerdo con nuestros resultados, Puigserver y colaboradores demostraron que esta asociación tiene lugar a través del dominio C-terminal de PGC-1 α . Por tanto, esta región de la proteína PGC-1 α parece estar implicada en la interacción con

distintos miembros de la familia FoxO, de forma que PGC-1 α podría unirse a uno u otro factor de forma específica de tejido para regular diferentes programas biológicos, como la gluconeogénesis en hígado (FoxO1a) o la protección frente al estrés oxidativo en el endotelio (FoxO3a).

La funcionalidad de la asociación entre PGC-1 α y FoxO3a en células endoteliales se puso de manifiesto mediante los experimentos de transactivación realizados sobre un fragmento de 2 Kb del promotor de *sod2*. Esta región contiene un sitio de unión para FoxO que ha sido descrito con anterioridad (Kops et al., 2002a) y que media la actividad reguladora de este factor de transcripción sobre el promotor del gen de la MnSOD.

Los datos obtenidos muestran que PGC-1 α y FoxO3a pueden activar la transcripción de este promotor de forma sinérgica, lo que sugiere que PGC-1 α puede actuar como coactivador transcripcional de FoxO3a. Es importante destacar que la introducción de una mutación puntual en el sitio de unión para FoxO provoca una reducción drástica en la capacidad transactivadora de PGC-1 α sobre el promotor estudiado. Estos resultados indican que, efectivamente, PGC-1 α requiere la unión de un factor FoxO al promotor de *sod2* para poder regular su expresión y apoyan la hipótesis de que la interacción PGC-1 α -FoxO3a es importante para la co-regulación de los genes de protección frente a estrés.

En base al conjunto de datos mostrados, proponemos que PGC-1 α y FoxO3a forman un complejo proteico responsable de la regulación coordinada del sistema de protección frente al estrés oxidativo de origen mitocondrial y la homeostasis de los ROS. Si bien la asociación PGC-1 α -FoxO3a parece ser clave para la modulación de la expresión de los genes de detoxificación, no podemos obviar que posiblemente la interacción con otros factores también sea importante en esta regulación. Es probable que otros factores de transcripción puedan cooperar con PGC-1 α en la regulación de los genes de estrés, solos o conjuntamente con FoxO3a. De hecho, los factores FoxO suelen asociarse con otros factores de transcripción para regular programas específicos de expresión génica. En este contexto es importante resaltar que se ha propuesto que el receptor α asociado a estrógenos (ERR α) está implicado en la inducción por PGC-1 α de varios genes antioxidantes, como la MnSOD, la Trx2 y las peroxirredoxinas 3 y 5 (Rangwala et al., 2007). Sería por tanto interesante determinar si ERR α puede modular la formación o asociarse al complejo PGC-1 α -FoxO3a en la regulación del programa de defensa antioxidante.

Como se ha mencionado anteriormente, FoxO3a está implicado en el control de una gran variedad de procesos celulares, en ocasiones antagónicos. Dado que, según nuestros resultados, PGC-1 α interacciona funcionalmente con FoxO3a promoviendo la inducción de genes de la defensa antioxidante, planteamos que la asociación PGC-1 α -FoxO3a podría constituir un mecanismo que favorezca vías de resistencia al estrés y supervivencia frente a

vías de muerte celular. En este contexto resultaría de interés estudiar si PGC-1 α es capaz de modular la actividad transcripcional de FoxO3a sobre otros genes diana, especialmente sobre genes pro-apoptóticos como Bim o Fas-ligando, así como analizar si el efecto de PGC-1 α sobre FoxO3a varía en respuesta a condiciones de estrés oxidativo.

El hecho de que PGC-1 α sea capaz de inhibir la capacidad de FoxO3a para inducir la transcripción del gen de la atrogina-1 en músculo (Sandri et al., 2006) apoya la hipótesis de que este coactivador actúa de forma selectiva sobre los genes diana de FoxO3a, pudiendo o bien inducir o bien suprimir su actividad reguladora de la transcripción. Aunque el mecanismo mediador de este efecto se desconoce, una posibilidad es que PGC-1 α provoque un cambio conformacional en FoxO3a que afecte a su habilidad para unirse a ciertas secuencias en el ADN.

PGC-1 α , FoxO3a y SIRT1 en la regulación de la protección frente al estrés oxidativo

Dado el papel que atribuimos al complejo PGC-1 α -FoxO3a en la protección frente al estrés oxidativo, creemos que el estudio de cómo se regula tanto su formación como su actividad puede ser de gran relevancia para profundizar en el conocimiento de los mecanismos que determinan la inducción de respuestas de resistencia o de muerte celular ante estímulos de estrés de distinta clase, intensidad o duración.

Tanto PGC-1 α como FoxO3a se inducen o activan como consecuencia de la elevación de los niveles celulares de ROS en un proceso que se ha propuesto podría estar mediado por la activación de distintas vías de señalización.

La localización nuclear de FoxO se ve incrementada como resultado de la exposición a distintos tipos de estrés, incluyendo el H₂O₂, la menadiona y el choque térmico (Brunet et al., 2004; Wang et al., 2007). Se cree que este efecto podría estar mediado por la activación de quinasas de respuesta a estrés como la JNK (Essers et al., 2004) y la MST-1 (Lehtinen et al., 2006), que promueven la translocación de FoxO al núcleo induciendo su actividad transcripcional sobre genes tanto antioxidantes como pro-apoptóticos. La quinasa activada por AMP (AMPK) es un sensor energético cuya activación en respuesta a estrés está bien demostrada, aunque se desconoce el mecanismo implicado; éste podría ser secundario a una disminución en los niveles de ATP celulares como consecuencia de la bajada en la actividad mitocondrial inducida por los ROS (Hardie and Hawley, 2001). Recientemente se ha descrito que la AMPK fosforila a FoxO3a y aumenta su actividad transcripcional sobre genes implicados en la resistencia al estrés sin modificar su localización subcelular (Greer et al., 2009; Greer et al., 2007b).

Asimismo, se ha descrito que el tratamiento con H₂O₂ induce la expresión de PGC-1 α a través de un mecanismo en el que parece estar implicada la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) (St-Pierre et al., 2006). La inducción de PGC-1 α en respuesta a condiciones de estrés oxidativo también se ha asociado recientemente con la activación de la quinasa AMPK y del factor de transcripción USF-1 (Irrcher et al., 2009). La AMPK es además responsable de la fosforilación directa de PGC-1 α , lo que aumenta de manera aparentemente inespecífica su actividad transcripcional (Jager et al., 2007). Dado que FoxO3a es también diana de AMPK, es posible que esta quinasa actúe regulando la respuesta al estrés a través de la modulación del complejo PGC-1 α -FoxO3a.

Otra quinasa que podría estar implicada en la regulación de la actividad de PGC-1 α en condiciones de estrés es la p38MAPK, dado que se activa en estas condiciones y se ha descrito que fosforila directamente a PGC-1 α , aumentando la estabilidad de la proteína y bloqueando su interacción con el co-represor p160 myb (Fan et al., 2004).

La vía de señalización PI3K/Akt podría constituir también un mecanismo de regulación de la asociación PGC-1 α -FoxO3a en respuesta a estrés, aunque en este caso se trataría de una regulación negativa. Se ha descrito que esta vía se induce por estrés (Pham et al., 2000) y que modula negativamente tanto a FoxO3a (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999) como a PGC-1 α (Li et al., 2007). La activación de PI3K/Akt ha sido asociada con un incremento en los niveles intracelulares de ROS al promover la inactivación de los factores FoxO -vía fosforilación y secuestro en el citoplasma-, lo que impide su efecto inductor de la expresión de proteínas antioxidantes como la MnSOD o la CAT (Dolado and Nebreda, 2008; Nogueira *et al.*, 2008). También se ha demostrado que Akt fosforila e inactiva tanto a FoxO1a como a PGC-1 α en el contexto de la regulación de la gluconeogénesis hepática, disminuyendo la interacción entre ambos factores en respuesta a insulina (Li et al., 2007; Puigserver et al., 2003). La regulación negativa de PGC-1 α por Akt podría ser no sólo directa sino estar también mediada por la inactivación de los factores FoxO que actúan como reguladores transcripcionales directos de la expresión de PGC-1 α , FoxO1a (Daitoku et al., 2003) y FoxO3a (según los datos presentados en este trabajo). Cabe destacar que se ha descrito que la quinasa inducible por suero y glucocorticoides (SGK) parece actuar conjuntamente con Akt mediando los efectos resultantes de la activación de la PI3K, entre ellos la inactivación de FoxO (Brunet et al., 2001).

La glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3) está implicada en la respuesta metabólica al ayuno (Cross *et al.*, 1995). Al igual que PGC-1 α y FoxO, esta enzima es regulada negativamente por Akt y ha sido relacionada previamente con la resistencia al estrés oxidativo (King and Jope, 2005; Koh *et al.*, 2004). Sorprende quizá por ello que Anderson y colaboradores han descrito recientemente que la GSK3 β fosforila a PGC-1 α y regula

negativamente su estabilidad en respuesta a estrés (Anderson et al., 2008). Sin embargo, y de forma quizás más coherente con el sistema, se ha propuesto que en condiciones de estrés oxidativo FoxO3a actúa como regulador negativo de la actividad de la β -catenina cuando ésta se estabiliza tras la inactivación de la GSK3 β (Essers *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2009; Hoogeboom *et al.*, 2008; Liu and Habener, 2008).

Aparte de las vías de señalización que se han descrito y que podrían estar relacionadas con la modulación de la formación/actividad del complejo PGC-1 α -FoxO3a, un factor determinante en el control de los niveles y actividad de estos factores podría ser la deacetilasa dependiente de NAD⁺ SIRT1.

Se ha propuesto que SIRT1 actúa como un sensor de los niveles de energía y del estado redox de la célula, ya que su actividad depende del cociente NAD⁺/NADH, que varía en función del estado metabólico celular (Chua et al., 2005; Fulco et al., 2003; Smith, 2002). Esta deacetilasa ha sido implicada en la protección frente a la apoptosis y en la inducción de vías de supervivencia en respuesta a estrés en distintos tipos celulares, aunque su mecanismo de acción no ha sido completamente elucidado (Alcendor et al., 2004; Parker et al., 2005; Pillai et al., 2005). Hay que señalar que la mayor parte de estudios que han relacionado a SIRT1 con la protección frente al estrés oxidativo están basados en el uso del compuesto polifenólico resveratrol, un activador de SIRT1. No obstante, el resveratrol actúa sobre numerosas dianas en la célula (Pirola and Frojdo, 2008), de forma que posiblemente los efectos observados para este compuesto no sean exclusivamente dependientes de SIRT1, sino que estén mediados por su actividad simultánea sobre múltiples moléculas.

Estudios recientes han propuesto que SIRT1 está implicada en la regulación de dos enzimas de detoxificación de ROS, la manganeso superóxido-dismutasa y la catalasa. Así, se ha sugerido que SIRT1 protege frente al estrés promovido por oxidantes mediante la inducción de la expresión de la MnSOD en cardiomiocitos (Abstract M. Tanno et al, Circulation 2008; 118: S_388) y de la catalasa en células tubulares renales y cardiacas (Alcendor et al., 2007; Hasegawa et al., 2008). Otras sirtuinas han sido también implicadas en la regulación de estas enzimas: se ha descrito que SIRT2 induce la expresión de la MnSOD en fibroblastos embrionarios murinos NIH3T3 (Wang et al., 2007) y que SIRT3 promueve la expresión tanto de la MnSOD como la CAT en cardiomiocitos (Sundaresan et al., 2009).

Por otra parte, se sabe que SIRT1 interacciona funcionalmente y deacetila tanto a PGC-1 α (Nemoto et al., 2005) como a FoxO3a (Motta et al., 2004). La acetilación/deacetilación de PGC-1 α y de FoxO3a parece jugar un papel clave en la regulación de la actividad transcripcional de estos factores. La deacetilación de FoxO3a por SIRT1 cancela su actividad transactivadora sobre genes pro-apoptóticos como Bim, pero no afecta a la regulación de genes relacionados con la protección frente al estrés como GADD45 (Brunet et al., 2004). Cabe destacar que no sólo SIRT1 sino también SIRT2

deacetila a FoxO3a en respuesta a condiciones de estrés como la exposición a H₂O₂ (Brunet et al., 2004; Wang et al., 2007), promoviendo su localización nuclear. Asimismo, se ha descrito que otro miembro de la familia de las sirtuinas, SIRT3, interacciona y deacetila a FoxO3a, induciendo su unión al promotor de la enzima antioxidante MnSOD (Jacobs et al., 2008; Sundaresan et al., 2009). De acuerdo con su posible papel en la protección frente al estrés, el ortólogo de los factores SIRT en *C. elegans*, Sir2, promueve longevidad a través de un mecanismo dependiente de la activación de *sod2* por el factor de transcripción DAF-16, ortólogo de los factores FoxO (Tissenbaum and Guarente, 2001).

La deacetilación de PGC-1 α por SIRT1 es requerida para la actividad inductora de este coactivador sobre genes de gluconeogénesis y β -oxidación de ácidos grasos en condiciones de restricción calórica (Rodgers et al., 2005; Rodgers and Puigserver, 2007). Además, tanto SIRT1 como SIRT3 actúan como reguladores positivos de la expresión de PGC-1 α por mecanismos que aún no están bien caracterizados (Amat et al., 2009; Shi et al., 2005).

Este conjunto de datos, unido a la observación de que, al igual que PGC-1 α y FoxO3a, SIRT1 se induce en respuesta al estrés (Edwards et al., 2003), nos llevó a plantearnos que esta sirtuina podría estar implicada en la modulación de la interacción PGC-1 α -FoxO3a y su función protectora frente a los ROS.

Para comprobar esta hipótesis, comenzamos evaluando el papel de SIRT1 en la regulación de la expresión de los genes del sistema antioxidante en células endoteliales primarias, sistema en el que hemos descrito la actividad protectora de FoxO3a y PGC-1 α y donde esta sirtuina actúa modulando diversos procesos, entre ellos la angiogénesis endotelial por un mecanismo mediado, al menos en parte, por el factor FoxO1 (Potente and Dimmeler, 2008a; Potente et al., 2007).

En consonancia con los datos previos que proponen a SIRT1 como regulador positivo de la expresión de la MnSOD y la CAT en cardiomiocitos y células tubulares renales y cardíacas, los ensayos de sobre-expresión de SIRT1 realizados indican que la regulación de estas dos enzimas por SIRT1 también tiene lugar en el endotelio, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Además, muestran que SIRT1 induce significativamente la expresión de Prx5 y TR2, enzimas hasta el momento no identificadas como dianas de esta sirtuina. El hecho de que los niveles de Prx3, Trx2 y UPC-2 no estén aumentados, o incluso estén disminuidos, en células que sobre-expresan SIRT1 puede indicar que esta deacetilasa modula de forma selectiva la expresión de los distintos miembros del sistema de protección antioxidante, aunque será necesario realizar ensayos de pérdida de función para llegar a una conclusión definitiva. La bajada en los niveles de UPC-2 inducida por SIRT1 ha sido descrita previamente por Bordone y colaboradores en células β -pancreáticas, donde se ha relacionado con la regulación de la secreción de la insulina (Bordone et al., 2006).

Nuestros resultados sugieren por tanto que la deacetilasa SIRT1 puede estar jugando un papel en el control de la expresión de los componentes del sistema de la defensa antioxidante. No hemos analizado por el momento si los niveles de expresión de estos genes se ven alterados en ausencia de SIRT1 o si el efecto regulador positivo de SIRT1 varía en respuesta al estrés oxidativo, por lo que cabe la posibilidad de que en estas condiciones se detecten cambios más acusados en la expresión de dichos genes, o regulaciones de otras dianas que no hemos detectado en los ensayos de sobre-expresión. Sería también interesante evaluar si el efecto observado para SIRT1 sobre el sistema de detoxificación tiene como consecuencia una variación en los niveles intracelulares de ROS y si juega asimismo algún papel en la protección de la célula frente a la apoptosis inducida por agentes oxidantes.

La realización de experimentos de inmunoprecipitación de cromatina sería necesaria para determinar si el efecto regulador de SIRT1 sobre la expresión de los genes de la defensa antioxidante es de tipo directo y está mediado por su unión a los promotores de dichos genes y subsiguiente deacetilación de la cromatina. Este tipo de ensayos permitirían comprobar si SIRT1 se localiza en las mismas regiones promotoras de los genes de detoxificación que PGC-1 α y FoxO3a, lo que apoyaría la posible implicación de esta enzima en la regulación mediada por el complejo PGC-1 α -FoxO3a de los genes de estrés. El análisis simultáneo de los niveles de acetilación de histonas en estos genes permitiría asimismo dilucidar si SIRT1 actúa sobre ellos, al menos en parte, mediante la modificación de la estructura de la cromatina.

Hay que señalar que es posible que el efecto observado para SIRT1 sobre el sistema de defensa antioxidante pueda estar mediado al menos parcialmente por la modulación positiva de la expresión de FoxO3a y de PGC-1 α . Estudios previos han descrito que tanto SIRT1 (Amat et al., 2009) como sus activadores resveratrol y SRT1720 (Feige et al., 2008; Lagouge et al., 2006), así como SIRT3 (Shi et al., 2005), tienen un efecto positivo sobre la expresión del gen PGC-1 α , y que SIRT1 se une a la región proximal del promotor de dicho gen (Amat et al., 2009). De acuerdo con estos datos, hemos observado que la sobre-expresión de SIRT1 en BAEC induce un aumento en los niveles de ARNm de PGC-1 α , así como de FoxO3a. Aunque se trata de experimentos todavía por confirmar, nuestros resultados preliminares apuntan a que, en ambos casos, esta modulación positiva se refleja en un aumento en los niveles de proteína.

Cabe destacar que, como se comenta más adelante, la regulación de FoxO3a y PGC-1 α por SIRT1 parece no tener lugar únicamente a nivel transcripcional, sino que esta enzima también podría estar implicada en la regulación de la estabilidad/degradación de ambas proteínas, como indican los resultados obtenidos en los experimentos con el inhibidor nicotinamida y en los ensayos de sobre-expresión de SIRT1.

Varios estudios previos han relacionado a distintos miembros de las familias FoxO y SIRT en la regulación de los factores de la defensa antioxidante. Así, Alcendor y colaboradores han propuesto que SIRT1 puede proteger a cardiomiocitos del estrés oxidativo en parte mediante la inducción de la catalasa por un mecanismo dependiente de FoxO1 (Alcendor et al., 2007), mientras que se ha descrito que SIRT3 es capaz de promover la unión de FoxO3a al promotor de la MnSOD en células de carcinoma de colon humanas (Jacobs et al., 2008).

En base a estas observaciones, y dados los resultados obtenidos en los experimentos de sobre-expresión de SIRT1, decidimos evaluar a continuación si el efecto observado para SIRT1 sobre los genes de detoxificación requiere la presencia de FoxO3a y/o de PGC-1 α . Los ensayos de sobre-expresión de SIRT1 realizados en células deficientes en FoxO3a o en PGC-1 α muestran que, efectivamente, la presencia de estos dos reguladores transcripcionales es necesaria para la inducción por SIRT1 de la MnSOD, la CAT, la Prx5 y la TR2.

Estos resultados sugieren un posible papel de la sirtuina SIRT1 en el control de la maquinaria de detoxificación de ROS en el endotelio a través de un mecanismo de regulación transcripcional en el que parecen estar implicados los factores FoxO3a y PGC-1 α . Con el fin de profundizar en este posible papel propuesto para SIRT1, sería interesante analizar si la actividad transcripcional de PGC-1 α y de FoxO3a sobre los genes de estrés varía en función de la presencia/ausencia de SIRT1. En este tipo de ensayos podríamos utilizar el vector empleado en los experimentos de cooperatividad entre FoxO3a y PGC-1 α , que contiene el gen de la luciferasa bajo el control de un fragmento del promotor de *sod2*. El uso de la forma mutada de este promotor (que contiene una mutación en el sitio de unión para FoxO) nos permitiría analizar además si el efecto de SIRT1 en la regulación de *sod2* está mediado por la unión de FoxO3a al DBE en el promotor de dicho gen.

Asimismo, los datos obtenidos apoyan la idea de que SIRT1 podría formar parte junto con FoxO3a y PGC-1 α de un mismo complejo regulador de la transcripción de los genes antioxidantes. Para demostrar la existencia de dicho complejo, sería preciso realizar experimentos de co-inmunoprecipitación que permitan determinar la asociación simultánea de SIRT1 a ambos reguladores transcripcionales. También sería interesante estudiar si la formación y actividad de dicho complejo se regula en respuesta a condiciones de estrés.

SIRT1 es una enzima que ejerce sus efectos sobre distintos procesos biológicos a través de la deacetilación de numerosos sustratos. Como se ha mencionado anteriormente, se ha propuesto que esta sirtuina puede deacetilar y modular la actividad transcripcional tanto de PGC-1 α como de FoxO3a (Motta et al., 2004; Nemoto et al., 2005). En base a estos datos, nos planteamos la hipótesis de que el efecto regulador de SIRT1 sobre el

sistema de defensa antioxidante, que parece ser dependiente de PGC-1 α y de FoxO3a, pudiese estar mediado por su actividad deacetilasa sobre estos dos reguladores transcripcionales.

Como primer paso para testar esta hipótesis, decidimos evaluar si SIRT1 puede modificar el estado de acetilación de PGC-1 α y de FoxO3a en células endoteliales. Varios estudios han mostrado anteriormente la deacetilación de PGC-1 α por SIRT1 en células 293T (Rodgers et al., 2005) y células de músculo esquelético (Gerhart-Hines et al., 2007). De acuerdo con estos datos, los ensayos de inmunoprecipitación realizados en BAEC con el inhibidor de SIRT1 nicotinamida mostraron un incremento en la cantidad de proteína PGC-1 α total y acetilada en respuesta al tratamiento con dicho inhibidor, sugiriendo que SIRT1 es capaz de deacetilar al coactivador PGC-1 α también en células endoteliales y que la proteína PGC-1 α acetilada es más estable. Estos datos se confirmaron posteriormente mediante la sobre-expresión de SIRT1, que dio lugar a una disminución tanto en el estado de acetilación de PGC-1 α como en sus niveles de proteína.

El hecho de que los niveles totales de proteína PGC-1 α aumenten al inhibir la actividad de SIRT1 con nicotinamida y disminuyan al sobre-expresar esta enzima podría parecer en principio contradictorio con la observación, comentada anteriormente, de que en condiciones basales SIRT1 induce un incremento en los niveles de ARNm (y probablemente proteína) de PGC-1 α . Esta diferencia podría deberse a que los ensayos con nicotinamida, así como los de acetilación/deacetilación, se realizaron en condiciones de sobre-expresión de PGC-1 α . En experimentos previos realizados en el laboratorio ya habíamos observado que en células donde este coactivador se sobre-expresa de forma ectópica, la expresión de SIRT1 provoca una disminución drástica en los niveles de proteína PGC-1 α (datos no mostrados). Por tanto, el efecto negativo de SIRT1 sobre la estabilidad de PGC-1 α podría sólo ponerse de manifiesto cuando la célula se expone a un nivel anormalmente alto de PGC-1 α .

Por otra parte, cabe destacar que en estos experimentos se observaron una serie de bandas de alto peso molecular en los inmunoprecipitados de PGC-1 α , más abundantes en los lisados procedentes de células tratadas con el inhibidor de SIRT1 que en los de células control. Se sabe que el proceso de marcaje de proteínas para su degradación por el proteasoma implica la poliubiquitinación de la proteína diana por ligasas específicas. Dado que ha sido descrito previamente que PGC-1 α es un sustrato de ubiquitinación y degradación por el proteasoma (Olson et al., 2008; Sano et al., 2007) y se ha sugerido que la deacetilación por SIRT1 previene dicha degradación (Anderson et al., 2008), sería interesante determinar mediante anticuerpos específicos si las bandas de alto peso molecular observadas corresponden a especies ubiquitinadas de PGC-1 α . Si esto se

confirma, el hecho de que dichas especies sean más abundantes en presencia de nicotinamida sería indicativo de una posible implicación de SIRT1 en el *turnover* de PGC-1 α .

Nuestros datos indican por tanto que SIRT1 puede deacetilar y modular los niveles de PGC-1 α en células endoteliales. Estos resultados sugieren que la regulación del sistema de defensa antioxidante por SIRT1 dependiente de PGC-1 α podría estar mediada por la deacetilación de PGC-1 α por esta sirtuina. Para confirmar esta hipótesis, sería interesante evaluar si la actividad transcripcional de PGC-1 α varía en presencia de una forma mutante de SIRT1 defectiva en actividad deacetilasa. Por otra parte, el efecto de SIRT1 sobre PGC-1 α probablemente esté mediado por una asociación entre ambos factores, por lo que sería relevante determinar si ambas proteínas son capaces de interactuar entre sí en el endotelio.

Se ha demostrado que SIRT1 interacciona y deacetila al miembro de la familia *Forkhead* FoxO1 en células HUVEC, inhibiendo así su actividad anti-angiogénica (Potente et al., 2007). Para valorar la actividad deacetilasa de SIRT1 sobre FoxO3a en el endotelio, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a FoxO3a en presencia del inhibidor nicotinamida. Varios trabajos previos han descrito la deacetilación de FoxO3a por SIRT1 *in vitro* (Brunet et al., 2004; Motta et al., 2004; Sundaresan et al., 2009). Hay que señalar que en estos estudios se muestra la deacetilación por SIRT1 de una forma de FoxO3a que ha sido previamente acetilada por las acetil-transferasas PCAF o p300, o en respuesta a una fuente de estrés. Aunque en el trabajo de Motta y colaboradores se sugiere que en condiciones basales la nicotinamida induce un aumento de la acetilación de FoxO3a endógeno, los resultados no son tan claros como cuando se trata a las células con H₂O₂ o se co-transfectan con vectores de expresión de FoxO3a y de p300. Asimismo, en el trabajo de Brunet y colaboradores se describe cómo el tratamiento sólo con nicotinamida no tiene efecto sobre la acetilación de FoxO3a (no detectándose la forma acetilada de esta proteína), mientras que la combinación de nicotinamida con tricostatina A (TSA, inhibidor general de deacetilasas de histonas de clase I y II) produce un aumento en la acetilación de FoxO3a endógeno o expresado de forma ectópica.

En los experimentos realizados observamos una pequeña disminución en los niveles de proteína FoxO3a total en respuesta al tratamiento con el inhibidor nicotinamida. Esta bajada podría ser debida al efecto positivo observado para SIRT1 sobre la expresión de FoxO3a, y es coherente con los resultados obtenidos posteriormente en los experimentos de sobre-expresión de SIRT1, condiciones en las cuales se observó un incremento en los niveles de proteína FoxO3a total. En el caso de FoxO3a, por tanto, SIRT1 parece estar ejerciendo un efecto positivo sobre la expresión de la proteína.

Cabe destacar también la observación de un incremento en el material inmunoprecipitado de alto peso molecular en respuesta al tratamiento con el inhibidor de

SIRT1. Teniendo en cuenta que se ha descrito previamente la degradación de los FoxO por la vía del proteasoma dependiente de ubiquitina (Hu *et al.*, 2004; Plas and Thompson, 2003), estos datos apoyan la idea de que SIRT1 podría ser capaz de regular los niveles de FoxO3a no sólo a nivel transcripcional sino también mediante el control de vías de degradación de esta proteína. El hecho de que el anticuerpo anti-lisina acetilada detectara fundamentalmente bandas de alto peso molecular sugiere que lo que estamos observando es una ubiquitinación selectiva de la forma acetilada de FoxO3a al suprimirse la actividad de las sirtuinas.

De acuerdo con los resultados presentados en los trabajos mencionados anteriormente, no se detectó un aumento significativo en una banda de peso molecular correspondiente a la forma acetilada de FoxO3a en las células tratadas. Sin embargo, el hecho de que el tratamiento con nicotinamida ocasione un incremento en las especies de alto peso molecular en los inmunoprecipitados anti-FoxO3a analizados con el anticuerpo anti-Ac-Lys, nos lleva a pensar que realmente SIRT1 podría estar ejerciendo un efecto sobre el estado de acetilación de FoxO3a en este sistema.

Hay que señalar que los experimentos con nicotinamida se llevaron a cabo en presencia de suero, condiciones en las que la mayor parte de FoxO3a se encuentra en el citoplasma en estado inactivo. Cuando intentamos detectar FoxO3a acetilado en ausencia de suero (ver ensayo de sobre-expresión de SIRT1, condiciones basales), no fuimos capaces de detectar la forma acetilada de la proteína, sugiriendo que los niveles basales de acetilación de FoxO3a son muy bajos en estas condiciones. Este resultado podría indicar que la acetilación de FoxO3a es más activa (o la deacetilación menos) cuando FoxO3a está inactivo en el citosol (fosforilado por Akt), y la acetilación es menos activa (o la deacetilación más) cuando FoxO3a está activo en el núcleo celular (no fosforilado por Akt, fosforilado por JNK, etc), lo cual apoyaría la idea de la existencia de una regulación cruzada entre las quinasas y las deacetilasas y/o una compartimentalización subcelular de la regulación por deacetilación.

Un aspecto relevante que aún no ha sido investigado es si SIRT1 modula el estado de fosforilación de FoxO3a y su localización nuclear. En el caso de FoxO1 sí que se ha propuesto previamente que la deacetilación por SIRT promueve su translocación al núcleo para regular genes de gluconeogénesis, que también son regulados por PGC-1 α (Frescas *et al.*, 2005). Asimismo, debemos recordar que, según nuestros datos, el propio PGC-1 α parece favorecer el estado de activación y la estabilidad de FoxO3a.

Los resultados obtenidos, tomados en su conjunto, sugieren que PGC-1 α , y posiblemente FoxO3a, pueden ser deacetilados por SIRT1 en células endoteliales. Asimismo apuntan hacia una posible implicación de esta enzima en la modulación de los niveles

celulares de ambas proteínas, siendo uno de los mecanismos posibles la regulación de su degradación por el proteasoma por un mecanismo dependiente de ubiquitina.

Es importante reseñar que la nicotinamida no actúa únicamente sobre SIRT1, sino que también actúa inhibiendo otras sirtuinas, fundamentalmente SIRT2. Dado que se ha propuesto que condiciones de estrés oxidativo promueven la activación de SIRT1 y su asociación con FoxO3a, deacetilándolo (Brunet et al., 2004), y con el fin de evaluar de forma más directa el efecto de SIRT1 sobre la acetilación de PGC-1 α y FoxO3a en respuesta al estrés, decidimos realizar experimentos de sobre-expresión de SIRT1 en presencia/ausencia de un agente oxidante. Para ello las células se trataron con H₂O₂ 50 μ M durante 4 horas previamente a la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a PGC-1 α o a FoxO3a. La concentración de peróxido de hidrógeno utilizada se considera una fuente de estrés moderado, que es capaz de inducir la activación de los mecanismos de respuesta a ROS, pero no daño citotóxico.

Los datos obtenidos muestran que, en ausencia de estrés, la sobre-expresión de SIRT1 induce una disminución en los niveles de proteína PGC-1 α total. Este resultado concuerda con ensayos preliminares que hemos realizado -mencionados anteriormente- que muestran la inducción por SIRT1 de una disminución drástica en los niveles de PGC-1 α en células donde este coactivador es sobre-expresado, sugiriendo que en estas condiciones SIRT1 puede estar implicado en la activación de vías de degradación de PGC-1 α . Cabe destacar no obstante que la desestabilización de PGC-1 α por SIRT1 no parece tener lugar cuando las células están sometidas a estrés oxidativo, ya que la sobre-expresión de SIRT1 en estas condiciones mantiene o incluso aumenta ligeramente los niveles totales de la proteína PGC-1 α . Estos resultados apoyan la idea de que SIRT1 es capaz de regular los niveles celulares de PGC-1 α , reduciéndolos o manteniéndolos en función de la presencia de estrés oxidativo, mediante un mecanismo que podría implicar la degradación/estabilización de la proteína PGC-1 α . Por otra parte, SIRT1 podría actuar modulando la expresión génica de este coactivador, ya que hemos observado previamente que su sobre-expresión aumenta los niveles de ARNm de PGC-1 α en células endoteliales.

En condiciones basales la sobre-expresión de SIRT1 no parece disminuir de forma significativa los niveles de acetilación de PGC-1 α , lo que plantea la posibilidad de que la regulación de la estabilidad de PGC-1 α por SIRT1 no esté mediada por su actividad deacetilasa. Nuestros datos indican que el tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno induce un aumento en la acetilación de PGC-1 α , resultado que está de acuerdo con lo descrito previamente por Anderson y colaboradores (Anderson et al., 2008). Hay que destacar que en células expuestas al H₂O₂ se observó una disminución en los niveles de

proteína PGC-1 α acetilada al sobre-expresar SIRT1, indicando que condiciones de estrés oxidativo promueven la deacetilación de PGC-1 α por esta sirtuina.

El hecho de que el tratamiento con un agente oxidante induzca tanto la deacetilación como la estabilización/inducción de PGC-1 α por SIRT1 apoya un posible papel de esta enzima deacetilasa en la modulación de la actividad de PGC-1 α en respuesta a situaciones de estrés celular. Anderson y colaboradores han descrito previamente que PGC-1 α se acetila de forma transitoria en respuesta al estrés oxidativo para posteriormente deacetilarse en un mecanismo mediado por SIRT1, que promueve la acumulación de PGC-1 α en el núcleo y su actividad transcripcional (Anderson et al., 2008). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que hemos observado que la exposición de las células al peróxido de hidrógeno induce la acetilación de PGC-1 α , así como su deacetilación por SIRT1. Asimismo, en el trabajo mencionado se propone que el estrés oxidativo induce la ubiquitinación y degradación de PGC-1 α por el proteasoma, y que el tratamiento de las células con nicotinamida disminuye los niveles totales de esta proteína. Estos datos apoyan la idea de que la deacetilación de PGC-1 α por SIRT1 podría prevenir la degradación de PGC-1 α inducida por estrés.

Anderson y colaboradores proponen que es la fosforilación de PGC-1 α por la quinasa GSK3 β , y no el estado de acetilación como tal, la que dirige la degradación de PGC-1 α por el proteasoma, regulando así la duración de su actividad. Según el modelo propuesto por estos autores, condiciones de estrés agudo activarían a la quinasa GSK3 β , lo que conduciría a la activación transitoria de PGC-1 α y su subsiguiente degradación por el proteasoma. En respuesta al estrés crónico, la inducción de SIRT1 y la inhibición de la GSK3 β activaría y estabilizaría a PGC-1 α , resultando en un efecto sostenido sobre la expresión de sus genes diana. Sin embargo, hay que resaltar que aunque los datos que presentan estos autores concuerdan con esta hipótesis, no la demuestran formalmente; es decir, observan que la inhibición de la GSK3 β aumenta los niveles de PGC-1 α y que la fosforilación de PGC-1 α por GSK3 β se induce por estrés oxidativo, pero no demuestran que la degradación de PGC-1 α inducida por estrés esté suprimida cuando se inhibe GSK3 β .

También se realizaron ensayos de inmunoprecipitación para evaluar el efecto de SIRT1 sobre los niveles y la acetilación/deacetilación del factor de transcripción FoxO3a en respuesta al estrés. Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que, en condiciones basales, la sobre-expresión de SIRT1 induce un ligero aumento en los niveles totales de la proteína FoxO3a, probablemente consecuencia del efecto inductor transcripcional de SIRT1 sobre la expresión de FoxO3a y de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de nicotinamida.

Por otra parte, el tratamiento de las células con H_2O_2 provoca una disminución drástica en los niveles de este factor de transcripción que se acompaña de un notable aumento en los niveles de su forma acetilada, lo que concuerda con estudios previos que han descrito que FoxO se acetila en respuesta al estrés. Se sabe que el tratamiento con agentes oxidantes promueve la translocación al núcleo de estos factores y su interacción con acetilasas como p300/CBP y el factor asociado a p300/CBP (PCAF), resultando en la acetilación de FoxO en varios residuos de lisina (lisinas 242, 259, 271, 290 y 569 en el caso de FoxO3a) (Brunet et al., 2004; Mahmud et al., 2002; van der Horst et al., 2004). La acetilación podría marcar a la proteína para su poliubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma, lo que explicaría la observación de una disminución drástica en los niveles de proteína FoxO3a como consecuencia de la exposición al H_2O_2 .

El efecto que el estrés oxidativo ejerce sobre FoxO3a parece revertirse completamente al sobre-expresar SIRT1, aumentando considerablemente los niveles de proteína FoxO3a total, y desapareciendo la banda correspondiente a la forma acetilada de la proteína. Esto también apoya datos anteriores que muestran que, en respuesta al estrés, la proteína FoxO nuclear previamente acetilada y fosforilada por JNK puede interaccionar con SIRT1, que lo deacetila (Brunet et al., 2004; Wang et al., 2007; Kobayashi et al., 2005). La activación de SIRT1 en respuesta a un estímulo oxidante sería por tanto posterior a la de las acetilasas responsables de la acetilación inicial de FoxO, y conllevaría una inducción de la expresión de FoxO tanto a nivel de ARNm como de proteína. Esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por los grupos de Kajihara y van Gorp en 2006, que han descrito cómo la exposición a una fuente de estrés oxidativo durante períodos de tiempo prolongados (24-48 horas) induce la expresión del ARNm y la proteína FoxO3a en células endometriales indiferenciadas (Kajihara et al., 2006) y en células derivadas de médula ósea Ba/F3 (van Gorp et al., 2006). Asimismo, concordaría con los resultados publicados respecto a la regulación de los niveles de PGC-1 α en respuesta a estrés, ya que se ha descrito tanto un aumento en los niveles de ARNm de PGC-1 α (Irrcher *et al.*, 2009) como una disminución en los niveles de su proteína -mediada por poliubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma- como consecuencia de la exposición a una fuente oxidante (Anderson et al., 2008).

El hecho de que SIRT1 deacetile y estabilice/induzca a FoxO3a en condiciones de estrés oxidativo, sugiere que esta enzima actúa como reguladora de la actividad de este factor de transcripción en la respuesta celular al estrés. De acuerdo con esta idea, se ha propuesto que la deacetilación por SIRT1 aumenta la capacidad de FoxO3a para inducir la transcripción de genes implicados en la detención del ciclo celular y la resistencia al estrés, mientras que su capacidad para inducir muerte celular se ve inhibida (Brunet *et al.*, 2004;

Giannakou and Partridge, 2004). Asimismo, la presencia de SIRT1 parece ser esencial para la inducción del gen GADD45 por FoxO4 en respuesta a estrés (Kobayashi et al., 2005).

Dado que SIRT1 parece estar implicada en la regulación de la expresión de varios genes de detoxificación de forma dependiente de la presencia de PGC-1 α y FoxO3a, que es capaz de deacetilar y estabilizar/inducir los niveles de expresión de ambos factores en respuesta al estrés oxidativo, y que se ha descrito previamente que puede regular de forma selectiva la actividad de PGC-1 α y FoxO3a sobre distintos procesos celulares, proponemos que SIRT1 podría estar implicada en la regulación de la formación y/o actividad del complejo PGC-1 α -FoxO3a en el control de la respuesta de la célula a una situación de estrés.

En el modelo de regulación que proponemos (Fig. 34), en condiciones basales en las que las células no se encuentran sometidas a un estímulo de estrés, la actividad del sistema sería baja y SIRT1 estaría actuando como un regulador positivo de la expresión de FoxO3a y de PGC-1 α . FoxO3a se localizaría mayoritariamente en el citosol celular. La sobre-expresión de PGC-1 α en estas condiciones favorecería la degradación de este coactivador a través de un mecanismo mediado por SIRT1.

La exposición de las células a un estímulo oxidante de alta intensidad durante un corto período de tiempo (estrés agudo), promovería la acetilación de PGC-1 α y de FoxO3a - que se translocaría del citosol al núcleo- y su activación. Mientras que se desconocen los genes diana que estaría regulando PGC-1 α en estas condiciones, FoxO3a actuaría promoviendo la expresión de genes pro-apoptóticos, lo que conduciría finalmente a la muerte de la célula al no poder afrontar el daño ocasionado por la exposición a este tipo de estrés. Tras actuar sobre sus genes diana, PGC-1 α y FoxO3a serían ubiquitinados y enviados a degradación por el proteasoma.

El estrés de tipo crónico (estímulo de baja intensidad pero prolongado en el tiempo) también induciría la acetilación y activación de PGC-1 α y de FoxO3a. En estas condiciones, ambos factores serían susceptibles de deacetilación por SIRT1. Esta deacetilación promovería la estabilización de PGC-1 α y de FoxO3a, favoreciendo la formación de un complejo formado por ambos factores, y quizás también SIRT1, sobre los promotores de los genes que forman parte del sistema de defensa antioxidante. La actividad de este complejo sería clave para la inducción de la expresión de los genes de resistencia al estrés y de respuestas de supervivencia celular ante un estímulo oxidante.

Discusión

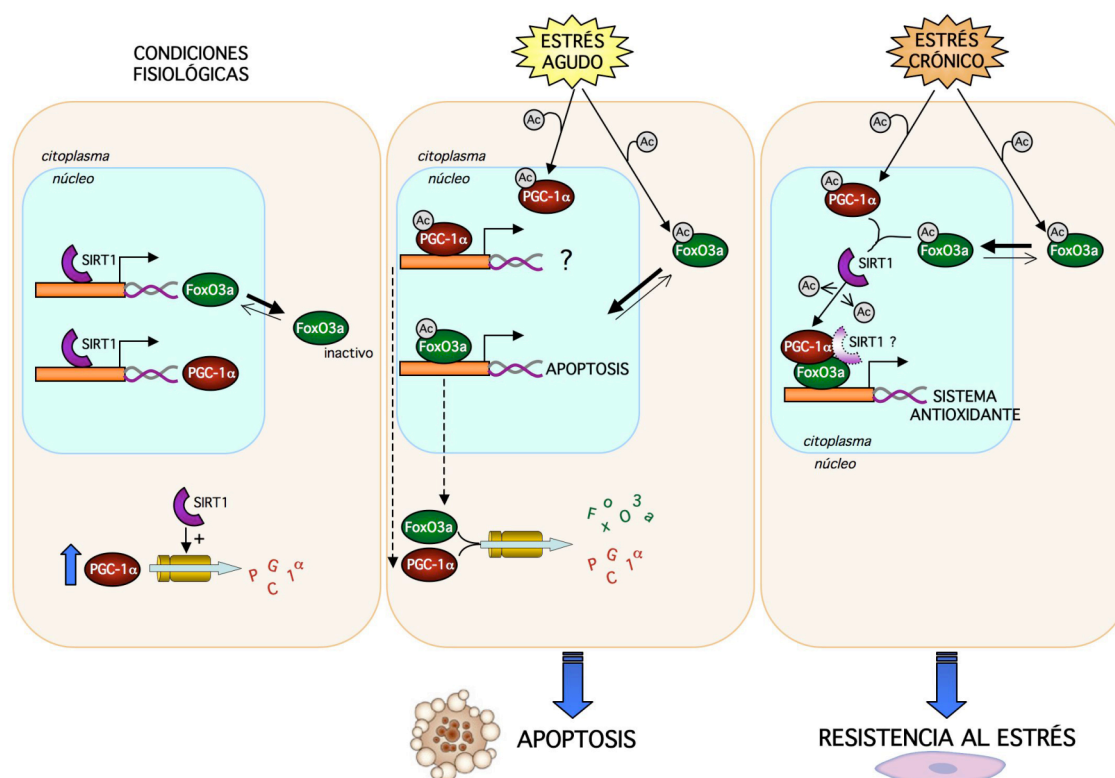


Figura 34. Modelo de regulación transcripcional de la respuesta celular al estrés por los factores PGC-1 α , FoxO3a y SIRT1. En ausencia de estrés, SIRT1 actuaría regulando positivamente la expresión de FoxO3a y PGC-1 α ; FoxO3a se localizaría fundamentalmente en el citosol, inactivo. En estas condiciones, la sobre-expresión de PGC-1 α favorecería su degradación a través de un mecanismo mediado por SIRT1. La exposición de la célula a una fuente de estrés agudo promovería la acetilación de PGC-1 α y de FoxO3a, que se translocaría al núcleo, y su actuación sobre sus genes diana, para posteriormente ser enviados a degradación por el proteasoma. En estas condiciones FoxO3a induciría la expresión de genes pro-apoptóticos, lo que conduciría finalmente a la muerte celular. El estrés crónico promovería a su vez la acetilación y activación de FoxO3a y PGC-1 α . La deacetilación de estos factores por SIRT1 promovería su estabilización y la formación de un complejo regulador transcripcional responsable de la inducción de los genes del sistema de defensa antioxidante, lo que promovería la supervivencia de la célula ante este tipo de estrés.

Para verificar la existencia de un complejo SIRT1-PGC-1 α -FoxO3a, sería relevante evaluar la interacción de SIRT1 con el complejo PGC-1 α -FoxO3a mediante ensayos de co-inmunoprecipitación entre SIRT1 y ambos factores. Asimismo, sería interesante determinar si SIRT1 afecta a la interacción PGC-1 α -FoxO3a y de forma similar si la interacción FoxO3a-SIRT1 y PGC-1 α -SIRT1 depende de la presencia de PGC-1 α y FoxO3a, respectivamente.

Con el fin de evaluar la relevancia del estado de acetilación/deacetilación de los distintos factores en estudio para la formación y actividad del complejo, sería necesario evaluar el nivel de acetilación de PGC-1 α en ausencia de FoxO3a, y viceversa, así como analizar si la mutación en los sitios de acetilación descritos para PGC-1 α y FoxO3a afecta tanto a la interacción entre ambos factores como a su efecto inductor sobre distintos grupos de genes diana, no solo los implicados en la protección frente al estrés, para evaluar la especificidad de la regulación.

También resultaría de interés profundizar en el estudio de cómo la actividad del complejo transcripcional caracterizado se modula en respuesta a diferentes condiciones metabólicas o de estrés. En este contexto sería útil el empleo de técnicas que permitan visualizar la localización celular de las proteínas en estudio, para analizar su translocación núcleo/citosol y posible co-localización en los compartimentos celulares.

La identificación de los factores de transcripción implicados en la regulación de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo adquiere una gran relevancia en el contexto del endotelio vascular, donde los niveles elevados de ROS juegan un papel determinante en la disfunción endotelial y, por consiguiente, en el inicio y progresión de los procesos ateroscleróticos. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que los reguladores transcripcionales PGC-1 α y FoxO3a, así como la enzima deacetilasa SIRT1, podrían formar parte de un mismo complejo regulador de la transcripción de los genes antioxidantes, pudiendo actuar como factores protectores frente al desarrollo de la patología vascular.

La asociación PGC-1 α -FoxO3a-SIRT1 podría ser asimismo importante para el control de otros procesos relacionados con la función endotelial, como la angiogénesis, proceso en el que los ROS juegan un papel relevante, y con el que estos tres factores han sido relacionados con anterioridad (Arany et al., 2008; Potente et al., 2007; Potente et al., 2005).

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El factor de transcripción FoxO3a es un regulador positivo directo de la expresión de un conjunto de genes implicados en la defensa antioxidante en células endoteliales, incluyendo las enzimas de detoxificación de ROS MnSOD, CAT, Prx3, Prx5, Trx2 y TR2, y la proteína desacoplante UCP-2, así como del coactivador transcripcional PGC-1 α .
2. FoxO3a es necesario para el mantenimiento de los niveles basales de expresión de las enzimas antioxidantes en el endotelio y probablemente en otros tipos celulares.
3. FoxO3a regula la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula endotelial.
4. La presencia de FoxO3a es necesaria para la regulación por PGC-1 α de la maquinaria de detoxificación de ROS mitocondrial.
5. FoxO3a requiere la presencia de PGC-1 α para ejercer su efecto sobre el sistema de defensa antioxidante.
6. FoxO3a y PGC-1 α dependen mutuamente entre sí en la regulación del programa transcripcional de respuesta a estrés.
7. PGC-1 α y FoxO3a forman parte de un mismo complejo e interactúan directamente en el endotelio a través del dominio carboxi-terminal de PGC-1 α .
8. PGC-1 α coactiva FoxO3a en la regulación de los genes de protección frente a estrés.
9. La deacetilasa SIRT1 regula positivamente la expresión de las enzimas de detoxificación MnSOD, CAT, Prx5 y TR2, y requiere la presencia tanto de PGC-1 α como de FoxO3a para ejercer dicho efecto.

Conclusiones

10. SIRT1 regula el estado de acetilación, la expresión y la estabilidad de PGC-1 α y de FoxO3a en células endoteliales.

11. El estrés oxidativo estimula la actividad deacetilasa y estabilizadora de SIRT1 sobre PGC-1 α y FoxO3a en células endoteliales.

12. SIRT1 podría estar implicada en la regulación de la formación y/o actividad del complejo PGC-1 α -FoxO3a en el control de la respuesta celular al estrés.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

- Addabbo F, Ratliff B, Park HC, Kuo MC, Ungvari Z, Csiszar A *et al* (2009). The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach. *Am J Pathol* **174**: 34-43.
- Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB *et al* (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* **280**: 19587-93.
- Aksoy P, Escande C, White TA, Thompson M, Soares S, Benech JC *et al* (2006). Regulation of SIRT 1 mediated NAD dependent deacetylation: a novel role for the multifunctional enzyme CD38. *Biochem Biophys Res Commun* **349**: 353-9.
- 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.
- Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X *et al* (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* **100**: 1512-21.
- Alcendor RR, Kirshenbaum LA, Imai S, Vatner SF, Sadoshima J (2004). Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circ Res* **95**: 971-80.
- Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giral M, Villarroya F (2009). SIRT1 controls the transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma Co-activator-1alpha (PGC-1alpha) gene in skeletal muscle through the PGC-1alpha autoregulatory loop and interaction with MyoD. *J Biol Chem* **284**: 21872-80.
- Amat R, Solanes G, Giral M, Villarroya F (2007). SIRT1 is involved in glucocorticoid-mediated control of uncoupling protein-3 gene transcription. *J Biol Chem* **282**: 34066-76.
- Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC (1998). Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* **47**: 187-99.
- Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA *et al* (2008). Dynamic regulation of PGC-1alpha localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell* **7**: 101-11.
- Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423**: 181-5.
- Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girmun G *et al* (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature* **451**: 1008-12.
- Ashok BT, Ali R (1999). The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol* **34**: 293-303.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M *et al* (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *Faseb J* **16**: 1879-86.
- Bakker WJ, Blazquez-Domingo M, Kolbus A, Besooyen J, Steinlein P, Beug H *et al* (2004). FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol* **164**: 175-84.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483-95.
- Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S *et al* (2000). Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* **101**: 1780-4.
- Banmeyer I, Marchand C, Clippe A, Knoops B (2005). Human mitochondrial peroxiredoxin 5 protects from mitochondrial DNA damages induced by hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **579**: 2327-33.
- Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005). FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **16**: 183-9.
- Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7421-6.
- Birket MJ, Passos JF, von Zglinicki T, Birch-Machin MA (2009). The relationship between the aging- and photo-dependent T414G mitochondrial DNA mutation with cellular senescence and reactive oxygen species production in cultured skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* **129**: 1361-6.
- Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA (2002). Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* **277**: 45099-107.

Bibliografía

- Bohr VA (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* **32**: 804-12.
- Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J *et al* (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* **4**: e31.
- Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M (2006). Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Faseb J* **20**: 1889-91.
- Borowiec AS, Hague F, Harir N, Guenin S, Guerineau F, Gouilleux F *et al* (2007). IGF-1 activates hEAG K(+) channels through an Akt-dependent signaling pathway in breast cancer cells: role in cell proliferation. *J Cell Physiol* **212**: 690-701.
- Borra MT, Langer MR, Slama JT, Denu JM (2004). Substrate specificity and kinetic mechanism of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *Biochemistry* **43**: 9877-87.
- Brandes RP (2008). Activating SIRT1: a new strategy to prevent atherosclerosis? *Cardiovasc Res* **80**: 163-4.
- Brown GC, Borutaite V (2001). Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* **52**: 189-95.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS *et al* (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-68.
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* **21**: 952-65.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y *et al* (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**: 2011-5.
- Bucci M, Roviezzo F, Posadas I, Yu J, Parente L, Sessa WC *et al* (2005). Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 904-8.
- Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY *et al* (1999). Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* **48**: 1856-62.
- Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**: 840-4.
- Calnan DR, Brunet A (2008). The FoxO code. *Oncogene* **27**: 2276-88.
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC *et al* (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**: 1056-60.
- Cersosimo E, DeFronzo RA (2006). Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev* **22**: 423-36.
- Chae HZ, Kang SW, Rhee SG (1999). Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* **300**: 219-26.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-605.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11715-20.
- Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2004). Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 41975-84.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**: 36027-31.
- Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB (2005). Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* **123**: 437-48.
- Chiribau CB, Cheng L, Cucoranu IC, Yu YS, Clempus RE, Sorescu D (2008). FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* **283**: 8211-7.
- Chua KF, Mostoslavsky R, Lombard DB, Pang WW, Saito S, Franco S *et al* (2005). Mammalian SIRT1 limits replicative life span in response to chronic genotoxic stress. *Cell Metab* **2**: 67-76.

Bibliografia

- Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC (1974). The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 2777-81.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B *et al* (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* **305**: 390-2.
- Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippel S, Banjac A, Schneider M *et al* (2004). Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Mol Cell Biol* **24**: 9414-23.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**: 785-9.
- Croteau DL, Stierum RH, Bohr VA (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res* **434**: 137-48.
- Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G *et al* (2009). Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**: H13-20.
- Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN (2003). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1711-6.
- Dai JM, Wang ZY, Sun DC, Lin RX, Wang SQ (2007). SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J Cell Physiol* **210**: 161-6.
- Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M *et al* (2004). Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10042-7.
- Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A (2003). Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* **52**: 642-9.
- Davignon J, Ganz P (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**: III27-32.
- Dejana E, Taddei A, Randi AM (2007). Foxs and Ets in the transcriptional regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1775**: 298-312.
- Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* **10**: 1201-4.
- Dolado I, Nebreda AR (2008). AKT and oxidative stress team up to kill cancer cells. *Cancer Cell* **14**: 427-9.
- Duval C, Cantero AV, Auge N, Mabile L, Thiers JC, Negre-Salvayre A *et al* (2003). Proliferation and wound healing of vascular cells trigger the generation of extracellular reactive oxygen species and LDL oxidation. *Free Radic Biol Med* **35**: 1589-98.
- Duval C, Negre-Salvayre A, Dogilo A, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L (2002). Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem Cell Biol* **80**: 757-64.
- Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA *et al* (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**: 96-9.
- Edwards MG, Sarkar D, Klopp R, Morrow JD, Weindruch R, Prolla TA (2003). Age-related impairment of the transcriptional responses to oxidative stress in the mouse heart. *Physiol Genomics* **13**: 119-27.
- Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC (2005). Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* **308**: 1181-4.
- Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL *et al* (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *Embo J* **23**: 4802-12.
- Fan M, Rhee J, St-Pierre J, Handschin C, Puigserver P, Lin J *et al* (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev* **18**: 278-89.
- Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC *et al* (2008). Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* **8**: 347-58.
- Feletou M, Vanhoutte PM (2006a). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H985-1002.

Bibliografía

- Feletou M, Vanhoutte PM (2006b). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 1215-25.
- Finck BN, Kelly DP (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* **116**: 615-22.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-47.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G *et al* (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**: 391-400.
- Frescas D, Valenti L, Accili D (2005). Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* **280**: 20589-95.
- Frye RA (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **260**: 273-9.
- Fukao H, Ijiri Y, Miura M, Hashimoto M, Yamashita T, Fukunaga C *et al* (2004). Effect of trans-resveratrol on the thrombogenicity and atherogenicity in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Blood Coagul Fibrinolysis* **15**: 441-6.
- Fukuoka M, Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Umemura S, Fukamizu A (2003). Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int J Mol Med* **12**: 503-8.
- Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y *et al* (2003). Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* **12**: 51-62.
- Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N (2002). FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **277**: 26729-32.
- Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K *et al* (2004). Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J Biol Chem* **279**: 34741-9.
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J* **349**: 629-34.
- Gardner PR (1997). Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Biosci Rep* **17**: 33-42.
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R *et al* (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *Embo J* **26**: 1913-23.
- Giannakou ME, Partridge L (2004). The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol* **14**: 408-12.
- Giulivi C, Boveris A, Cadenas E (1995). Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* **316**: 909-16.
- Gonzalo R, Garcia-Arumi E, Llige D, Marti R, Solano A, Montoya J *et al* (2005). Free radicals-mediated damage in trans-mitochondrial cells harboring the T14487C mutation in the ND6 gene of mtDNA. *FEBS Lett* **579**: 6909-13.
- Goth L, Rass P, Pay A (2004). Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn* **8**: 141-9.
- Greer EL, Banko MR, Brunet A (2009). AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Ann N Y Acad Sci* **1170**: 688-92.
- Greer EL, Brunet A (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**: 7410-25.
- Greer EL, Dowlatshahi D, Banko MR, Villen J, Hoang K, Blanchard D *et al* (2007a). An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Curr Biol* **17**: 1646-56.
- Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP *et al* (2007b). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem* **282**: 30107-19.
- Griendling KK, FitzGerald GA (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* **108**: 1912-6.

Bibliografia

- Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 2175-83.
- Gross DN, Wan M, Birnbaum MJ (2009). The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Curr Diab Rep* **9**: 208-14.
- Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA (2005). Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev* **19**: 453-61.
- Guarente L, Picard F (2005). Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* **120**: 473-82.
- Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P, Unterman T (1999). Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* **274**: 17184-92.
- Hallows WC, Lee S, Denu JM (2006). Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10230-5.
- Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK *et al* (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem* **282**: 30014-21.
- Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH *et al* (2005). Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell* **122**: 505-15.
- Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7111-6.
- Hardie DG, Hawley SA (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays* **23**: 1112-9.
- Harvey AC, Downs JA (2004). What functions do linker histones provide? *Mol Microbiol* **53**: 771-5.
- Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H *et al* (2008). Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem Biophys Res Commun* **372**: 51-6.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2509-14.
- Heilbronn LK, Civitarese AE, Bogacka I, Smith SR, Hulver M, Ravussin E (2005). Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting. *Obes Res* **13**: 574-81.
- Heitzer T, Baldus S, von Kodolitsch Y, Rudolph V, Meinertz T (2005). Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 1174-9.
- Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A *et al* (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413**: 179-83.
- Honda Y, Honda S (1999). The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J* **13**: 1385-93.
- Hondares E, Mora O, Yubero P, Rodriguez de la Concepcion M, Iglesias R, Giral M *et al* (2006). Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology* **147**: 2829-38.
- Hondares E, Pineda-Torra I, Iglesias R, Staels B, Villarroya F, Giral M (2007). PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **354**: 1021-7.
- Hoogeboom D, Essers MA, Polderman PE, Voets E, Smits LM, Burgering BM (2008). Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity. *J Biol Chem* **283**: 9224-30.
- Hosaka T, Biggs WH, 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK *et al* (2004). Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2975-80.
- Hribal ML, Nakae J, Kitamura T, Shutter JR, Accili D (2003). Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol* **162**: 535-41.

Bibliografía

- Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY *et al* (2004). IκappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* **117**: 225-37.
- Huang H, Regan KM, Lou Z, Chen J, Tindall DJ (2006). CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. *Science* **314**: 294-7.
- Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM *et al* (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1649-54.
- Huss JM, Kopp RP, Kelly DP (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem* **277**: 40265-74.
- Imai H, Nakagawa Y (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* **34**: 145-69.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**: 795-800.
- Irrcher I, Ljubcic V, Hood DA (2009). Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**: C116-23.
- Jackson JG, Kreisberg JI, Koterba AP, Yee D, Brattain MG (2000). Phosphorylation and nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FKHR after epidermal growth factor treatment in human breast cancer cells. *Oncogene* **19**: 4574-81.
- Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* **278**: 35959-67.
- Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim HS, Mishra M *et al* (2008). SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci* **4**: 291-9.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**: 2745-56.
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12017-22.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* **13**: 2570-80.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* **14**: 142-6.
- Kajihara T, Jones M, Fusi L, Takano M, Feroze-Zaidi F, Pirianov G *et al* (2006). Differential expression of FOXO1 and FOXO3a confers resistance to oxidative cell death upon endometrial decidualization. *Mol Endocrinol* **20**: 2444-55.
- Keaney JF, Jr. (2005). Oxidative stress and the vascular wall: NADPH oxidases take center stage. *Circulation* **112**: 2585-8.
- Kim HJ, Park KG, Yoo EK, Kim YH, Kim YN, Kim HS *et al* (2007). Effects of PGC-1alpha on TNF-alpha-induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF-kappaB activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **9**: 301-7.
- Kim JE, Chen J, Lou Z (2008). DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**: 583-6.
- King TD, Jope RS (2005). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 protects cells from intrinsic but not extrinsic oxidative stress. *Neuroreport* **16**: 597-601.
- Kitamura T, Feng Y, Kitamura YI, Chua SC, Jr., Xu AW, Barsh GS *et al* (2006). Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nat Med* **12**: 534-40.
- Knight-Lozano CA, Young CG, Burow DL, Hu ZY, Uyeminami D, Pinkerton KE *et al* (2002). Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. *Circulation* **105**: 849-54.
- Knutson MD, Leeuwenburgh C (2008). Resveratrol and novel potent activators of SIRT1: effects on aging and age-related diseases. *Nutr Rev* **66**: 591-6.

Bibliografia

- Knutti D, Kressler D, Kralli A (2001). Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9713-8.
- Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K *et al* (2005). SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* **16**: 237-43.
- Koh SH, Kim SH, Kwon H, Kim JG, Kim JH, Yang KH *et al* (2004). Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and GSK-3 mediated cytoprotective effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress-injured neuronal-differentiated N18D3 cells. *Neurotoxicology* **25**: 793-802.
- Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ *et al* (2002a). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**: 316-21.
- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**: 630-4.
- Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffey PJ *et al* (2002b). Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* **22**: 2025-36.
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 248-61.
- Kressler D, Schreiber SN, Knutti D, Kralli A (2002). The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* **277**: 13918-25.
- Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M *et al* (2006). Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* **55**: 120-7.
- Kumashiro N, Tamura Y, Uchida T, Ogihara T, Fujitani Y, Hirose T *et al* (2008). Impact of oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in hepatic insulin resistance. *Diabetes* **57**: 2083-91.
- Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* **368**: 545-53.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S (2003). Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* **278**: 22546-54.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F *et al* (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127**: 1109-22.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM *et al* (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* **111**: 1201-9.
- Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L *et al* (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5807-11.
- Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD (2008). Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 841-53.
- Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB *et al* (2006). A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* **125**: 987-1001.
- Lelliott CJ, Vidal-Puig A (2009). PGC-1beta: a co-activator that sets the tone for both basal and stress-stimulated mitochondrial activity. *Adv Exp Med Biol* **646**: 133-9.
- Lerin C, Rodgers JT, Kalume DE, Kim SH, Pandey A, Puigserver P (2006). GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* **3**: 429-38.
- Li J, Zhou K, Meng X, Wu Q, Li S, Liu Y *et al* (2008). Increased ROS generation and SOD activity in heteroplasmic tissues of transmitochondrial mice with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Genet Mol Res* **7**: 1054-62.
- 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.
- Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* **447**: 1012-6.

Bibliografía

- Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM (2002a). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem* **277**: 1645-8.
- Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB *et al* (2003). PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem* **278**: 30843-8.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O *et al* (2002b). Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**: 797-801.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY *et al* (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* **119**: 121-35.
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000). Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**: 2126-8.
- Lin SJ, Kaerberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC *et al* (2002c). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* **418**: 344-8.
- Linke A, Recchia F, Zhang X, Hintze TH (2003). Acute and chronic endothelial dysfunction: implications for the development of heart failure. *Heart Fail Rev* **8**: 87-97.
- Liou GG, Tanny JC, Kruger RG, Walz T, Moazed D (2005). Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation. *Cell* **121**: 515-27.
- Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L (2005). Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **280**: 21313-20.
- Liu Z, Habener JF (2008). Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation. *J Biol Chem* **283**: 8723-35.
- Liu ZP, Wang Z, Yanagisawa H, Olson EN (2005). Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Dev Cell* **9**: 261-70.
- Lochhead PA, Coghlan M, Rice SQ, Sutherland C (2001). Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes* **50**: 937-46.
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW *et al* (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **315**: 1046-51.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A *et al* (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**: 137-48.
- Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL (2001). Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* **34**: 325-36.
- Mahmud DL, M GA, Deb DK, Platanius LC, Uddin S, Wickrema A (2002). Phosphorylation of forkhead transcription factors by erythropoietin and stem cell factor prevents acetylation and their interaction with coactivator p300 in erythroid progenitor cells. *Oncogene* **21**: 1556-62.
- Makimattila S, Yki-Jarvinen H (2002). Endothelial dysfunction in human diabetes. *Curr Diab Rep* **2**: 26-36.
- Mann GE, Niehueser-Saran J, Watson A, Gao L, Ishii T, de Winter P *et al* (2007). Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress: implications for atherosclerosis and preeclampsia. *Sheng Li Xue Bao* **59**: 117-27.
- Mason SD, Rundqvist H, Papandreou I, Duh R, McNulty WJ, Howlett RA *et al* (2007). HIF-1alpha in endurance training: suppression of oxidative metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**: R2059-69.
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K *et al* (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* **106**: 1521-30.
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A (2005). Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11278-83.
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11285-90.

Bibliografia

- Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB *et al* (2007). SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14855-60.
- McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S *et al* (2003). Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**: H2290-7.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**: 782-7.
- Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* **16**: 4623-35.
- Mill P, Mo R, Hu MC, Dagnino L, Rosenblum ND, Hui CC (2005). Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-Myc. *Dev Cell* **9**: 293-303.
- Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J (2002). FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem* **277**: 47928-37.
- Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S *et al* (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1 alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6570-5.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehara J *et al* (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**: 267-73.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W *et al* (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* **116**: 551-63.
- Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, 3rd, Arden KC, Accili D (2003). The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* **4**: 119-29.
- Nasrin N, Ogg S, Cahill CM, Biggs W, Nui S, Dore J *et al* (2000). DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10412-7.
- Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* **306**: 2105-8.
- Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T (2005). SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J Biol Chem* **280**: 16456-60.
- Nemoto S, Finkel T (2002). Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295**: 2450-2.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y *et al* (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**: 787-90.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C *et al* (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**: 896-9.
- Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M *et al* (2004). Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16507-12.
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L *et al* (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310**: 314-7.
- Nogueira V, Park Y, Chen CC, Xu PZ, Chen ML, Tonic I *et al* (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* **14**: 458-70.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* **11**: 437-44.
- O'Hagan HM, Mohammad HP, Baylin SB (2008). Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet* **4**: e1000155.
- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK *et al* (2008). SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* **135**: 907-18.

Bibliografia

- Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W (2003). Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J* **371**: 89-96.
- Oberley LW (2005). Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* **59**: 143-8.
- Olson BL, Hock MB, Ekholm-Reed S, Wohlschlegel JA, Dev KK, Kralli A *et al* (2008). SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1alpha transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes Dev* **22**: 252-64.
- Orimo M, Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Okada S, Moriya J *et al* (2009). Protective role of SIRT1 in diabetic vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**: 889-94.
- Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y (2007). Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* **43**: 571-9.
- Ota H, Eto M, Ako J, Ogawa S, Iijima K, Akishita M *et al* (2009). Sirolimus and everolimus induce endothelial cellular senescence via sirtuin 1 down-regulation: therapeutic implication of cilostazol after drug-eluting stent implantation. *J Am Coll Cardiol* **53**: 2298-305.
- Ota H, Eto M, Kano MR, Ogawa S, Iijima K, Akishita M *et al* (2008). Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 1634-9.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**: 913-22.
- Pagliari P, Chiribiri A, Mancardi D, Rastaldo R, Gattullo D, Losano G (2003). Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion and its prevention by ischemic preconditioning. *Ital Heart J* **4**: 383-94.
- Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z *et al* (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* **128**: 309-23.
- Parker JA, Arango M, Abderrahmane S, Lambert E, Tourette C, Catoire H *et al* (2005). Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* **37**: 349-50.
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A *et al* (2001). Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* **104**: 191-6.
- Pham FH, Sugden PH, Clerk A (2000). Regulation of protein kinase B and 4E-BP1 by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res* **86**: 1252-8.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R *et al* (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* **429**: 771-6.
- Pillai JB, Isbatan A, Imai S, Gupta MP (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD⁺ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem* **280**: 43121-30.
- Pirola L, Frojdo S (2008). Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* **60**: 323-32.
- Pitkanen S, Robinson BH (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* **98**: 345-51.
- Plas DR, Thompson CB (2003). Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem* **278**: 12361-6.
- Pober JS, Min W, Bradley JR (2009). Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu Rev Pathol* **4**: 71-95.
- Polytarchou C, Papadimitriou E (2005). Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol* **510**: 31-8.
- Potente M, Dimmeler S (2008a). Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis. *Cell Cycle* **7**: 2117-22.
- Potente M, Dimmeler S (2008b). NO targets SIRT1: a novel signaling network in endothelial senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 1577-9.
- Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F *et al* (2007). SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* **21**: 2644-58.

Bibliografia

- Potente M, Urbich C, Sasaki K, Hofmann WK, Heeschen C, Aicher A *et al* (2005). Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **115**: 2382-92.
- Powers SK, Lennon SL (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* **58**: 1025-33.
- Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN *et al* (2006). Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* **2**: e40.
- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F *et al* (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**: 550-5.
- Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY *et al* (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* **8**: 971-82.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**: 829-39.
- Qu A, Jiang C, Xu M, Zhang Y, Zhu Y, Xu Q *et al* (2009). PGC-1alpha attenuates neointimal formation via inhibition of vascular smooth muscle cell migration in the injured rat carotid artery. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**: C645-53.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* **2**: 81-91.
- Rangwala SM, Li X, Lindsley L, Wang X, Shaughnessy S, Daniels TG *et al* (2007). Estrogen-related receptor alpha is essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function. *Biochem Biophys Res Commun* **357**: 231-6.
- Rena G, Woods YL, Prescott AR, Peggie M, Unterman TG, Williams MR *et al* (2002). Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *Embo J* **21**: 2263-71.
- Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ *et al* (2003). Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4012-7.
- Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* **2000**: PE1.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434**: 113-8.
- Rodgers JT, Puigserver P (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12861-6.
- Ross R (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**: 115-26.
- Rueckschloss U, Duerrschmidt N, Morawietz H (2003). NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* **5**: 171-80.
- Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H (2001). Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* **104**: 1767-72.
- Rytinki MM, Palvimo JJ (2009). SUMOylation attenuates the function of PGC-1alpha. *J Biol Chem* **284**: 26184-93.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH *et al* (2006). PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16260-5.
- Sano M, Schneider MD (2005). Energizer: PGC-1 alpha keeps the heart going. *Cell Metab* **1**: 216-8.
- Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K *et al* (2007). Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem* **282**: 25970-80.
- Sano M, Wang SC, Shirai M, Scaglia F, Xie M, Sakai S *et al* (2004). Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *Embo J* **23**: 3559-69.
- Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**: 1488-93.

Bibliografía

- Scarpulla RC (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1576**: 1-14.
- Schaeffer PJ, Wende AR, Magee CJ, Neilson JR, Leone TC, Chen F *et al* (2004). Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. *J Biol Chem* **279**: 39593-603.
- Schafer M, Schafer C, Ewald N, Piper HM, Noll T (2003). Role of redox signaling in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia. *Circ Res* **92**: 1010-5.
- Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinez M *et al* (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6472-7.
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M *et al* (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308**: 1909-11.
- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**: 211-23.
- Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q (2005). SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* **280**: 13560-7.
- Singh U, Jialal I (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* **13**: 129-42.
- Skurk C, Maatz H, Kim HS, Yang J, Abid MR, Aird WC *et al* (2004). The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J Biol Chem* **279**: 1513-25.
- Smith J (2002). Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity. *Trends Cell Biol* **12**: 404-6.
- Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacin M, Zorzano A (2006). Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes* **55**: 1783-91.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**: 44784-90.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S *et al* (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**: 397-408.
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB *et al* (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem* **278**: 26597-603.
- Staniek K, Nohl H (2000). Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* **1460**: 268-75.
- Subauste AR, Burant CF (2007). Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**: E159-64.
- Suh SH, Vennekens R, Manolopoulos VG, Freichel M, Schweig U, Prenen J *et al* (1999). Characterisation of explanted endothelial cells from mouse aorta: electrophysiology and Ca²⁺ signalling. *Pflugers Arch* **438**: 612-20.
- Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP (2009). Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest* **119**: 2758-71.
- Suzuki YJ, Ford GD (1992). Superoxide stimulates IP3-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* **262**: H114-6.
- Szocs K (2004). Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys* **23**: 265-95.
- Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani H, Ueda S *et al* (2002). Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *Embo J* **21**: 1695-703.
- Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM (2000). Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14178-82.

Bibliografia

- Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR (2005). Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev* **19**: 1466-73.
- Tissenbaum HA, Guarente L (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**: 227-30.
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE *et al* (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **128**: 325-39.
- Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ, Jr., DiStefano PS *et al* (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* **296**: 530-4.
- Tsai KL, Sun YJ, Huang CY, Yang JY, Hung MC, Hsiao CD (2007). Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic Acids Res* **35**: 6984-94.
- Ushio-Fukai M, Nakamura Y (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett* **266**: 37-52.
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005). PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **66**: 562-73.
- van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F *et al* (2006). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol* **8**: 1064-73.
- van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM (2004). FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* **279**: 28873-9.
- van der Vos KE, Coffey PJ (2008). FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene* **27**: 2289-99.
- van Gorp AG, Pomeranz KM, Birkenkamp KU, Hui RC, Lam EW, Coffey PJ (2006). Chronic protein kinase B (PKB/c-akt) activation leads to apoptosis induced by oxidative stress-mediated Foxo3a transcriptional up-regulation. *Cancer Res* **66**: 10760-9.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S (2005). Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol* **144**: 449-58.
- Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* **16**: 93-105.
- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK *et al* (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**: 149-59.
- Vega RB, Huss JM, Kelly DP (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* **20**: 1868-76.
- Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y *et al* (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* **275**: 16258-66.
- Wadsworth RM (2008). Oxidative stress and the endothelium. *Exp Physiol* **93**: 155-7.
- Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y *et al* (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **8**: 1025-31.
- Wang F, Nguyen M, Qin FX, Tong Q (2007). SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* **6**: 505-14.
- Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C *et al* (2008). Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* **14**: 312-23.
- Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ (2000). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* **275**: 14624-31.
- Wang YX, Lee CH, Tjep S, Yu RT, Ham J, Kang H *et al* (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **113**: 159-70.
- Warburg O (1956). On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-14.
- Watkins H, Farrall M (2006). Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat Rev Genet* **7**: 163-73.

Bibliografía

- Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Jr., Sistonen L, Morimoto RI (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* **323**: 1063-6.
- Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER *et al* (2006). Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* **4**: 349-62.
- Wolvetang EJ, Johnson KL, Krauer K, Ralph SJ, Linnane AW (1994). Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett* **339**: 40-4.
- Wu WS (2006). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* **25**: 695-705.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V *et al* (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**: 115-24.
- Yakes FM, Van Houten B (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 514-9.
- Yang D, Gluais P, Zhang JN, Vanhoutte PM, Feletou M (2004). Nitric oxide and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol* **43**: 815-20.
- Yang H, Zhao R, Yang HY, Lee MH (2005). Constitutively active FOXO4 inhibits Akt activity, regulates p27 Kip1 stability, and suppresses HER2-mediated tumorigenicity. *Oncogene* **24**: 1924-35.
- Yellaturu CR, Bhanoori M, Neeli I, Rao GN (2002). N-Ethylmaleimide inhibits platelet-derived growth factor BB-stimulated Akt phosphorylation via activation of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **277**: 40148-55.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA *et al* (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J* **23**: 2369-80.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J *et al* (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**: 131-8.
- Yu W, Fu YC, Chen CJ, Wang X, Wang W (2009). SIRT1: a novel target to prevent atherosclerosis. *J Cell Biochem* **108**: 10-3.
- Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, Lane WS, Seto E (2007). SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell* **27**: 149-62.
- Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B *et al* (2006). Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* **55**: 2180-91.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**: 337-49.
- Zhang QJ, Wang Z, Chen HZ, Zhou S, Zheng W, Liu G *et al* (2008). Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* **80**: 191-9.
- Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* **18**: 157-69.
- Zheng WH, Kar S, Quirion R (2002). FKHL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem* **80**: 1049-61.
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA (2001). NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* **31**: 1405-16.
- Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ *et al* (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15983-7.
- Zou MH, Cohen R, Ullrich V (2004). Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium* **11**: 89-97.

ANEXO

TRABAJOS PUBLICADOS

La mayor parte del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido publicado en el artículo:

Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S and Monsalve M. (2009). *J Biol Chem*, **284**, 14476-84.

