

ESCUELA DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

# CARACTERIZACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FOXO1 ASOCIADAS A LA REMODELACIÓN DEL TEJIDO CONECTIVO GINGIVAL.

Implicancias en el envejecimiento.

por

# LETICIA ANDREA ROJAS CORTEZ

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile, para optar al grado de Doctora en Ciencias Médicas

> Tutor: Dr. Patricio Smith Ferrer Co-tutor: Dr. Dana T. Graves

Diciembre, 2021 Santiago, Chile ©2021, Leticia Andrea Rojas Cortez ©2021, Leticia Andrea Rojas Cortez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica que acredita al trabajo y a su autor.

FECHA:

FIRMA:



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE Programa de Doctorado en Ciencias Médicas Dirección de Investigación y Doctorado Escuela de Medicina

La Comisión Examinadora, constituida por los Profesores abajo firmantes, aprueba la Defensa Pública de la Tesis Doctoral titulada:

# "CARACTERIZACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FOXO1 ASOCIADAS A LA REMODELACIÓN DEL TEJIDO CONECTIVO GINGIVAL"

# Implicancias en el envejecimiento.

Aprobación Defensa Pública:

# SRTA. LETICIA ANDREA ROJAS CORTEZ

Calificándose el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral, con nota

(7,0) siete coma cero

Dr. Mauricio Cuello Director de Investigación y Doctorado Escuela de Medicina, PUC

alluen

Dra. Carolina Bizama Sub-Jefe Programa Doctorado en Ciencias Médicas Escuela de Medicina, PUC

Dr. Patricio Smith Director de Tesis Escuela de Medicina, PUC

Dra. Viviana Montecinos Profesor Evaluador Interno Escuela de Medicina, PUC

Dr. Felipe Heusser Decano Facultad de Medicina, PUC

Dr. Jorge Carvajal

Jefe Programa Doctorado en Ciencias Médicas Escuela de Medicina, PUC

Dr. Dana T. Graves Co-director de Tesis Universidad de Pensilvania

Dr. Hugo Olguín Profesor Evaluador Externo Facultad de Ciencias Biológicas, PUC

Santiago, 30 de Diciembre de 2021

# AGRADECIMIENTOS

Todo este camino se hizo más ameno gracias al apoyo de tantas personas.

A mi familia: Patricia y Fernando, que a lo lejos vivieron (y sufrieron) conmigo los altos y bajos del doctorado y la vida. Gracias por apoyarme siempre y motivarme a seguir un poco más. A mi hermano Javier y su hermosa familia, Caro y Pascual, por ser otro enorme pilar de apoyo incondicional.

A mis amigos: Andrés y Cami les agradezco por la amistad de tantos años, su compañía y largas conversaciones que siempre me recargaban de cariño. Al grupo del desahogo: Carlita, Gustavo (ocultamente Fran) y Berni. Son tremendas personas, excelentes en sus áreas y es genial poder seguir compartiendo con ustedes de ciencia y vida. Tuve mucha suerte de conocerlos Simón, Shu y Romi, siempre con esa buena actitud ante todo y agradezco los grandes detalles que han tenido conmigo. A Susy, Javier, Jassir, Gastón y Cami por ayudarme a resolver los misterios de los experimentos fallidos y por las entretenidas celebraciones que pudimos compartir en el laboratorio. A Dongxu y Subbechya por enseñarme pacientemente desde cero y acompañarme durante la pasantía. Al laboratorio de odontología de la UChile por su apoyo desde el comienzo.

En cada laboratorio y lugar donde trabajé me encontré con personas que genuinamente se comprometieron con el proyecto y mostraron muchas ganas de enseñar y ayudar. Muchas gracias al Dr. Tobar, Dr. Porras y Miltha del INTA; Dr. Alfaro de Fundación Ciencia y Vida; a todo el laboratorio del Dr. Borzutzky; Dr. Poblete y Dra. Alvarado por toda su ayuda con el manejo animal; Fernanda y Nicole del UMA; Nathaly de Anatomía Patológica.

A mis tutores: Dr. Smith y Dr. Graves les agradezco enormemente que me permitieran trabajar en sus laboratorios y que me impulsaran a mejorar. Valoro la confianza que depositaron en mí y el esfuerzo por formarme como investigadora. Le agradezco también a la comisión evaluadora por ayudar a pulir este trabajo en cada instancia que tuvimos.

Además, quiero agradecerle enormemente a Debbie por gestionar tantos certificados y permisos y ayudarme con todos los procesos de la Universidad. Del mismo modo agradecerle a la jefatura del programa doctoral por proveer las ayudas tan necesarias para continuar incluso durante la pandemia. Por último, a mis compañeros de generación: Anita, Choncho, Coca y Consu. Vivimos gran parte de esta experiencia juntos y desde el principio ofrecieron su ayuda.

Muchas gracias a cada uno de ustedes.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE I	DE TABLASi
ÍNDICE I	DE ILUSTRACIONESii
RESUM	ENiv
ABSTRA	CTvi
1. INT	RODUCCIÓN1
1.1.	Aspectos generales de la familia FOXO y su regulación funcional2
1.2.	Inhibición de FOXO1 como modelo de investigación y terapéutico4
1.3.	Rol de FOXO1 en la reparación de heridas5
1.4.	Rol de las integrinas en la reparación del tejido conectivo6
1.5.	Efectos deletéreos del envejecimiento en la reparación de heridas7
1.6.	Alteración de la actividad y función de FOXO durante el envejecimiento8
2. HIP	ÓTESIS10
3. OBJ	IETIVO GENERAL
3.1.	Objetivos específicos11
4. MA	TERIALES Y MÉTODOS12
4.1	Cultivo celular y tratamientos12
4.2	Inmunofluorescencia12
4.3	Ensayo de contracción de geles13
4.4	Western Blot13
4.5	Ensamblaje de fibronectina14
4.6	Ensayo de herida in vitro14
4.7	PCR en tiempo real15
4.8	Tinciones histológicas y análisis15
4.9	Modelo de cierre de herida en ratones transgénicos15
4.10	Citometría de flujo y sorting16
4.11	Secuenciación de RNA de célula única en ratones Col1a2-Cre/ERT-FOXO1f/f.16
4.12	Análisis estadístico16
5. RES	SULTADOS

5.1	Efectos del compuesto AS1842856 sobre la localización de FOXO118
5.2	Efectos de la inhibición de FOXO1 sobre $\alpha$ -SMA19
5.3	Efectos de la inhibición de FOXO1 sobre proteinas de la matrix extracelular21
5.4	Efectos de la inhibición de FOXO1 sobre la migración de fibroblastos gingivales 24
5.5	Efectos de la inhibición de FOXO1 sobre la integrina β1 y el spreading celular 25
5.6	Modelo de herida in vivo y genotipificación de muestras
5.7	Análisis histológico de H&E y Tricromo de Masson en muestras jóvenes32
5.8	Estandarización de toma de muestras para citometría de flujo y sorting33
5.9 muest	Estrategia de análisis de secuenciación de célula única y métricas de calidad en ras provenientes de ratones jóvenes
5.10	Atlas de células mesenquimales e inmunes en heridas orales en ratones
jóvene	es
5.11	Análisis de genes blanco de FOXO1 asociados a ciclo celular y stress oxidativo 40
5.12	Descripción del transcriptoma del cluster 2 en ratones jóvenes41
5.13 jóvene	Subclusterización y generación de atlas de células mesenquimales en ratones es43
5.14	Caracterización del subcluster mesenquimal 246
5.15	Efectos de la deleción de FOXO1 sobre la MEC en miofibroblastos48
5.16 enveje	Atlas de células mesenquimales e inmunes en heridas orales de ratones ecidos
5.17 gingiva	Expresión de FOXO1 en modelo in vitro de envejecimiento en fibroblastos ales
5.18	Análisis histológico de H&E y Tricromo de Masson en ratones envejecidos56
5.19 atlas c	Métricas de calidad de secuenciación de célula única en ratones envejecidos y le células mesenquimales e inmunes
5.20 ratone	Estrategia de selección de células mesenquimales para subclusterización en es envejecidos
5.21	Atlas de células mesenquimales provenientes de ratones envejecidos61

6.	DIS	CUSIÓN	.65
6	.1	Limitaciones del estudio in vitro	.69
6	.2	Limitaciones del estudio in vivo	.78
7.	CON	NCLUSIONES	.80
8.	GLC	DSARIO	.81
9.	BIBI	LIOGRAFÍA	.82
10.	А	NEXO	.90

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos para inmunofluorescencia	13
Tabla 2. Primers para RT-qPCR	15
Tabla 3. Anticuerpos titulados para FACS	34
Tabla 4. Anotación Manual de clústeres en ratones envejecidos	58
Tabla 5. Tipos de colágeno regulados por FOXO1 o el envejecimiento.	77

# ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Esquematización de la mucosa oral de tipo masticatoria1
Figura 2. Dominios y modificaciones post-traduccionales que regulan la función de FOXO14
Figura 3. El inhibidor de FOXO1 promueve la traslocación citosólica de FOXO118
Figura 4. FOXO1 modula la diferenciación de miofibroblastos gingivales humanos19
Figura 5. FOXO1 participa en la distribución y síntesis de transcritos de fibronectina21
Figura 6. FOXO1 regula la contracción de matriz colágena en presencia de TGF-β123
Figura 7. La inhibición de FOXO1 disminuye el cierre de herida en presencia de suero fetal bovino
Figura 8. FOXO1 modula la expresión y los niveles proteicos de integrina $\beta$ 125
Figura 9. La inhibición de FOXO1 reduce el <i>spreading</i> celular y <i>clustering</i> de integrina-β1 activa28
Figura 10. Diseño experimental de la deleción de FOXO1 en fibroblastos en un modelo murino
Figura 11. Genotipificación de ratones Col1a2-cre/ERT;Foxo1 mediante PCR31
Figura 12. La deleción de FOXO1 en fibroblastos altera negativamente el depósito de colágeno en heridas orales
Figura 13. Estandarización de herida en mucosa oral y titulación de anticuerpos para FACS
Figura 14. Enriquecimiento de muestras para secuenciación de célula única mediante FACS35
Figura 15. Diagrama de flujo de análisis de muestras secuenciadas
Figura 16. Análisis de calidad e integración de las muestras secuenciadas de ratones jóvenes
Figura 17. Atlas de célula única de heridas orales al séptimo día de reparación en ratones jóvenes
Figura 18. Expresión de genes blanco del factor de transcripción FOXO140
Figura 19. Caracterización de clúster 2 en ratones jóvenes
Figura 20. Estrategia de selección de células mesenquimales en ratones jóvenes43

Figura 21. Caracterización de sub-clúster mesenquimal e identificación de miofibroblastos45
Figura 22. Caracterización de subclúster 2 mesenquimal47
Figura 23. Expresión diferencial de genes asociados a la MEC en miofibroblastos jóvenes
Figura 24. Atlas de célula única de heridas orales al séptimo día de reparación en ratones jóvenes y envejecidos51
Figura 25. Atlas de célula única del subclúster mesenquimal al séptimo día de reparación en ratones jóvenes y envejecidos52
Figura 26. Expresión diferencial de genes en subclústeres mesenquimales más abundantes presentes en muestras de ratones jóvenes y envejecidos del genotipo Cre
Figura 27. Expresión de FOXO1 en modelo de envejecimiento in vitro
Figura 28. Análisis histológico de la deleción de FOXO1 en fibroblastos en heridas orales de ratones viejos
Figura 29. Análisis de calidad de las muestras secuenciadas de ratones envejecidos57
Figura 30. Identificación de clústeres mesenquimales en ratones envejecidos60
Figura 31. Caracterización de sub-clústeres mesenquimal en ratones envejecidos61
Figura 32. Regulación de la expresión génica en subclústeres mesenquimales 1 y 262
Figura 33. Resumen de funciones reguladas por FOXO1 en modelo de reparación de herida en animales jóvenes
Figura 34. Resumen de los efectos inducidos por el envejecimiento en las poblaciones mesenquimales74
Figura 35. Resumen de los efectos de la deleción de FOXO1 en ratones envejecidos75

### RESUMEN

**Introducción/Objetivo:** La reparación de heridas está dirigida por múltiples factores de transcripción. Durante la reparación de heridas se activa el factor de transcripción Forkhead Box O 1 (FOXO1). El aumento del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) activa la función transcripcional de FOXO1 en fibroblastos. En este estudio se evaluó las funciones asociadas a reparación tisular reguladas por FOXO1 y el impacto que ejerce el envejecimiento sobre esta regulación.

**Material y método:** Se utilizaron dos modelos de pérdida de función de FOXO1 con el fin de determinar la regulación de genes y funciones asociadas a reparación de herida. Los fibroblastos gingivales humanos fueron tratados con el inhibidor químico de FOXO1: AS1842856. Mientras que en el modelo in vivo se utilizó un ratón FOXO1 knock-out fibroblasto específico. Se evaluó la regulación mediada por FOXO1 sobre los transcritos y proteínas de la actina de músculo liso tipo alfa ( $\alpha$ -SMA), fibronectina y la organización integrina beta 1 ( $\beta$ 1) activa. Además, se llevaron a cabo ensayos funcionales de *spreading*, contracción de colágeno y cierre de herida in vitro. Por otra parte, se generó un atlas transcriptómico a partir de heridas de mucosa oral en ratones jóvenes y envejecidos del genotipo Col1a2-Cre.FOXO1. Se comparó la distribución de poblaciones y genes altamente expresados entre los clústeres mesenquimales. Adicionalmente, se evaluó el depósito de nuevo colágeno en muestras histológicas. Los resultados in vitro se presentaron como promedio  $\pm$  SD. Se utilizaron las pruebas de ANOVA o Kruskal-Wallis seguidas de post-hoc de Tukey o Dunn para los ensayos in vitro. Los datos de transcriptómica se presentaron como la mediana y se analizaron mediante la prueba Wilcoxon rank sum con corrección de Bonferroni. Se consideró significancia estadística un valor de p<0.05.

**Resultados:** La inhibición de FOXO1 redujo la diferenciación a miofibroblastos, los niveles de fibronectina, colágeno tipo I e integrina- $\beta$ 1 en fibroblastos gingivales humanos tratados con TGF- $\beta$ 1. Además, se observó que la inhibición de FOXO1 reduce significativamente el *spreading* celular, la contracción de colágeno y el cierre de herida in vitro. La deleción de FOXO1 en ratones jóvenes retrasó la reparación debido, en parte, a un menor depósito de colágeno y la reducción de células mesenquimales. Por otra parte, el efecto del envejecimiento se manifestó en una disminución de las poblaciones mesenquimales más abundantes y una reducción de colágeno fibrilar. Sin embargo, la deleción de FOXO1 en ratones envejecidos no alteró el depósito de nuevo colágeno. Los datos de transcriptómica muestran que FOXO1 regula la expresión de múltiples

tipos de colágeno en ratones jóvenes y envejecidos. Cabe destacar que la deleción de FOXO1 en ratones envejecidos favorece el aumento de metaloproteinasas.

**Conclusiones:** FOXO1 cumple un rol crítico en la regulación de múltiples funciones celulares asociadas a reparación inducidas por TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos gingivales. Por primera vez, se sugiere que FOXO1 controla la formación de clústeres de integrina- $\beta$ 1. Además, se presenta el primer atlas transcriptómico de heridas orales. FOXO1 regula transcripcionalmente a múltiples tipos de colágenos y se sugiere que FOXO1 pierde parcialmente su capacidad regulatoria sobre colágeno fibrilar en ratones envejecidos.

Palabras clave: reparación de herida, FOXO1, fibroblasto gingival, TGF-β1, célula única

## ABSTRACT

**Background/Objective:** Wound healing is orchestrated by several transcription factors. The transcription factor Forkhead box O 1 (FOXO1) is active during wound repair. FOXO1 is transcriptionally active under Transforming Growth Factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) stimulation in fibroblast. In this study, wound healing-associated FOXO1 functions and their impact on aged individuals were evaluated on gingival fibroblast.

**Materials and methods**: Fibroblast-specific FOXO1-deficient mice and human gingival fibroblasts cultures treated with FOXO1 inhibitor (AS1842856) were used for testing gene regulation and wound associated functions of FOXO1. Transcriptional and translational regulation of alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), fibronectin and  $\beta$ 1-integrin clustering by FOXO1 were studied. Additionally, spreading, collagen gel contraction and *in-vitro* scratch assays were performed. Moreover, we compiled a single-cell transcriptome atlas of wounded oral mucosa in young and aged Col1a2-Cre.FOXO1 mice and new collagen deposition by histological analysis. ANOVA or Kruskal-Wallis test followed by Tukey's or Dunn's post-hoc test, and Wilcoxon rank sum with Bonferroni correction was performed. Data is expressed as mean  $\pm$  SD (in vitro) or median  $\pm$  median deviation (transcriptomics). P<0.05 was considered statistically significant.

**Results:** FOXO1 inhibition reduced myofibroblast differentiation, fibronectin, collagen I levels, and  $\beta$ 1-integrin clustering in TGF- $\beta$ 1-treated HGFs. In addition, FOXO1 inhibition significantly reduced the cell spreading capacity, collagen gel contraction and, in vitro wound closure induced by TGF- $\beta$ 1 or fetal bovine serum. FOXO1 deletion delayed oral wounds repair in young mice by reducing collagen deposition and altering cellular composition. Aged mice showed a reduction in mesenchymal population and less fibrillar collagen expression. However, no significant histological differences were observed in old wounded FOXO1 knock-out mice. Transcriptomics data showed that FOXO1 regulates the expression of multiple collagen types in young and old mice. Noteworthy, FOXO1 deletion also increased the metalloproteinase -13 expression level in old knock-out mice.

**Conclusions:** The present study shows the critical role of the transcription factor FOXO1 through the modulation of several wound-associated functions in gingival fibroblast induced by TGF- $\beta$ 1. For the first time, we suggest  $\beta$ 1-integrin clustering regulation as a novel function of FOXO1. Also, the first single cell atlas of wounded oral tissue shows that FOXO1 regulatory function changes overtime and affects multiple collagens.

Keywords: Wound healing, FOXO1, TGF- $\beta$ 1, gingival fibroblast, single cell

# 1. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral se compone por tres tipos distintos de mucosa: revestimiento, masticatoria y especializada. En particular, la encía y el paladar duro presentan una mucosa masticatoria que se caracteriza por la alta densidad del tejido conectivo <sup>1</sup> (Figura 1). Una serie de procedimientos quirúrgicos ocurren en estas zonas como extracciones dentales y toma de injertos de tejido conectivo. El tejido conectivo gingival juega un papel crucial en la estabilización y conexión de diferentes estructuras que conforman los tejidos periodontales. Esto incluye la encía, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular a nivel del cuello dentario. Estos tejidos están expuestos a potenciales daños producto de su exposición a alimentos, microbioma oral, y trauma físico, químico y térmico que pueden ocurrir en la cavidad bucal. La restauración de la función de estos tejidos dependerá de una correcta reparación tisular <sup>2</sup>.



Figura 1. Esquematización de la mucosa oral de tipo masticatoria.

La mucosa masticatoria está presente en el paladar duro y encía. En ambos sitios, la mucosa está compuesta por tejido epitelial y conectivo. Los principales tipos celulares son las células epiteliales y fibroblastos, respectivamente. También se encuentran células inmunes residentes que están constantemente censando microorganismos orales. Imagen modificada de Moutsopoulos and Konkel (2017).

La fisiología de la reparación de heridas ha sido ampliamente estudiada. Los modelos de reparación de heridas dermales y orales comparten los principios generales de la reparación como la hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. Sin embargo, el tejido oral presenta características particulares que no permiten la directa extrapolación

de los resultados descritos en piel<sup>3,4</sup>. Por ello, se requiere del estudio particular en mucosas orales.

El proceso de reparación de heridas se encuentra finamente controlado por múltiples factores de transcripción que se encargan de modular los programas genéticos asociados a las distintas fases de la reparación<sup>5</sup>. La alteración en las funciones de estos factores de transcripción puede llevar a un retraso en la reparación o impedir el fenómeno de regeneración tisular. Los factores de transcripción responden a estímulos tales como la presencia de factores de crecimiento. Uno de los factores de crecimiento que es rápidamente liberado en el tejido dañado es el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1). TGF-β1 es una citoquina pleiotrópica que es secretada inicialmente por las plaquetas durante las primeras fases de la reparación, tiene efectos quimio-atrayentes en células inmune e induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en la fase de inflamación tardía<sup>6</sup>. Durante la fase de formación de tejido de granulación o de nueva formación de tejido, TGF- $\beta$ 1 es secretado por macrófagos, células epiteliales y fibroblastos <sup>7</sup>. La diferenciación de los fibroblastos inducida por TGF-β1 es una etapa crítica en la reparación tisular. Los fibroblastos sufren cambios ultraestructurales y adquieren características contráctiles al transformarse en miofibroblastos. El fenotipo del miofibroblasto se caracteriza por su forma ahusada, un aumento en el tamaño celular, actividad profibrótica, alta densidad de fibras de estrés y expresión de actina de músculo liso tipo alfa ( $\alpha$ -SMA)<sup>8,9</sup>. Los miofibroblastos colaboran en la producción, depósito y organización de matriz extracelular lo que favorece la contracción y el cierre de la herida.

### 1.1. Aspectos generales de la familia FOXO y su regulación funcional

En los últimos años se ha reportado la comunicación entre las vías de señalización de TGF- $\beta$ 1 y múltiples factores de transcripción. Algunos estudios han reportado una cooperación bidireccional entre TGF- $\beta$ 1 y el factor de transcripción Fork head box O (FOXO). En humanos, se han descrito cuatro isoformas de FOXO (FOXO1,3,4,6), los cuales traducen estímulos ambientales y estas señales promueven la transcripción de los

genes blanco <sup>10</sup>. El grupo de proteínas FOXO participan en procesos críticos como el metabolismo de la glucosa y lípidos, control del ciclo celular, diferenciación celular, homeostasis celular y regeneración tisular <sup>11–14</sup>.

FOXO1 es también llamado Fork head en rabdomiosarcoma (FKHR) debido a su participación en la formación de un gen quimera producto de una traslocación cromosomal en un tipo de tumor pediátrico maligno: rabdomiosarcoma alveolar<sup>15</sup>. El gen de FOXO1 está ubicado en el cromosoma 3 y 13 de ratón y humano, respectivamente. La proteína está constituida por aproximadamente 650 residuos de aminoácidos. Se han identificado cuatro dominios en la estructura de FOXO1: dominio de unión al ADN, señal de localización nuclear, una secuencia de exclusión nuclear y un dominio C-terminal de transactivación <sup>16</sup>. La actividad transcripcional de FOXO1 puede ser controlada por una serie de modificaciones post-traduccionales (Figura 2). Evolutivamente, la vía de señalización PI3K/AKT es una de las vías regulatorias de FOXO más conservadas <sup>17</sup>. La insulina y factores de crecimiento como PDGF activan AKT que fosforila directamente a FOXO1 en los residuos T24, S256, S319 y promueve su secuestro hacia el citoplasma, inactivándolo <sup>18</sup>. FOXO1 puede reingresar al núcleo. Sin embargo, la fosforilación de FOXO facilita la unión de la proteína chaperona 14-3-3. Si la unión ocurre en el citosol, la proteína 14-3-3 impide el reingreso de FOXO al núcleo <sup>19,20</sup>. De esta manera se impide la interacción de FOXO1 con el ADN. Cabe destacar, que la fosforilación de FOXO1 también puede promover el ingreso de FOXO al núcleo en algunos casos. Así, se ha reportado que la quinasa MST1 fosforila FOXO1 (S212) en condiciones de hipoxia y stress oxidativo. FOXO1 fosforilado ingresa al núcleo y regula la transcripción de genes asociados a la migración, adhesión y polaridad de las células endoteliales <sup>21</sup>. Lo anterior ejemplifica la relevancia del residuo de aminoácido modificado y en las condiciones en las que se induce la modificación post-traduccional para entender el efecto sobre la función transcripcional de FOXO1. Estas acciones opuestas también se observan en la metilación, acetilación y ubiquitinación de la familia FOXO<sup>17</sup>.



**Figura 2. Dominios y modificaciones post-traduccionales que regulan la función de FOXO1.** Desde el extremo N terminal se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD), sitio de localización nuclear (NLS), sitio de exclusión nuclear (NES) y, más cercano al extremo C terminal, se encuentra el dominio de transactivación. La fosforilación (P) de FOXO1 por AKT es una de las modificaciones post-traduccionales altamente conservadas. La fosforilación de FOXO1 facilita la unión de la proteína 14-3-3 y el posterior secuestro de FOXO1 del núcleo: disminuyendo su capacidad de unión al ADN. Otras modificaciones pueden alterar la función/localización de FOXO1 tales como la acetilación/deacetilación (Ac/dAc), metilación (Met), ubiquitinación(Ub) y O-glicosilación (Gl).

### 1.2. Inhibición de FOXO1 como modelo de investigación y terapéutico.

En el año 2010 se reportó una serie de inhibidores selectivos de FOXO1. La mayor afinidad y selectividad por FOXO1 se observó para la molécula pequeña AS1842856 que corresponde a un ácido carboxílico de estructura compleja. AS1842856 se une únicamente a sitios no fosforilados de FOXO1 (estado activo) y suprime la transactivación de FOXO1. El mecanismo de acción propuesto para AS1842856 es su unión a FOXO1 activo lo que impide la interacción de FOXO1 con los promotores de sus genes blanco. Al inhibir FOXO1 con este compuesto se ha observado una reducción favorable en los niveles de glucosa en modelos murino de diabetes <sup>22</sup>. Cabe destacar que la hiperglicemia promueve la diferenciación de fibroblastos debido a un aumento de TGF-β1 lo que conlleva a un proceso pro-fibrótico. El inhibidor de FOXO1 ha demostrado reducir el número de miofibroblastos y la producción de colágeno tipo I en fibroblastos cardiacos en condiciones de hiperglicemia <sup>23</sup>. Por otra parte, la administración tópica de AS1842856 en heridas de minipig diabéticos favoreció la reparación del tejido conectivo, pero no del tejido epitelial. Las heridas de los minipig diabéticos mostraron una disminución de miofibroblastos en los bordes y centro de la lesión. Este efecto fue revertido con la

administración temprana del inhibidor de FOXO1. Estos son los primeros reportes del uso de un inhibidor farmacológico de FOXO1 para el manejo de heridas dermales en un modelo de diabetes con resultados favorables <sup>24</sup>.

#### 1.3. Rol de FOXO1 en la reparación de heridas

En el tejido conectivo es posible detectar la expresión de FOXO1 y FOXO3 de forma ubicua <sup>25</sup>. En particular, se ha propuesto a FOXO1 como un mediador de la transición fibroblastos-a-miofibroblasto inducida por TGF- $\beta$ 1. En fibroblastos cardiacos, la estimulación con TGF- $\beta$ 1 indujo la expresión de FOXO1 y se observó un aumento en los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA. Por otro lado, el silenciamiento de FOXO1 provocó una reducción en los niveles de  $\alpha$ -SMA y esto se asoció con una menor capacidad de contracción de matrices de colágeno <sup>26</sup>. En queratinocitos, el silenciamiento de FOXO1 reduce la migración celular debido, en parte, a la reducción de múltiples proteínas asociadas a motilidad celular como las integrinas  $\alpha$ 3 y  $\beta$ 6. Además, se ha reportado que la deleción de FOXO1 altera negativamente la reparación y retrasa el cierre de la herida. La ausencia de FOXO1 reduce los niveles de TGF- $\beta$ 1 y disminuye la activación de la vía se señalización SMAD2/3 <sup>27</sup>. De esta forma se genera un eje de regulación TGF- $\beta$ 1-FOXO1. Estos datos in vitro e in vivo nos sugieren, fuertemente, que FOXO1 participa en el proceso de reparación de heridas regulando la migración, adhesión y diferenciación en algunos tipos celulares.

Estudios en reparación de heridas dermales han confirmado la participación de varias isoformas de la familia FOXO durante la reparación tisular. En muestras humanas y murinas, se observó que los genes altamente expresados durante la reparación presentaban gran cantidad de sitios de unión para los factores de transcripción FOXO1, FOXO3 y FOXO4 <sup>28</sup>. La cinética de expresión de FOXO1 durante la reparación de heridas varía entre estudios. Así, se ha reportado un incremento significativo de FOXO1 a partir del tercer día de reparación con un máximo de expresión al día 7 en heridas dermales de 10mm <sup>29</sup>. Por otro lado, se ha reportado una disminución de los niveles de FOXO1 y FOXO3 al

cuarto día de reparación en heridas dermales de 6mm. Estas diferencias en las cinéticas de expresión pueden deberse a que las heridas de mayor tamaño requieren de un mayor tiempo para lograr la hemostasia y eliminar las bacterias/células muertas, previo a empezar la formación de tejido de granulación <sup>30</sup>. Un hallazgo interesante de este estudio resultó de la deleción de FOXO3 en queratinocitos, ya que se observó una aceleración en el cierre de las heridas <sup>31</sup>. Estos resultados motivaron una serie de estudios que exploraron el papel de otras isoformas de FOXO en la reparación tisular. Sin embargo, la deleción de FOXO1 en queratinocitos tuvo efectos totalmente opuestos. La ausencia de FOXO1 en queratinocitos indujo una reducción en el cierre de la herida al cuarto día de reparación. Este efecto se debería a la reducción en la densidad vascular de la herida, menor producción de TGF-\u00df1 y enlentecimiento de la re-epiteliarización producto de una menor migración por parte de los queratinocitos <sup>13,27,32</sup>. Cabe destacar el trabajo realizado por Zhang et al., en el que evaluaron los efectos de la deleción de FOXO1 en queratinocitos sobre el tejido conectivo en distintas fases de la reparación de heridas dermales. La ausencia de FOXO1 en los queratinocitos alteró la producción de colágeno, reduciéndola en cerca de un 40% respecto al grupo control, al cuarto y séptimo día posterior a la realización de la herida. El mecanismo que explicaría estos resultados está dado por la regulación de TGF-\beta1 y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) por parte de FOXO1 en los queratinocitos y que impactarían de forma paracrina sobre la función de los fibroblastos. Los autores confirmaron la participación de este mecanismo ya que en los ratones que portaban una deleción de FOXO1 en queratinocitos se observó una reducción del 60% de TGF-\u00df1 en el tejido conectivo. Además, la incorporación exógena de TGF- $\beta$ 1 en este modelo fue capaz de rescatar el déficit de tejido conectivo <sup>14</sup>. Estos resultados son la única evidencia que, de forma indirecta, relaciona el rol de FOXO1 sobre células del tejido conectivo durante de reparación de heridas.

### 1.4. Rol de las integrinas en la reparación del tejido conectivo

Las integrinas participan en la migración, adhesión, *spreading* y remodelación de la matriz extracelular, y la alteración de estas funciones impactan negativamente en la reparación tisular <sup>33</sup>. Durante la formación de tejido de granulación, los fibroblastos interactúan con

múltiples proteínas de la matriz extracelular (MEC) tales como vitronectina, fibrinógeno y fibronectina a través de las integrinas <sup>34</sup>. En particular, la integrina beta 1 ( $\beta$ 1) permite la unión celular a proteínas como fibronectina y colágeno en fibroblastos formando parte de un complejo de adhesión focal <sup>35</sup>.

En células adherentes se ha observado que la interacción integrina-MEC activa a la integrina y promueve la formación de grandes acúmulos de integrinas (clústeres). Lo anterior favorece el *spreading* celular <sup>36,37</sup>. Los estudios acerca de la regulación de integrina  $\beta$ 1 por FOXO1 son escasos. En queratinocitos, el silenciamiento de FOXO1 reduce en un 50% los niveles de transcrito de integrina  $\beta$ 1 y se observó resultados similares sobre otras subunidades beta como integrina  $\beta$ 3 y  $\beta$ 6 <sup>38</sup>. A la fecha, no existen reportes de la regulación de la integrina  $\beta$ 1 en fibroblastos mediada por FOXO1 ni el posible impacto que este tendría en la reparación de heridas.

## 1.5. Efectos deletéreos del envejecimiento en la reparación de heridas

FOXO sufre importantes modificaciones durante el envejecimiento y en enfermedades asociadas a este proceso. El envejecimiento es un fenómeno caracterizado por el decaimiento progresivo de las funciones de la célula o tejido que se manifiesta gradualmente en cambios moleculares que finalmente afectan el funcionamiento del organismo y aumentan la probabilidad de muerte. Los mecanismos que inducen envejecimiento son múltiples, entre ellos destaca la atrición de los telómeros, disfunción mitocondrial, inestabilidad genómica y senescencia celular. Estos procesos están acompañados de cambios en factores sistémicos durante el envejecimiento como la inflamación crónica de bajo grado y alteraciones en la composición de células inmunes y progenitoras <sup>39,40</sup>. Todos estos mecanismos y factores convergen en un proceso de acumulación de daño celular <sup>41</sup>. La mucosa oral en pacientes geriátricos pierde parte de su capacidad elástica con el envejecimiento y esto se debe a una alteración en la organización de las fibras colágenas y el contenido acuoso<sup>42</sup>. Además, disminuye la microvasculatura que altera la reparación de los tejidos orales <sup>43</sup>. Sin embargo, la apariencia clínica de una mucosa oral proveniente de un individuo envejecido es difícil de

distinguir de uno joven. La población adulto mayor ha sido subclasificada según rango etario. Así, los adultos mayores entre 65-74 años son descritos como "viejo-joven"; entre 75-84 años como "viejo-intermedio" y sobre 85 años como "viejo-mayor"<sup>44</sup>. El estudio clave de Engeland et al. (2006) reportó los patrones de reparación de heridas en mucosa oral (paladar duro) en individuos jóvenes (18-35 años) y un amplio rango de adultos mayores (50-88 años) mediante un seguimiento diario por 7 días. Se cuantificó el área de cierre de la herida y, al segundo día de seguimiento, se observó un incremento significativo en el cierre de la herida en los sujetos jóvenes respecto a los individuos envejecidos. Este patrón de respuesta se observó hasta el final del estudio <sup>45</sup>. A nivel celular, se ha reportado que los fibroblastos provenientes de donantes adulto mayor (50-70 años) presentan una capacidad proliferativa y de migración disminuida. Además, los autores detectaron una menor diferenciación a miofibroblastos y una remodelación de colágeno alterada. El modelo de reparación de herida (gingival) en ratas envejecidas confirmó estos hallazgos y demostró una formación deficiente de tejido conectivo <sup>46</sup>. En conjunto, estos datos nos indican que el envejecimiento altera la capacidad reparativa, en parte, alterando la funcionalidad de los fibroblastos.

### 1.6. Alteración de la actividad y función de FOXO durante el envejecimiento

La evidencia sobre FOXO1 en el proceso de reparación de heridas en modelos de envejecimiento es inexistente a la fecha. Sin embargo, existe información de patrones de expresión de FOXO1 y su actividad transcripcional en el envejecimiento. En estudios de daño de cartílago debido al envejecimiento, se ha reportado una disminución en la expresión de algunas de las isoformas de FOXO en humanos y ratones. Por otra parte, la deleción de las isoformas de FOXO agrava la degeneración del cartílago en estos modelos <sup>47</sup>. En particular, FOXO1 se expresa en sujetos jóvenes (25 años) pero no se observaron diferencias significativas respecto a los sujetos envejecidos (56 años). Sin embargo, en sujetos con osteoartritis (72 años) la expresión de FOXO1 disminuye significativamente. Por otro lado, en un modelo murino de envejecimiento de la articulación, se observó que FOXO1 disminuyó específicamente en zonas vasculares del cartílago respecto a su control joven <sup>48</sup>. En un modelo de envejecimiento en la mosca de la fruta, se observó un cambio

en la capacidad de unión de FOXO al ADN y una alteración en la regulación de sus genes blanco. Resulta interesante que los genes generalmente reprimidos por FOXO en moscas jóvenes, se vieron gradualmente incrementados en las moscas envejecidas <sup>49</sup>. Debido a que la respuesta fisiológica de múltiples procesos biológicos decaen producto del envejecimiento <sup>50</sup>, creemos que el envejecimiento altera la respuesta mediada por FOXO1 en los fibroblastos durante la reparación de la mucosa oral.

Los reportes presentados permiten plantearnos algunas preguntas: ¿El factor de transcripción FOXO1 participa en la regulación de la reparación del tejido conectivo gingival? Y de existir una regulación, ¿Cuál es el efecto del envejecimiento sobre la funcionalidad del factor de transcripción FOXO1 durante la reparación de heridas?

Estas interrogantes requieren ser investigadas para una mejor comprensión de la reparación del tejido conectivo en heridas orales en distintas etapas de la vida. Por lo tanto, en este estudio se ha explorado las funciones reguladas por FOXO1 en fibroblastos de la mucosa masticatoria durante la reparación del tejido conectivo y los posibles cambios transcripcionales de sus genes blanco durante el envejecimiento.

# 2. HIPÓTESIS

El factor de transcripción FOXO1 es necesario para las funciones asociadas a reparación de heridas en fibroblastos gingivales y el envejecimiento altera la regulación de la reparación del tejido conectivo oral mediada por FOXO1.

# 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar las funciones asociadas a reparación de heridas que son reguladas por FOXO1 en fibroblastos gingivales jóvenes y envejecidos.

# 3.1. Objetivos específicos

Determinar la función de FOXO1 sobre la diferenciación y capacidad contráctil de fibroblastos gingivales humanos, el ensamblaje de la matriz extracelular y la formación de contactos de adhesión focal.

Evaluar la participación de FOXO1 sobre la reparación de heridas en mucosa oral en individuos jóvenes y envejecidos.

# 4. MATERIALES Y MÉTODOS

## 4.1 Cultivo celular y tratamientos

Se realizó un cultivo primario de fibroblastos obtenidos de explantes gingivales de individuos jóvenes (10-13 años) y sistémicamente sanos. Se contó con la aprobación del comité de ética de la Pontificia Universidad Católica de Chile (N°160823025). Se determinó un tamaño muestral de sujetos jóvenes igual a 3 (n=3) en base al análisis de poder utilizando datos de niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA previamente reportados en fibroblastos humanos jóvenes y envejecidos, un error  $\alpha$ =0.05,  $\beta$ =0.2 y una potencia del 80% <sup>46</sup>. Los fibroblastos fueron sembrados sobre colágeno tipo I (50µg/ml; Collagen I Rat protein, Gibco<sup>TM</sup>) y mantenidos en DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) (Biological Industries) y 1% penicilina/estreptomicina en una cámara de cultivo a 37°C y un 5% CO<sub>2</sub>. Para todos los experimentos se utilizó medio sin suero. Además, una concentración de 0,5 µM del inhibidor de FOXO1 (AS1842856, Calbiochem, Merck) fue añadido 1h antes del estímulo con TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) (rh-TGF- $\beta$ 1;240-b, R&D).

### 4.2 Inmunofluorescencia

Los fibroblastos (5x10<sup>4</sup> células/pocillo) ya estimulados, se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 min. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0.25% por 30 min. Para prevenir a unión inespecífica de los anticuerpos, se realizó utilizó una solución de bloqueo (1% BSA en PBS 1x). Los anticuerpos primarios fueron diluidos en buffer de bloqueo e incubados por el tiempo sugerido por el fabricante. Generalmente, por toda la noche a 4°C. Luego de realizar tres lavados por PBS 1x, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario por 1h a 37°C en una cámara húmeda. Para la tinción de fibronectina, las células se encontraban vivas y posteriormente se fijaron para la tinción nuclear. Se detalla los anticuerpos y concentraciones utilizados en la **Tabla 1**. Para el ensayo de integrinas mediante microscopía TIRF, se siguieron las recomendaciones propuestas por otros autores para preservar las estructuras de adhesión <sup>36</sup>. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioplan, Germany) o microscopio TIRF (Nikon, Eclipse Ti2-E) y el análisis de las imágenes se realizó mediante Fiji.

Tabla 1. Anticuerpos para inmunofluorescencia		
Anticuerpo o Tinción	[Ab-	[Ab-Secundario]
	Primario]	Alexa Fluor® 488 ó
		555
α-SMA (mab1420,R&D)	1:300	1:400
Fibronectina (ab2413, Abcam)	1:300	1:400
Integrina β1 (mab2247, Merckmillipore)	1:250	1:400
DAPI (Invitrogen)	1:5000	
Faloidina (21834, Thermo Fischer Scientific)	1:250	
FOXO1 (C29H4, Cell signaling Technology)	1:50	1:400

## 4.3 Ensayo de contracción de geles

Un total de  $5x10^4$  células previamente estimuladas con las distintas condiciones experimentales fueron sembradas en placas de 96 pocillos. Los pocillos fueron tratados previamente con colágeno a alta concentración (1mg/ml). Luego, fueron estimuladas por otras 16h para inducir la contracción de la matriz colágena. Posteriormente, se desprendió el gel de los bordes del pocillo y se registró el cambio en el área del gel a los 60 min en comparación al área del gel completamente adherido al pocillo. Se registró el área inicial y final del gel de colágeno para evaluar la capacidad contráctil de los fibroblastos.

## 4.4 Western Blot

Las células fueron tratadas con TGF- $\beta$ 1, inhibidor de FOXO1 o la combinación de ambos por 72h. Se realizó la lisis celular mediante buffer RIPA suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasa (set I, Calbiochem). La concentración de proteína fue determinado utilizando el kit BCA Protein Assay (23227,Thermo Fischer Scientific). Cantidades equivalentes de proteínas fueron corridas en geles de poliacrilamida al 6% o 10% según corresponda. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF por 16h a 4°C. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos: mouse anti- $\alpha$ -SMA (1:500; mab1420, R&D), rabbit anti-fibronectin (1:1000;ab2413, Abcam), mouse anti-integrin  $\beta$ 1 (1:500;mab2247, Merckmillipore), mouse anti-vinculina (1:1000) y rabbit anti-GAPDH (1:1000). El anticuerpo secundario conjugado con HRP (1:10.000) fue incubado por 2h a temperatura ambiente en agitación. Se utilizaron los agentes reveladores ECL Western Blotting Substrate (ECL Pierce or SuperSignal West Femto, Thermo Fischer Scientific) por 1 minuto y se expusieron placas radiográficas por 5-7 min para la detección.

#### 4.5 Ensamblaje de fibronectina

Se realizó una lisis en dos etapas mediante el detergente deoxicolato al 2% (Buffer DOC). La centrifugación permitió la separación de la fracción soluble. Se fraccionó el pellet y posterior a una segunda centrifugación, se obtuvo la fracción insoluble. Ambas fracciones fueron corridas en geles de poliacrilamida al 6% para su análisis por Western Blot.

### 4.6 Ensayo de herida in vitro

Los ensayos de cierre de herida in vitro se llevaron a cabo siguiendo la estrategia propuesta por Liang et al. <sup>51</sup>. Un total de 15x10<sup>4</sup> células se sembraron en placas de 24 pocillos y se mantuvieron hasta alcanzar un 90% de confluencia. El inhibidor de FOXO1 fue añadido 1h antes de realizar la herida con una punta de micropipeta estéril p200. Luego, se estimularon con todas las condiciones experimentales por 16h. Se fijaron las células con PFA 4% y se realizó una tinción con cristal violeta al 0.2% por 2 minutos. Luego de múltiples lavados con PBS 1x se capturaron las imágenes con una lupa estereoscópica. El cierre de las heridas fue analizado mediante ImageJ utilizando la herramienta MRI Wound Healing. Los parámetros fueron ajustados a cada ensayo y se utilizó la misma configuración para todas las muestras de cada serie. Se calculó el cierre de la herida como el porcentaje del área final respecto al área inicial.

## 4.7 PCR en tiempo real

Las células fueron estimuladas con cada condición experimental por 24h y el RNA total fue aislado mediante Trizol (Ambion Life Technologies). La transcripción reversa se llevó a cabo utilizando 2µg de RNA por muestra, transcriptasa reversa M-MLV y primers oligo (dT) (Promega). El análisis de los niveles de expresión de mRNA se realizó mediante PCR cuantitativo utilizando el instrumento LightCycler96® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). La reacción requirió 200ng de cADN y el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, IN, USA). Los primers están detallados en la **Tabla 2** y GAPDH fue utilizado como gen housekeeping. La cuantificación se realizó mediante el método comparativo 2- $\Delta\Delta$ Ct y utilizando el modelo descrito por Pfaffl <sup>52</sup>.

Tabla 2. Primers para RT-qPCR				
Gen	Forward $5' \rightarrow 3'$	Reverse 5'→ 3'		
FN	AAATGAGGGCTGCACATTGC	TCTTGGTTGGCTGCATATGC		
COL I	AGACGGTTCTCCTGGC	AGCAGGACCAGTCTCAC		
ITGB1	GTCGTGTGTGTGAGTGCAAC	CCAAGGCAGGTCTGACACAT		
a-SMA	GCCGACCGAATGCAGAAGGA	TGCGGTGGACAATGGAAGGC		
GAPDH	CAAAATCAAGTGGGGGCGATGCTG	TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT		

## 4.8 Tinciones histológicas y análisis

Las muestras montadas en parafina fueron teñidas con tinción de hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson. En las heridas se cuantificó la neoformación de tejido conectivo utilizando el software ImageJ y siguiendo el protocolo descrito por Chen at al. <sup>53</sup> que se basa en deconvolución de color. El área de nuevo colágeno depositado se presenta como porcentaje respecto al área total de tejido conectivo.

#### 4.9 Modelo de cierre de herida en ratones transgénicos

Se utilizaron ratones jóvenes (3-6 meses) y envejecidos (12-24 meses) B6-Col1a2cre/ERT;Foxo1 para dirigir la deleción de FOXO1 en fibroblastos mediante la administración de tamoxifeno (5mg/diarios) por 5 días. Cada condición presenta dos grupos experimentales: Cre-negativo y Cre-positivo. Todos los grupos fueron tratados con tamoxifeno. A cada animal se le generó una herida de 1mm en mucosa palatina con un punch para biopsia (Biopsy Punch Dermal 1mm; Acu-Punch, Acuderm). Se realizó la eutanasia a los 7 días posterior a la herida.

## 4.10 Citometría de flujo y sorting

Se obtuvo una biopsia de mucosa oral de 8-10 ratones Col1a2-Cre/ERT-FOXO1<sup>f/f</sup> al séptimo día posterior a la cirugía y se realizó la digestión enzimática del tejido. El buffer de digestión contiene colagenasa tipo IV (3.2mg/ml), DNAsa I (0.15mg/ml) y DMEM suplementado con 0.8% FBS. Se marcaron las células con los siguientes anticuerpos: CD45-FITC, CD31-APC, Ter119-APC y Epcam-APC. Se añadió DAPI, 5 minutos antes de correr la muestra en el citómetro. Se recolectaron las células vivas CD31-/Ter119-/Epcam-/CD45- en DMEM suplementado con FBS 10%.

# 4.11 Secuenciación de RNA de célula única en ratones Col1a2-Cre/ERT-FOXO1f/f

La suspensión celular aislada por FACS fue llevada al centro de genómica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Pennsylvania. El personal del centro de genómica preparó la librería mediante el kit Chromium Single Cell 3´ y la plataforma 10x Chromium Controller. De un total de 5.000-10.000 células blanco se realizaron 17.000-25.000 lecturas por cada célula en la plataforma Illumina Hiseq4000. Se utilizó Cell Ranger para el mapeo de las secuencias al genoma murino (GRCm38, mm10) y el análisis se realizó en el programa R utilizando el protocolo descrito por Seurat (Guided Clustering Tutorial; https://satijalab.org/seurat/articles/pbmc3k\_tutorial.html)

# 4.12 Análisis estadístico

Se evaluó la distribución de las muestras con la prueba de Levene y se utilizó el análisis paramétrico (ANOVA) o no paramétrico (Kruskal Wallis) para comparar los promedios ± desviación estándar. La significancia estadística p<0.05 fue calculado y graficado con Prism Software. Para los datos de secuenciación se utilizó Seurat para realizar el análisis

diferencial de genes. Se usó la prueba Wilcoxon rank sum con corrección de Bonferroni. Se consideró la significancia estadística con valor p ajustado (adj\_p) < 0.05.

## 5. RESULTADOS



## 5.1 Efectos del compuesto AS1842856 sobre la localización de FOXO1

Figura 3. El inhibidor de FOXO1 promueve la traslocación citosólica de FOXO1.

(A) Imágenes representativas del FOXO1 total (epítope C29H4) a las 6h de estimulación, identificado por inmunofluorescencia. FOXO1 conjugado con anticuerpo secundarios Alexa Fluor® 488 (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul). Barra de magnificación =  $50\mu$ m. (B) El gráfico representa el porcentaje de células que presentan localización nuclear de FOXO1. Datos expresados en promedio  $\pm$  DS (n=2; conteo de al menos 40 células por condición). Flecha amarilla indica localización nuclear; flecha roja: localización citosólica.

La **Figura 3** muestra que en condiciones basales, la expresión de FOXO1 nuclear es detectado en un bajo porcentaje de la población celular (5%). En cambio, TGF- $\beta$ 1 triplica la localización nuclear de FOXO1 a las 6h de estimulación respecto al control. Sin embargo, este incremento no se observa a las 3 o 24h de estimulación (**Figura S1**). Ante el pre-estímulo con el inhibidor de FOXO1 (AS1842856, Calbiochem) se observa la traslocación citosólica de FOXO1 en presencia de TGF- $\beta$ 1. Estos datos preliminares nos siguieren que el inhibidor de FOXO1 disminuye la posibilidad de FOXO1 de interactuar a nivel nuclear, lo que afecta su capacidad regulatoria transcripcional.







(A) Imágenes representativas del citoesqueleto de actina por inmunofluorescencia. El citoesqueleto teñido con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). Barra de magnificación= 100 $\mu$ m. (B) El gráfico representa el área ( $\mu$ m<sup>2</sup>) celular expresado en promedio ± DS (n=60 células). Se aplicaron las pruebas Kruskal-Wallis y Dunn's. (C) Distribución de α-SMA por inmunofluorescencia a las 72h de estimulación.

Se muestra la proteína  $\alpha$ -SMA en verde y los núcleos con DAPI (azul). Barra de magnificación= 100µm. (**D**) El gráfico representa el porcentaje de células  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> respecto del total de células por campo. Datos expresados como promedio ± DS (n=4). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's. (**E**) Niveles relativos de mRNA de  $\alpha$ -SMA a las 24h de estimulación mediante qRT-PCR. La expresión del transcrito se muestra relativa al control. Datos expresados como promedio ± DS (n=5). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's. (**F**) Niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA a las 72h de estimulación mediante Western blot. El gráfico representa los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA. Control de carga: vinculina. Los datos se muestran como promedio ± DS (n=4). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's. \*, significancia estadística p<0.05 para todas las pruebas utilizadas.

Se evaluaron los cambios morfológicos en fibroblastos gingivales humanos durante la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF- $\beta$ 1. Se determinó los cambios en el tamaño celular mediante el análisis del citoesqueleto de actina cortical. La **Figura 4A** muestra imágenes representativas de inmunofluorescencia de actina. Las células tratadas con TGF- $\beta$ 1 aumentaron su área celular y este efecto fue significativamente disminuido (p<0.0001) en presencia de iFOXO (**Figura 4B**). La estimulación con TGF- $\beta$ 1 también fue capaz de inducir la expresión de α-SMA (**Figura 4C**), marcador de activación de miofibroblastos. Por otro lado, la pre-incubación con iFOXO redujo significativamente (p<0.0001) el número de células α-SMA<sup>+</sup>, contrarrestando el efecto de TGF- $\beta$ 1 (**Figura 4D**).

Adicionalmente, se cuantificó el efecto del inhibidor de FOXO1 sobre la expresión de  $\alpha$ -SMA a nivel mRNA y proteína. La estimulación con TGF- $\beta$ 1 induce un aumento de los niveles de mRNA de  $\alpha$ -SMA respecto al control y el inhibidor de FOXO1 reduce 2.8 veces este efecto (**Figura 4E**). Un patrón similar se observó en la **Figura 4F**, ya que iFOXO redujo significativamente (p=0.03) los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA inducido por TGF- $\beta$ 1. Estos datos sugieren la participación de FOXO1 en dos procesos característicos de la diferenciación a miofibroblastos como son el aumento del tamaño celular y el incremento en la expresión de  $\alpha$ -SMA.

## 5.3 Efectos de la inhibición de FOXO1 sobre proteinas de la matrix extracelular





(A) Imágenes representativas de la red de fibronectina por inmunofluorescencia (n=3). La fibronectina se muestra en verde y los núcleos en azul (DAPI). Barra de magnificación=  $50\mu$ m. (B) Niveles relativos de mRNA de *Fibronectina* a las 24h de estimulación mediante qRT-PCR. La expresión del transcrito se muestra relativa al control. Datos expresados como promedio ± DS (n=5). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's. (C) Imagen representativa de ensayo de Western blot para fibronectina insoluble en deoxicolato a las 72h de estimulación. (D) El gráfico representa los niveles proteicos de fibronectina insoluble. Control de carga: vinculina. Los datos se expresan relativos al control y se muestran como promedio ± DS (n=3). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's. \*,significancia estadística p<0.05 para todas las pruebas utilizadas.

Los miofibroblastos se caracterizan por producir y organizar eficientemente la matriz extracelular, lo que le otorga propiedades como insolubilidad y mayor resistencia. Por ello, se evaluó la producción de proteínas de matriz y su ordenamiento, en fibroblastos gingivales humanos estimulados con TGF- $\beta$ 1 en presencia ó ausencia del inhibidor de FOXO1.

El entrecruzamiento de fibronectina es un proceso que facilita la movilidad de los fibroblastos y otorga estabilidad a la matriz extracelular. Mediante un ensayo de inmunofluorescencia en célula viva (**Figura 5A**) se observa como TGF- $\beta$ 1 promovió la formación de un patrón en red de fibronectina que facilita la conexión intercelular. Sin embargo, la pre-incubación con el iFOXO generó una disrupción en la formación de redes. La **Figura 5B** muestra un aumento de los niveles de mRNA de fibronectina inducido por TGF- $\beta$ 1 respecto al control. El inhibidor de FOXO1 redujo significativamente en 2.2 veces este efecto. Por último, mediante la identificación de la fracción insoluble de fibronectina por Western blot, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales, a las 72 horas de estimulación (**Figura 5C-D**). Estos datos sugieren que FOXO1 participa en la regulación transcripcional y potencialmente en la organización de fibronectina.

Otra función característica de los miofibroblastos durante la reparación de heridas es su alta capacidad contráctil que permite reducir el tamaño de la herida. Primero, se analizaron los niveles transcripcionales de una de las principales proteínas de matriz producida por los fibroblastos: colágeno tipo I. Posteriormente, se determinó la capacidad contráctil de los fibroblastos sobre una matriz de colágeno. La **Figura 6A** muestra un aumento en la expresión de mRNA de colágeno tipo I en fibroblastos estimulados con TGF- $\beta$ 1 respecto al control, y este efecto se reduce en casi el 50% en presencia de iFOXO. El inhibidor de FOXO1 altera la respuesta de las células estimuladas con TGF- $\beta$ 1, obteniendo valores de contracción similares al grupo control (**Figura 6B-C**). Por lo tanto, estos resultados
sugieren una regulación de las características contráctiles de los fibroblastos por parte de FOXO1.

(B)

(C)







#### Figura 6. FOXO1 regula la contracción de matriz colágena en presencia de TGF-β1.

(A) Niveles relativos de mRNA de *Colágeno I* a las 24h de estimulación mediante qRT-PCR. La expresión del transcrito se muestra relativa al control. Datos expresados como promedio  $\pm$  DS (n=5). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's. (B) Imágenes representativas de geles de colágeno al término de la estimulación (1h). (C) El gráfico representa el porcentaje del area final respecto al área inicial del gel. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  DS (n=4). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's. \*,significancia estadística p<0.05 para todas las pruebas utilizadas.

En estudios in vitro se ha demostrado que el FBS es un potente inductor no-específico de la migración, debido a que contiene múltiples quimioquinas y factores de crecimiento, entre ellos, TGF- $\beta$ 1<sup>54</sup>.

# 5.4 Efectos de la inhibición de FOXO1 sobre la migración de fibroblastos gingivales

La **Figura 7A** corresponde a una imagen representativa del ensayo de herida in vitro en células pre-incubadas con iFOXO en presencia de FBS 1% por 16 horas. Se utilizó como control negativo a iFOXO y como control positivo a FBS 5%. El estímulo con 1% FBS promueve el cierre de la herida en promedio un 37% y, en presencia de iFOXO, una menor área de la herida cubierta por células, por lo que el cierre de herida se ve significativamente disminuido (**Figura 7B**). Estos resultados sugieren que FOXO1 promueve la migración de las células al centro de la herida para promover su cierre.



Figura 7. La inhibición de FOXO1 disminuye el cierre de herida en presencia de suero fetal bovino.

(A) Imágenes representativas de ensayo de herida in vitro a las 16h de estimulación. Las células se estimularon con FBS 1% en presencia o ausencia del inhibidor de FOXO1. FBS 5% se utilizó como control positivo de cierre de herida. Las líneas punteadas representan los bordes de la herida inicial. (B) El gráfico representa el porcentaje del área inicial cubierta por células a las 16h de estimulación. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  DS (n=7). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's. \*, significancia estadística p<0.05.



#### 5.5 Efectos de la inhibición de FOXO1 sobre la integrina \beta1 y el spreading celular

Figura 8. FOXO1 modula la expresión y los niveles proteicos de integrina β1.

(A) Niveles relativos de mRNA de *integrina*  $\beta l$  a las 24h de estimulación mediante qRT-PCR. La expresión del transcrito se muestra relativa al control. Datos expresados como promedio  $\pm$  DS (n=5). (B) Imagen representativa y gráfico de ensayo de Western blot para integrina- $\beta l$  (total) bajo condiciones reductoras a las 72h de estimulación. Datos expresados como promedio  $\pm$  DS (n=3). (C) Imagen representativa y gráfico de ensayo de Western blot para integrina- $\beta l$  (activa) bajo condiciones no-reductoras a las 72h de estimulación. Datos expresados como promedio  $\pm$  DS (n=3). (C) Imagen representativa y gráfico de ensayo de Western blot para integrina- $\beta l$  (activa) bajo condiciones no-reductoras a las 72h de estimulación. Datos expresados como promedio  $\pm$  DS (n=3). GAPDH corresponde al control de carga. Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey's con significancia estadística p<0.05, en todos los ensayos.

A raíz del potencial rol de FOXO1 en la migración celular, nos interesamos en proteínas que estuvieran involucradas tanto en migración como en la organización de la matriz

extracelular como las integrinas. En particular, la integrina- $\beta$ 1 participa en la adhesión y migración celular gracias a sus sitios de unión a colágeno y fibronectina.

La **Figura 8A** muestra como la estimulación con TGF- $\beta$ 1 induce un aumento de los niveles de mRNA de integrina- $\beta$ 1 respecto al control y, en presencia de iFOXO, los niveles del transcrito se reducen significativamente. Al observar los niveles proteicos de integrina- $\beta$ 1 en condiciones reductoras, observamos el mismo patrón de respuesta que para los niveles de mRNA (**Figura 8B**). Para preservar la conformación estructural que permite detectar la forma activa de integrina- $\beta$ 1 (12G10), analizamos los niveles proteicos en condiciones no reductoras (**Figura 8C**). Bajo estas condiciones, es posible visualizar dos bandas entre 95-130 kDa en todas las condiciones experimentales. En particular, TGF- $\beta$ 1 induce un incremento de integrina- $\beta$ 1 activa respecto al grupo control. Sin embargo, no se observó una diminución estadísticamente significativa (p=0.057) sobre los niveles de proteína en células pre-incubadas con iFOXO y estimuladas con TGF- $\beta$ 1.

Para evaluar la funcionalidad de la integrina- $\beta$ 1 activa, se evaluó la capacidad de *spreading* celular. Las células fueron pre-incubadas con iFOXO y estimuladas con TGF- $\beta$ 1 por 24h. Posteriormente, se utilizó tripsina para abolir la adhesión celular. Esta suspensión celular se sembró en nuevos cubreobjetos cubiertos con colágeno durante 1 hora (**Figura 9A**). Luego de 1 hora de adhesión, se analizó el área celular mediante tinción de actina. El estímulo con TGF- $\beta$ 1 induce mayor área celular respecto al grupo control, y en presencia de iFOXO la capacidad de *spreading* se reduce significativamente, similar a los valores de grupos control (**Figura 9B-C**). Para confirmar la participación de integrina- $\beta$ 1 activa en el proceso de *spreading*, se identificó el epítopo 12G10 mediante inmunofluorescencia (**Figura 9D**). Las imágenes representativas por microscopía TIRF nos indican la presencia basal de integrina- $\beta$ 1 activa en los grupos control y un aumento en el tamaño de los clústeres de integrina- $\beta$ 1 en células estimuladas con TGF- $\beta$ 1. La **Figura 9E** demuestra una disminución significativa en el área total de integrina- $\beta$ 1 activa en células pre-incubadas con iFOXO y estimuladas con TGF- $\beta$ 1. Además, se sugiere que existe una dependencia entre el tamaño celular y el área total de integrina- $\beta$ 1 activa

(**Figura 9F**). Las células de mayor tamaño presentan cerca de un 10% de su área cubierta por integrina- $\beta$ 1 activa. Por otro lado, el inhibidor de FOXO1 reduce tanto el tamaño celular y solo un 5% de esta área es posible detectar integrina- $\beta$ 1 activa.

En conjunto, los datos de la Figura 9 nos sugieren que FOXO1 es requerido para la producción y organización en clústeres de integrina- $\beta$ 1 activa en células estimuladas con TGF- $\beta$ 1.



**Figura 9. La inhibición de FOXO1 reduce el** *spreading* **celular y** *clustering* **de integrina-β1 activa.** (A) Esquema de diseño experimental. (B) Imágenes representativas de *spreading* celular posterior a una hora de adhesión por inmunofluorescencia de actina. Barra de magnificación= 100μm. (C) El gráfico

representa el área ( $\mu$ m<sup>2</sup>) celular expresado en promedio ± DS (n=90-100 células; 3 experimentos independientes). Se aplicaron las pruebas Kruskal-Wallis y Dunn´s. \*, significancia estadística p<0.05. (**D**) Imágenes representativas de integrina- $\beta$ 1 (activa;12G10) al término del experimento (1h) mediante microscopia TIRF. Barra de magnificación= 10 $\mu$ m. (**E**) El gráfico representa el área total integrina- $\beta$ 1 activa ( $\mu$ m<sup>2</sup>). Los datos se muestran como promedio ± DS (n=6). (**F**) El gráfico representa el porcentaje del área total integrina- $\beta$ 1 activa respecto al área total de su respectiva célula. Los datos se muestran como promedio ± DS (n=7). Se aplicaron las pruebas ANOVA y Tukey´s y se consideró significancia estadística \*p<0.05, en (D) y (E).



### 5.6 Modelo de herida in vivo y genotipificación de muestras

**Figura 10. Diseño experimental de la deleción de FOXO1 en fibroblastos en un modelo murino.** (A) Línea de tiempo experimental indicando el pretratamiento con tamoxifeno por 5 días, cirugía oral, periodo de reparación de herida por 7 días y finalización de experimento. (B) Diseño experimental en ratones jóvenes Col1a2-cre/ERT;Foxo1 indicando el tipo de ensayo realizado: a) secuenciación de célula única (10x Chromium), b) Histología en ratones jóvenes (3-6 meses) y viejos (24 meses).

Con el fin de validar alguno de los resultados obtenidos in vitro, se utilizó un modelo murino de deleción de FOXO1 en fibroblastos. Los ratones transgénicos utilizados expresan la enzima cre-recombinasa bajo el promotor de colágeno  $1\alpha 2$  y el ingreso de la enzima al núcleo es iniciado por el fármaco tamoxifeno. El esquema de tratamiento con tamoxifeno se muestra en la **Figura 10A**. En los ratones Col1a2-cre/ERT;Foxo1 jóvenes se realizó una herida palatina mediante un punch quirúrgico de 1mm diámetro. Se permitió la reparación de la herida durante 7 días y se obtuvieron muestras para histología como también para secuenciación de célula única (**Figura 10B**).



Figura 11. Genotipificación de ratones Col1a2-cre/ERT;Foxo1 mediante PCR.
(A) Biopsias de oreja de ratones Col1a2-cre/ERT;Foxo1 analizadas por PCR para FOXO1. Bandas enmarcadas en color amarillo corresponden a una muestra con flanqueo heterocigoto que contiene una banda de 300 y 247 Kb; Banda enmarcada en azul corresponde a una muestra con flanqueo homocitogo: se observa una banda única de 300 Kb. (B) Biopsias de oreja de ratones Col1a2-cre/ERT;Foxo1 analizadas por PCR para la enzima Cre recombinasa. Banda cercana a los 650 Kb (enmarcada en rojo) indica la presencia del gen cre-recombinasa.

Para cada experimento se realizó la confirmación del genotipo de cada animal como se muestra en la **Figura 11A-B**. Se caracterizó el genotipo de todos los ratones dos veces mediante una biopsia de la oreja y cola, al inicio y termino del experimento, respectivamente. En la **Figura 11A** se observa una banda cercana a los 300 Kb que corresponde a la secuencia de ADN de FOXO1 flanqueada por LoxP. Por el contrario, en el carril 5 y 12 (L5 y L12) se observan dos bandas que indican un flanqueo parcial de FOXO1. Además, en la **Figura 11B** se observa una banda alrededor de los 650 Kb que corresponde a la expresión de la enzima cre-recombinasa (Cre+). Se agruparon los animales que presentaron FOXO1 flanqueado y la enzima cre-recombinasa como "Cre+", mientras que los que solo presentaron FOXO1 flanqueado formaron el grupo "Cre-".

### 5.7 Análisis histológico de H&E y Tricromo de Masson en muestras jóvenes



# Figura 12. La deleción de FOXO1 en fibroblastos altera negativamente el depósito de colágeno en heridas orales.

Heridas orales al séptimo día de reparación en el modelo de deleción de FOXO1 en fibroblastos. (**A**, **B**) Imágenes representativas de tinción hematoxilina-eosina de las heridas orales en ratones con la deleción de FOXO1 en fibroblastos (Joven Cre+) y su control (Joven Cre-). Las flechas negras indican bordes de la herida en base al tamaño inicial de 1mm. Barra representa 500µm. Se identifica la zona de tejido epitelial (TE) con \* y al tejido conectivo (TC) con \*\*; hueso palatino (HP) (**C**) Imágenes representativas de tinción de Tricromo de Masson de las heridas orales al séptimo día de reparación gingival. Barra representa 500µm. (**D**) Porcentaje de formación de colágeno respecto al total de área de tejido conectivo. Medición en base a la tinción de Tricromo de Masson al séptimo día. J-Cre- corresponde a Joven Cre-; J-Cre+ corresponde a Joven Cre+.Datos expresados como promedio  $\pm$  DS (n=6). Se aplicó la prueba t de Student para muestras no pareadas; significancia estadística p<0.05; ns= no significativo.

Los análisis histológicos de las muestran teñidas con H&E confirman una epitelización completa de la herida al día 7 tanto en los ratones con la deleción de FOXO1 como en el grupo control (**Figura 12A-B**). Al examinar el depósito de colágeno en la zona de la herida al día 7 mediante el análisis de la tinción de Tricromo de Masson (**Figura 12C**), se observó una disminución significativa del área de colágeno presente respecto al área total del tejido

conectivo en los ratones con la deleción de FOXO1 (**Figura 12D**). Por lo tanto, la deleción de FOXO1 en fibroblastos no altero el cierre de la herida en términos de epitelización al tiempo analizado, pero si redujo la capacidad de los fibroblastos para depositar colágeno en el compartimiento del tejido conectivo.

### 5.8 Estandarización de toma de muestras para citometría de flujo y sorting



**Figura 13. Estandarización de herida en mucosa oral y titulación de anticuerpos para FACS.** (A) Localización de herida palatina usando referencias anatómicas como el primer molar y 3<sup>ra</sup> y 4<sup>ta</sup> arruga palatina. (B) Imagen de referencia de toma de biopsia al término del experimento para su procesamiento al día 7. (C) Estandarización de la estrategia de separación celular por citometría de flujo y titulación de anticuerpos (n=6). Se utilizó DAPI como marcador de viabilidad celular; CD45: células inmunes; Cocktail de linaje (Lin): CD31 (células endoteliales), Ter-119 (células eritroides) y Epcam (células epiteliales).

Previo a la realización de la secuenciación de célula única se realizaron estandarizaciones para determinar la mejor ubicación de la herida, el número de heridas a combinar y la titulación de los anticuerpos para su separación por FACS. Se determinó la ubicación de la herida entre la 3<sup>ra</sup> y 4<sup>ta</sup> arruga palatina y se utilizó como referencia la cúspide mesial del primer molar (**Figura 13A-B**). En esta ubicación encontramos hueso palatino subyacente que permite una correcta creación de la herida y posterior toma de muestra.

Posteriormente, se realizaron múltiples pruebas para determinar el número ideal de muestras a combinar para obtener suficientes células para secuenciar. Se determinó un mínimo de 6 muestras (en ratones jóvenes) para obtener al menos 20.000 células viables. Del mismo modo se realizó la titulación de los anticuerpos hasta obtener una adecuada separación entre las poblaciones como se muestra en la **Figura 13C**. Así, se estableció la concentración de cada anticuerpo como se indica en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Anticuerpos titulados para FACS				
Anticuerpo	Blanco	Fluoróforo	Concentración (µg)	
CD45	Leucocitos	FITC	1 μl (0.5 μg)	
CD31	Células endoteliales	APC	1.5 μl (0.25 μg)	
Ter-119	Células eritrocíticas	APC	5 μl (1 μg)	
Epcam	Células epiteliales	APC	1.5 μl (0.25 μg)	
DAPI	viabilidad		1 μl (0.2 μg/ml)	



Figura 14. Enriquecimiento de muestras para secuenciación de célula única mediante FACS.

(A) Ejemplo de estrategia de separación celular por citometría de flujo con anticuerpos titulados en 8 muestras combinadas. Se utilizó DAPI para excluir células muertas; CD45-FITC; Linaje-APC que incluyó CD31,Ter-119 y Epcam. (B) Imagen representativas de células vivas Lin-CD45- (células estromales) y Lin-CD45+ separadas por FACS y cultivadas por 24h en placas de cultivo tratadas con colágeno tipo I. (C) Resultado de separación celular en ratones Col1a2-cre<sup>-/-</sup>/ERT;Foxo1 (Cre-). (D) Resultado de separación celular en ratones Col1a2-cre<sup>+/-</sup>/ERT;Foxo1 (Cre+).

Debido a que nuestro modelo de envejecimiento podría requerir un mayor número de muestras combinadas para alcanzar la cantidad de células blanco, realizamos una prueba con 8 muestras en ratones jóvenes y recuperamos las poblaciones de posibles fibroblastos y leucocitos para cultivarlas por 24h en placas tratadas con colágeno (**Figura 14A**). En la **Figura 14B** se observan imágenes representativas al microscopio de fase contrastada en las cuales se aprecia la presencia de células tipo fibroblásticas proveniente de las muestras Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup>. Sin embargo, no se observó contaminación de células tipo fibroblastos en las muestras provenientes del grupo Lin<sup>-</sup> CD45<sup>+</sup> (**Figura 14B**). La **Figura 14C** muestra la estrategia de selección realizada en los ensayos reales en ratones jóvenes Cre negativo y Cre positivo (**Figura 14D**).

## 5.9 Estrategia de análisis de secuenciación de célula única y métricas de calidad en muestras provenientes de ratones jóvenes



#### Figura 15. Diagrama de flujo de análisis de muestras secuenciadas.

El procesamiento de las muestras secuenciadas incluye la combinación de las muestras, la selección de las muestras de alta calidad en base a parámetros de contenido mitocondrial, número de genes por célula y

número de identificadores por célula. Se realizó el protocolo descrito por Seurat de integración, reducción de dimensionalidad (PCA) y clústerización. Adicionalmente, se realizó una clústerización específica para células mesenquimales. Se usó la anotación manual de clústeres y se realizó la expresión diferencial de genes (DEG).

Las células obtenidas por selección mediante FACS fueron entregadas al centro de genómica para su preparación y secuenciación. Al término de la secuenciación, el controlador CellRanger generó una matriz con las secuencias alineadas y las lecturas asignadas a las regiones específicas del genoma de referencia (ratón). La **Figura 15** muestra la secuencia de pasos realizadas para el análisis de las matrices. Mediante los distintos tutoriales provistos por el paquete Seurat en lenguaje R de programación, se realizaron los análisis de calidad de las muestras, reducción de la dimensionalidad y expresiones diferencial de genes.



**Figura 16.** Análisis de calidad e integración de las muestras secuenciadas de ratones jóvenes. Evaluación de parámetros de calidad de la muestra secuenciada. nFeatures\_RNA: número de genes detectados por célula; nCount\_RNA: UMIs detectados por célula; percent.mt: porcentaje de contenido mitocondial. (A-B) Gráficos de violín indicando tres métricas de calidad de las muestras Joven Cre- (A) y Joven Cre+ (B) sin filtrar. (C) Muestras Joven Cre- y Cre+ combinadas y filtradas. (D) Muestras combinadas, filtradas e integradas. Gráfico de los dos primeros componentes principales (PC\_1, PC\_2).

Las muestras fueron secuenciadas hasta alcanzar una saturación de entre el 74-88% y un número estimado de células fue de 2.518 y 2.322 en las muestras Cre- y Cre+, respectivamente. La **Figura 16A-B** nos muestra los datos crudos de las muestras. La mediana de genes detectados por célula fue de 716 en ratones Cre-, mientras que en los Cre+ fue de 838. Se aplicó un filtro para eliminar las células con alto porcentaje de contenido mitocondrial y alto número de genes por célula utilizando como punto de corte en base a 3 desviaciones de la mediana absoluta. La aplicación del filtro permitió obtener métricas comparables entre las muetras (**Figura 16C**). La integración de la muestra permite agrupar de mejor manera las poblaciones. En la **Figura 16D** se observa las muestras integradas en un gráfico de reducción de dimensionalidad en base a componentes principales, donde se observa la sobreposición de las muestras.



# 5.10 Atlas de células mesenquimales e inmunes en heridas orales en ratones jóvenes

## Figura 17. Atlas de célula única de heridas orales al séptimo día de reparación en ratones jóvenes.

(A) Visualización de clústerización no supervisada mediante Uniform manifold approximation and projection (UMAP) de 4.427 células provenientes de mucosa oral al séptimo día de reparación (n=8-9 heridas por condición). Resolución (r)=0.3. La tabla muestra los genes altamente expresados que definen cada clúster. (B) UMAP separado por condición experimental. (C) Gráfico muestra la cuantificación relativa de células en cada clúster por condición experimental expresado como porcentaje. Y-Cre- corresponde a Joven Cre+.

Luego de realizar el control de calidad e integración de las muestras combinadas, se obtuvo un total de 4.427 células (Cre-: 2320; Cre+: 2107) las cuales se utilizaron para los siguientes análisis. La clústerización no supervisada (UMAP) identificó 9 clústeres

distintos, incluyendo linajes mesenquimales y leucocíticos (**Figura 17A**). En la **Figura 17B** se observa la distribución de cada clúster en las muestras Cre- y Cre +. La cuantificación relativa de células por clúster identificó el incremento del Cluster 2 en las muestras con la deleción de FOXO1 (**Figura 17C**).

## 5.11 Análisis de genes blanco de FOXO1 asociados a ciclo celular y stress oxidativo





(A) Gráfico de violín representando los niveles de expresión de FOXO1 en cada uno de los clústeres por condición experimental. (B) Gráfico de violín representando los niveles de expresión de colágeno tipo 1 cadena  $\alpha$ 2 en cada uno de los clústeres por condición experimental. (C) Gráfico de violín representando los niveles de expresión de p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A: Cdkn1a) en cada uno de los clústeres por condición experimental (D) Gráfico de violín representando los niveles de expresión de múltiples genes asociados a control Redox: superóxido dismutasa 2 (Sod2); Catalasa (Cat); Glutatión peroxidasa 4 (Gpx4).

La **Figura 18** muestra la distribución de la expresión de FOXO1 y algunos genes blanco de este factor de transcripción. La secuenciación de célula única no fue capaz de detectar gran cantidad de células expresando FOXO1, independientemente del clúster o condición en estudio (**Figura 18A**). Sin embargo, la deleción de FOXO1 induce una disminución del gen *Col1a2* en clústeres 0 y 2 (**Figura 18B**). Además, se observa una reducción en los niveles de expresión de *p21* en los clústeres 0 y 1 (**Figura 18C**). Del mismo modo, se observa una reducción de *SOD2*, *Cat* y *Gpx4* en clúster 0. Por el contrario, la deleción de FOXO1 induce un incremento de *SOD2* y *Gpx4* en clúster 2 (**Figura 18D**).

#### 5.12 Descripción del transcriptoma del cluster 2 en ratones jóvenes

El clúster 2 se ubica distante a los clústeres mesenquimales e inmunes (**Figura 19A**) y se expresa mayoritariamente en el grupo joven Cre+ (**Figura 15B**). Por ello, se realizó un análisis para caracterizar la población que lo conforma. Así, se observó una expresión significativa de CD63 y CD81, marcadores que también son expresados por clústeres mesenquimales y no mesenquimales. Cabe destacar la presencia de células epiteliales Krt14+ y, posiblemente, células madre mesenquimales Thy1+ (**Figura 19B**). Un alto porcentaje de las células del clúster 2 expresan el marcador de activación de miofibroblastos: *Acta2*. Además, se observa que al menos un 30% de la población expresa algún tipo de colágeno (**Figura 19C**). Por último, entre los genes mayormente expresados destaca la expresión de la inmunoglobulina Igkc, que también es expresada por el clúster 6 de origen inmune (**Figura 19D**).

Estos resultados sugieren que el clúster 2 tiene un origen inmune con características funcionales de células mesenquimal.



#### Figura 19. Caracterización de clúster 2 en ratones jóvenes.

(A) UMAP de clúster 2. Se realizó un análisis comparativo de los genes altamente expresados en el clúster 2 (encasillado en rojo) respecto a los demás clústeres (flechas). (B) Dotplot de expresión de genes asociados a tipos celulares presentes en el clúster 2. (C) Dotplot de expresión de genes asociados a matriz extracelular ó activación de fibroblastos. (D) Dotplot de expresión de genes altamente expresado ordenados por el valor de veces de cambio (avg\_Log2FC). Avg\_Log2FC: promedio de veces de cambio logarítmica en base 2; FC: veces de cambio; %Cre: porcentaje de células que expresan el gen por condición; p\_val\_adj: valor p ajustado < 0.05, \*significancia estadística.





Figura 20. Estrategia de selección de células mesenquimales en ratones jóvenes.

(A) Gráfico de puntos que muestra los dos primeros genes, ordenados por mayor valor de veces de cambio, por clúster (eje X). Cada clúster está representado en el eje Y. El tamaño de la esfera es proporcional al porcentaje de células que expresan el gen en ese clúster. La intensidad del color es proporcional al promedio de expresión en el clúster. (B) UMAP de los genes Col1a2 y Ptprc (CD45). La intensidad del color es proporcional al promedio de expresión de expresión. (C)Visualización de clústeres seleccionados para sub-clusterizar.
(D) visualización de Elbow plot para determinar número de componentes principales. (E) UMAP de 3.478 células provenientes de clústeres estromales al séptimo día de reparación (n=8-9 heridas por condición). Resolución (r)=0.5.

Se utilizó el análisis de expresión diferencial para obtener los genes altamente expresados en cada clúster y se graficaron 2 genes por clúster en la **Figura 20A**. Se identificaron clústeres con alto contenido de colágeno: Clúster 0,2,3 y 4. Por otra parte, se identificaron clústeres con marcadores clásicos de monocitos/macrófagos: Clúster 1 y 8. El clúster 5

presenta alta expresión de proteína proteolípido 1 y nestina. Además, se identificó el clúster 6 con expresión de complejos de histocompabilidad clase II y CD52. Una población de linfocitos se asoció al clúster 7 debido a la expresión de *Cd3e* y *Ctla4*. Se graficó la expresión de Col1a2 y Ptprc en la **Figura 20B** para una rápida visualización de la ubicación de los clústeres. Se seleccionaron solo los clústeres 0,2,3 y 4 para los subsecuentes análisis (**Figura 20C**). En **la Figura 20D** se determinó el número de componentes principales para reducir la dimensionalidad y crear un subclusterización de células mesenquimales (**Figura 20E**). Se obtuvo un total de 3,478 células.

El UMAP representa los 9 clústeres presentes en el subclúster mesenquimal separados por condición experimental (**Figura 21A**). La deleción de FOXO1 indujo una disminución en la cuantificación relativa de células en los clústeres 0,1,3,4 y 7 (**Figura 21B**). A partir del análisis de expresión diferencial se graficaron 3 genes altamente expresados por clúster en la **Figura 21C**. Se identificó al clúster 6 como un contaminante correspondiente al linaje de células epiteliales. Con el fin de identificar el o los clústeres que contengan una población de miofibroblastos, se realizó un heatmap para tres genes marcadores de miofibroblastos: *Acta2*, *Myhl11* y *Tagln*. La **Figura 21D** muestra una mayor distribución de los miofibroblastos en los clústeres 3 y 4. Además observamos una disminución de *Acta2* (no significativa) en la mayoría de los clústeres producto de la deleción de FOXO1 (**Figura 21F-G**). El número de células fue insuficiente para realizar las comparaciones en los clústeres 2, 6 y 8. Y el clúster 4 no presentó diferencias (>0.1 Log2FC) producto de la deleción de FOXO1 respecto al grupo control.



#### Figura 21. Caracterización de sub-clúster mesenquimal e identificación de miofibroblastos.

(A) UMAP separado por condición experimental. (B) Gráfico muestra la cuantificación relativa de células en cada clúster por condición experimental expresado como porcentaje. Y-Cre- corresponde a Joven Cre-; Y-Cre+ corresponde a Joven Cre+. (C) Gráfico de puntos que muestra los tres primeros genes, ordenados por mayor valor de veces de cambio (FC\_Log2), por clúster (eje X). Cada clúster está representado en el eje Y. El tamaño de la esfera es proporcional al porcentaje de células que expresan el gen en ese clúster. La intensidad del color es proporcional al promedio de expresión en el clúster. (D) Heatmap de expresión de los genes *Acta2*, *Myhl11* y *Tagln* a través de todos clústeres mesenquimales. Se muestran 100 células por clúster en las columnas y los genes en las filas. La barra de color muestra los genes regulados negativamente: morado; no expresados: negro; regulados positivamente: amarillo. (F) Gráfico de violín de Acta2. (G) Tabla de expresión de *Acta2* dividida por condición experimental en cada clúster. Avg\_Log2FC: promedio de

veces de cambio logarítmica en base 2; FC: veces de cambio; %Cre: porcentaje de células que expresan el gen por condición;adj\_p: valor p ajustado. \*0.05.

### 5.14 Caracterización del subcluster mesenquimal 2

Cabe destacar el incremento de la población mesenquimal del clúster 2 en el grupo que presenta la deleción de FOXO1 (Cre+) (**Figura 21A**). Se realizó un análisis comparativo de los genes altamente expresados que definen el clúster 2 respecto a los demás clústeres mesenquimales (**Figura 22A**). Un 63.9% de las células que componen el clúster 2 expresan el marcador de células inmunes Ptprc (CD45). Adicionalmente, la **Figura 22B** muestra una alta expresión de marcadores de monocito/macrófagos (CD14, Lyz2, C1qb) y células B (CD79a). Casi la totalidad de la población expresa algún tipo de matriz extracelular, destacando la expresión significativa de *Col5a1* y *Fn1* respecto a los demás clústeres altos niveles de genes que codifican para la citoquina proinflamatoria IL-1β y la proteasa catepsina S (*Ctss*).

Por lo tanto, FOXO1 controla la expresión de una población celular con características inmune-mesenquimales de perfil proinflamatorio, compatible con el fenotipo celular de pericitos.







gene	avg_lugzrc	FC	10 III SCIUSIEI Z	70 III all others	p_vai_auj
Lyz2	1.756	3.378	0.598	0.293	7.61E-12
Cd74	1.354	2.557	0.604	0.228	3.60E-18
Cd14	1.236	2.356	0.309	0.269	7.89E-52
C1qb	1.088	2.126	0.758	0.079	2.28E-164
Cd52	1.003	2.004	0.228	0.113	3.37E-135
Cd79a	0.519	1.433	0.215	0.077	3.04E-169
Ptprc	0.445	1.361	0.639	0.067	2.77E-49
Ly6a	0.412	1.331	0.715	0.28	7.06E-32



(B)



gene	avg_log2FC	FC	% in sCluster2	% in all others	p_val_adj
Timp1	0.531	1.445	0.823	0.626	6.77E-23
Col5a1	0.531	1.445	0.998	0.837	8.12E-24
Fn1	0.555	1.469	1	0.886	9.35E-35
Col12a1	0.428	1.346	0.994	0.793	3.32E-27
Col6a3	0.369	1.291	0.998	0.857	7.08E-14
Col6a2	0.320	1.248	0.995	0.833	7.66E-12
Col5a2	0.320	1.248	1	0.934	0.00012434
Col11a1	0.315	1.244	0.997	0.767	5.25E-05
Col5a3	0.299	1.231	0.796	0.575	3.38E-05

(C)

gene	avg_log2FC	FC	% in sCluster2	% in all others	p_val_adj
ll1b	1.561	2.950	0.409	0.172	2.12E-10
Ctss	1.442	2.717	0.787	0.111	8.13E-180
H2-Ab1	1.283	2.433	0.301	0.184	6.71E-61
Ccl3	1.268	2.408	0.234	0.03	7.60E-151
Igkc	0.844	1.795	0.594	0.08	5.14E-22

#### Figura 22. Caracterización de subclúster 2 mesenquimal.

(A) UMAP de clústeres mesenquimales. Análisis comparativo de los genes altamente expresados en el subclúster 2 (encasillado en rojo) respecto a los demás clústeres. (B) Dotplot de expresión de genes asociados a tipos celulares presentes en el subclúster 2. (C) Dotplot de expresión de genes asociados a matriz extracelular en el subclúster 2. (D) Dotplot de expresión de genes altamente expresado ordenados por el valor de veces de cambio. avg\_Log2FC: promedio de veces de cambio logarítmica en base 2; FC: veces de cambio; %: porcentaje de células que expresan el gen; p\_val\_adj: valor p ajustado, significancia estadística: p\_val\_adj < 0.05.

47

### 5.15 Efectos de la deleción de FOXO1 sobre la MEC en miofibroblastos

La deleción de FOXO1 en el subclúster 3 redujo significativamente los niveles de *Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1*, *Col5a1*, *Col5a2* y *Postn* (**Figura 23A-C**). Mientras que en el subclúster 4 se identificaron menor cantidad de genes regulados negativamente, destacando la reducción significativa de vimentina (**Figura 23D-F**).

Estos resultados nos indican que la deleción de FOXO1 en ratones jóvenes reduce los niveles de expresión de genes asociados a la MEC. Este efecto es clúster dependiente.





(A) Gráfico de violín para los genes de colágeno tipo 5 cadena  $\alpha 2$  (*Col5a2*) y (B) Periostina (*Postn*) específicamente en subclúster 3. (C) Tabla resumen de expresión de genes asociados a la matriz extracelular que varían significativamente en subclúster 3. (D) Gráfico de violín para Vimentina (*Vim*). (E) Gráfico de violín para colágeno tipo 3 cadena alpha1 (*Col3a1*). (F) Tabla resumen de expresión diferencial de genes asociados a la matrix extracelular en subclúster 4. avg\_Log2FC: promedio de veces de cambio logarítmica en base 2; FC: veces de cambio; %Cre: porcentaje de células que expresan el gen por condición; adj\_p: valor p ajustado. \*0.05. Y-Cre- corresponde a Joven Cre-; Y-Cre+ corresponde a Joven Cre+. Para todos los

análisis estadísticos se utilizó la prueba Wilcoxon rank sum y corrección de Bonferroni. Significancia estadística:  $p_val_adj < 0.05$ .

# 5.16 Atlas de células mesenquimales e inmunes en heridas orales de ratones envejecidos

Para analizar el efecto del envejecimiento por sí solo es que comparamos los datos de secuenciación provenientes de ratones jóvenes y envejecidos del genotipo Cre-. La **Figura 24A** muestra dos grandes conglomerados de clústeres que corresponden mayoritariamente a células mesenquimales (0,3,4,5,7,8 y 11) e inmunes (1,2,6,9 y 10). En menor proporción se detectó células endoteliales en el clúster 13 y otros tipos celulares menos definidos en el clúster 12. En los ratones envejecidos se observa una diminución de los clústeres mesenquimales 0, 3 y 4. Sin embargo, los clústeres 5, 7, 8 y 11 aumentan en las muestras provenientes de ratones envejecidos (**Figura 24B**). Respecto al conglomerado de clústeres inmunes, destaca el aumento de poblaciones monocito/macrófagos (clúster 1 y 2) en ratones envejecidos. Se seleccionaron los clústeres mesenquimales (enmarcados en rojo) en base a la **Figura 24C** para realizar la re-clusterización mesenquimal.



(B)

# Figura 24. Atlas de célula única de heridas orales al séptimo día de reparación en ratones jóvenes y envejecidos.

(A) UMAP de muestras del genotipo Cre- separado por edad. (B) Gráfico muestra la cuantificación relativa de células en cada clúster expresado como porcentaje según edad. (C) Dotplot de genes asociados a células mesenquimales (*Pdgfra, Col1a2, Acta2, Lum y Dcn*), inmune (*Ptprc, CD14, CD68, CD3g, CD52, CD79a*), endoteliales (*Pecam, Ramp2*), epiteliales (*Krt14, Krt15*), fibras nerviosas (*Mbp, Piezo2*) y linaje embrionario asociado a fibroblastos: *Engrailed 1 (En1)*. El tamaño de la esfera es proporcional al porcentaje de células que expresan el gen en ese clúster. La intensidad del color es proporcional al promedio de expresión en el clúster. avg\_Log2FC: promedio de veces de cambio logarítmica en base 2; FC: veces de cambio; %Cre: porcentaje de células que expresan el gen por condición; adj\_p: valor p ajustado. \*0.05.

Posterior a la re-clusterización mesenquimal se identificaron 14 clústeres, de los cuales sólo 9 corresponden a fibroblastos o miofibroblastos (0-8) (**Figura 25A**). Los dos clústeres más abundantes tienden a disminuir su porcentaje celular con el envejecimiento. Sin embargo, los clústeres 2, 3, 5, 6, 7 y 8 tienden a aumentar. Cabe destacar la persistencia de los miofibroblastos en ratones envejecidos al séptimo día de la reparación (**Figura 25B-C**).



Figura 25. Atlas de célula única del subclúster mesenquimal al séptimo día de reparación en ratones jóvenes y envejecidos.

(A) UMAP de células mesenquimales separado por edad. (B) Gráfico muestra la cuantificación relativa de células en cada clúster expresado como porcentaje según edad. (C) La tabla muestra cuatro genes altamente expresados que definen cada clúster.

Como se muestra en la **Figura 26A**, en el clúster 0 se observó una disminución significativa de *Col4a2* y *Col18a1* en ratones envejecidos. Mientras que en el clúster 1, destaca la disminución del colágeno estructural *Col1a1* y se observó una reducción de otras proteínas de matriz como tenascina-N y, organizadoras de actina, como la transgelina (**Figura 26B**). Por otra parte, en el clúster 2 se detectó una disminución en colágenos asociados a interacciones proteína-proteína como *Col7a1* y *Col6a2* y del inhibidor de metaloproteinasas *Timp3* en las muestras provenientes de ratones envejecidos (**Figura 26C**).

Por lo tanto, estos datos nos sugieren que el envejecimiento altera la proporción de las poblaciones mesenquimales más abundantes y de miofibroblastos. Además, se ve disminuido la transcripción de múltiples colágenos estructurales con el envejecimiento en los clústeres más abundantes.



Figura 26. Expresión diferencial de genes en subclústeres mesenquimales más abundantes presentes en muestras de ratones jóvenes y envejecidos del genotipo Cre-.

Gráfico de violín de proteínas de matriz extracelular diferencialmente expresadas en el clúster 0 (**A**), en clúster 1 (**B**) y clúster 2 (**C**) entre ratones jóvenes y envejecidos. Cada tabla especifica el promedio de veces de cambio logarítmica en base 2 (avg\_Log2FC); veces de cambio (FC); porcentaje de células que expresan en ratones jóvenes ó envejecidos (% Young/Old Cre-); valor p ajustado (p\_val\_adj). Para todos los análisis estadísticos se utilizó la prueba Wilcoxon rank sum y corrección de Bonferroni. Significancia estadística:  $p_val_adj < 0.05$ .

(B)

(C)

# 5.17 Expresión de FOXO1 en modelo in vitro de envejecimiento en fibroblastos gingivales

La escasa evidencia disponible respecto a la expresión de FOXO1 durante el envejecimiento nos motivó a realizar un ensayo exploratorio en fibroblastos gingivales humanos. La **Figura 27A** muestra un incremento gradual en los niveles proteicos de FOXO1 a medida que aumentan los pasajes de cultivo de fibroblastos. Además, se observa en la **Figura 27B** una mayor expresión nuclear y citoplasmáticade FOXO1 en fibroblastos en pasaje 46 (P46) respecto a un pasaje temprano (P4). Estos resultados sugieren que podría existir una fluctuación en la expresión de FOXO1 en fibroblastos cultivados por largos periodos de tiempo.

(A)





#### Figura 27. Expresión de FOXO1 en modelo de envejecimiento in vitro.

(A) Imagen de ensayo de Western blot para FOXO1 (total) a distintos pasajes (4, 18 y 46); n=1. (B) Imágenes representativas de la expresión de FOXO1 (total) por inmunofluorescencia en pasaje 4 y 46; n=1. FOXO1 se muestra en verde, actina en rojo y los núcleos en azul (DAPI).

# 5.18 Análisis histológico de H&E y Tricromo de Masson en ratones envejecidos

A partir de las muestras provenientes de ratones envejecidos, se analizaron los cortes histológicos de las heridas al séptimo día de reparación. Los análisis H&E de las heridas en ratones envejecidos con o sin la deleción de FOXO1 muestran una re-epiteliarización completa de la herida al día 7 (**Figura 28A-B**). En cuanto al depósito de colágeno en el área del tejido conectivo, no se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones (**Figura 28C-D**).



Figura 28. Análisis histológico de la deleción de FOXO1 en fibroblastos en heridas orales de ratones viejos.

Heridas orales al séptimo día de reparación en el modelo de deleción de FOXO1 en fibroblastos. (A, B) Imágenes representativas de tinción hematoxilina-eosina de las heridas orales en ratones con la deleción de FOXO1 en fibroblastos (Viejo Cre+) y su control (Viejo Cre-). Las flechas negras indican bordes de la herida en base al tamaño inicial de 1mm. Se identifica la zona de tejido epitelial (TE) con \* y al tejido conectivo (TC) con \*\*; hueso palatino (HP). Barra representa 500 $\mu$ m. (C) Imágenes representativas de tinción de Tricromo de Masson de las heridas orales al séptimo día de reparación gingival. Barra representa

 $\mu$ m. (**D**) Porcentaje de formación de colágeno respecto al total de área de tejido conectivo. Medición en base a la tinción de Tricromo de Masson al séptimo día. O-Cre- corresponde a viejo Cre-; O-Cre+ corresponde a viejo Cre+. Datos expresados como promedio  $\pm$  DS (n=4). Se aplicó la prueba t de Student para muestras no pareadas; significancia estadística p<0.05; ns= no significativo.







Evaluación de parámetros de calidad de las muestras combinadas. nFeatures\_RNA: número de genes detectados por célula; nCount\_RNA: UMIs detectados por célula; percent.mt: porcentaje de contenido mitocondial. (A) Gráficos de violín indicando tres métricas de calidad de las muestras Viejo Cre- y Viejo Cre+ sin filtrar. (B) Gráficos de violín de las muestras filtradas. (C) Visualización de clústerización no supervisada mediante UMAP de 12.616 células provenientes de mucosa oral al séptimo día de reparación (n=9-10 heridas por condición). Resolución (r)=0.3. (D) UMAP separado por condición experimental.

La secuenciación de los ratones envejecidos arrojó un total de 12.616 células (**Figura 29C**) y una mediana de 2.146 y 2.242 genes por célula en la condición Cre- y Cre+, respectivamente. Sin embargo, un gran número de células presentaron altos niveles de porcentaje de genes mitocondriales (**Figura 29A**). La aplicación del filtro fue capaz de mejorar las métricas de calidad de las muestras envejecidas (**Figura 29B**). La clústerización no supervisada y graficada como UMAP, identificó 15 clústeres distintos. Los posibles linajes celulares en base a anotación manual se describen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Anotación Manual de clústeres en ratones envejecidos				
Nº identificador de Clúster	Tipo celular	Expresión de genes		
0	Fibroblasto 1	Postn, Col1a1, Col1a2,Col3a1		
1	Monocito	Hdc, CD14,Ccrl2,Trem1		
2	Fibroblasto 2	Rgs5,Tagln,Spracl1,Acta2		
3	Macrófago 1	Ccl9,Ccl41,Msa4a6c,Lyz2		
4	Macrófago 2	Apoel, Clqa,Clqb,Ms4a7		
5	Fibroblasto 3	Wif1,Col12a11,Rorb,Plpp3		
6	Fibroblasto 4	Stmn1,Birc5,Top2a,Tubb51		
7	Inmune	H2-Aa,H2-Ab1,Cd74,Ccr7		
8	Linfocito T	Il17a,Cd3g, Trdc,Cxcr6		
9	Fibroblasto 5	C4b,IL33,CD34,Col14a1		
10	Fibroblasto 6	Rps26,Rpl41,Gnas,Lgals1		
11	Sistema nervioso	Mpz, Plp1, Kcna1,Ank3		
12	Epitelial	Krt14, Lgals7, Krt5,Krt13		
13	Mieloide	Ocstamp, Coq8a, Matk, Rufy4		
14	Fibroblasto 7	Adamts18,Ostn,Tnn,Col16a1		

Al analizar cada condición por separado mediante un gráfico pareado de UMAP (**Figura 29D**) no se observó la aparición o eliminación de clústeres producto de la deleción de FOXO1.
# 5.20 Estrategia de selección de células mesenquimales para subclusterización en ratones envejecidos

Para identificar los clústeres con alto contenido de genes asociado a linaje mesenquimal, se probó la expresión de múltiples genes asociado a fibroblastos y miofibroblastos en la **Figura 30A**. Esto permitió agrupar los clústeres  $(0,2,5,6,9,10 \text{ y } 14 \text{ para formar un subclúster mesenquimal. Además, confirmamos que no existiera expresión de marcadores asociados a células inmunes en estos clústeres ($ **Figura 30B**) y graficamos mediante un heatmap la expresión de múltiples tipos de colágeno y marcadores de miofibroblastos en cien células por clúster para confirmar la selección (**Figura 30C** $). Al evaluar si la deleción de FOXO1 tuvo efecto sobre la expresión del gen codificante para <math>\alpha$ -SMA (Acta2), se observó una disminución (no significativa) entre 1-1.3 veces de cambio en la expresión de *Acta2*. Sin embargo, no todos los clústeres mesenquimales fueron afectados ya que se observó un aumento *Acta2* (no significativa) en los clústeres 6-7 y 12.





Visualización de los genes *Ptprc* (CD45), *CD14*, *CD68*, *CD3e* en un espacio de baja dimensionalidad. La intensidad del color es proporcional al promedio de expresión. (C) Heatmap de expresión de genes asociados a clústeres mesenquimales. Se muestran 100 células por clúster en las columnas y los genes en las filas. La barra de color muestra los genes regulados negativamente: morado; no expresados: negro; regulados positivamente: amarillo. (D) Gráfico de violín de Acta2. (E) Tabla de expresión de Acta2 dividida por condición experimental en cada clúster. Avg\_Log2FC: promedio de veces de cambio logarítmica en base 2; FC: veces de cambio; % Cre: porcentaje de células que expresan el gen por condición; adj\_p: valor p ajustado. Significancia estadística = adj\_p <0.05.

# 5.21 Atlas de células mesenquimales provenientes de ratones envejecidos



(C)

Cluster 0							
Gene	avg_Log2FC	FC	% Cre+	% Cre-	adj_p		
Mmp3	2.230	4.69	0.326	0.21	0.020		
Mmp13	1.734	3.33	0.404	0.2	4.14E-12		
Timp3	0.891	1.85	0.61	0.334	5.86E-19		
Col4a1	0.809	1.75	0.829	0.768	1.54E-09		
Col6a3	0.749	1.68	0.972	0.994	2.45E-16		
Col18a1	0.724	1.65	0.837	0.699	8.22E-21		
Col4a2	0.684	1.61	0.758	0.705	2.74E-07		

#### Figura 31. Caracterización de sub-clústeres mesenquimal en ratones envejecidos.

(A) UMAP de 6.135 células provenientes de clústeres estromales al séptimo día de reparación (n=9-10 heridas por condición). Resolución (r)=0.5. (B) Gráficos de violín de genes regulados positivamente ante la deleción de FOXO1 en subclúster mesenquimal 0. Para todos los análisis estadísticos se utilizó la prueba Wilcoxon rank sum y corrección de Bonferroni. (\*) valor p ajustado (adj\_p) < 0.05. (C) Tabla resumen de expresión diferencial de genes asociados a la matrix extracelular en clúster 0. avg\_Log2FC: promedio de veces de cambio logarítmica en base 2; FC: veces de cambio; %Cre: porcentaje de células que expresan el gen por condición;adj\_p: valor p ajustado. Significancia estadística = adj\_p <0.05.

La clústerización no supervisada mediante UMAP del subclúster mesenquimal identificó 16 clústeres a partir de 6.135 células (**Figura 31A**). Se realizó el análisis de los genes alterados producto de la deleción de FOXO1 en los primeros tres clústeres más abundantes (0,1,2). La **Figura 31B** muestra un aumento 4.6 veces mayor de la metaloproteinasa (MMP)-3 y 3.3 veces para MMP-13 en fibroblastos con la deleción de FOXO1 en el clúster mesenquimal 0. Además, la deleción de FOXO1 indujo un aumento significativo de colágeno asociado a la membrana basal (Colágeno tipo IV y XVIII).





#### Figura 32. Regulación de la expresión génica en subclústeres mesenquimales 1 y 2.

(A) Gráficos de violín de genes sobre-regulados ante la deleción de FOXO1 en subclúster mesenquimal 1. Tabla detalla las veces de cambio en la expresión de cada gen (B) Gráfico de puntos que muestra genes asociados a la población de miofibroblastos (eje X). Cada clúster está representado en el eje Y. El tamaño

de la esfera es proporcional al porcentaje de células que expresan el gen en ese clúster. La intensidad del color es proporcional al promedio de expresión en el clúster. Tabla contiene genes asociados a matriz extracelular con expresión diferencial en subclúster mesenquimal 2 (C) Tabla contiene genes regulados negativa y positivamente ante la deleción de FOXO1 en subclúster mesenquimal 2. Para todos los análisis estadísticos se utilizó la prueba Wilcoxon rank sum y corrección de Bonferroni. (\*) valor p ajustado (adj\_p) < 0.05.

Por otro lado, la deleción de FOXO1 en el clúster 1 mesenquimal promueve la expresión de un grupo distintos de genes respecto al clúster 0 (**Figura 32A**). En el clúster 1 se observó un aumento de genes asociados a daño en el tejido como *Lrrc15*. Cabe destacar el aumento de dos tipos de cadenas de colágeno *Col5a1* y *Col6a3* y de la integrina  $\beta$ 1.

En el clúster 2 mesenquimal se identificó una alta expresión de genes asociados a miofibroblastos (**Figura 32B**). Sin embargo, en el clúster 2 no se identificaron cambios significativos en la expresión de colágeno entre condiciones experimentales. Pero si observamos una disminución significativa de cistatina c y de la enzima lisozima-S frente a la deleción de FOXO1 (**Figura 32C**).

Estos datos nos sugieren que la función regulatoria de FOXO1 sobre genes asociados a la MEC es clúster dependiente durante el envejecimiento. Por otra parte, la deleción de FOXO1 aumenta la actividad colagenolítica en el clúster mesenquimal más abundante.

## 6. DISCUSIÓN

El estudio de los procesos biológicos de la reparación de heridas permite proponer posibles blancos terapéuticos con mira a su aplicación en el control de heridas crónicas; frecuente evolución de heridas asociadas a diabetes o envejecimiento. A raíz de lo anterior emerge el interés por identificar y describir las funciones de factores de transcripción que regulan la expresión transcripcional durante la reparación de los tejidos. En los últimos años, se han descrito nuevas funciones para el factor de transcripción FOXO1 asociadas a la diferenciación de miofibroblastos cardiacos y migración de queratinocitos dermales <sup>14,26</sup>. Aun cuando las heridas en la mucosa oral cursan bajo los principios generales de la reparación tisular, éstas presentan características propias. Por ello, intentamos explorar algunas funciones ya descritas para FOXO1, confirmar su comportamiento en fibroblastos y tejidos orales, como también proponer nuevas funciones que ayuden a definir el rol de FOXO1 durante distintas etapas de la reparación en la mucosa oral.

El trabajo fundamental realizado por Hinz et al. (2001) consideró la importancia del origen celular en la capacidad contráctil. En dos poblaciones celulares con distinto potencial contráctil (fibroblastos dermales < fibroblastos pulmonares) se observó que la estimulación con TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos dermales de rata indujo niveles cercanos a los basales de los fibroblastos pulmonares. Además, los fibroblastos dermales humanos tratados con anticuerpos neutralizantes para TGF- $\beta$ 1 redujeron sus los niveles proteicos de  $\alpha$ -SMA <sup>55</sup>. Este estudio refuerza nuestra intención de evaluar la respuesta particular de los fibroblastos de la mucosa oral.

Nuestros primeros resultados in vitro confirman un incremento de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos gingivales humanos estimulados TGF- $\beta$ 1, adquiriendo el fenotipo de miofibroblasto. El incremento de factores como TGF- $\beta$ 1 durante las primeras fases de la reparación tisular promueven la expresión de la proteína  $\alpha$ -SMA en los fibroblastos ubicados en los bordes de la herida. Así, los fibroblastos pueden adquirir un fenotipo migratorio y contráctil que les permite repoblar el tejido perdido como también contraer los bordes de la herida. La incorporación de  $\alpha$ -SMA a las fibras de stress es un punto clave para la reparación del

tejido conectivo <sup>56</sup>. Tras confirmar que los fibroblastos responden al estímulo con TGF- $\beta$ 1, se reportó que el inhibidor químico de FOXO1 (AS1842856) reduce este efecto y disminuye significativamente la expresión de  $\alpha$ -SMA. El impacto de la falta de  $\alpha$ -SMA se ha reportado en ratones knock-out para  $\alpha$ -SMA, en los cuales se observó que los fibroblastos son capaces de lograr el cierre de una herida dermal, formar fibras de estrés y adhesiones focales. Sin embargo, se detectó un enlentecimiento en el cierre de las heridas lo que demuestra la importancia de la actina de musculo liso en el proceso de reparación <sup>57</sup>.

Nuestros resultados in vivo muestran que la deleción de FOXO1 indujo una disminución de la expresión de α-SMA en algunos clústeres tanto en ratones jóvenes como envejecidos. Sin embargo, estos valores no alcanzaron significancia estadística. Esto se puede deber a un aumento compensatorio de otras proteínas de la familia FOXO como FOXO3. Se ha reportado que la inhibición química de FOXO1 promueve la expresión y localización nuclear de FOXO3 en fibroblastos cardiacos <sup>58</sup>. Sin embargo, un aumento de FOXO3 producto de la ausencia de FOXO1 reduce la expresión de α-SMA. En condiciones normales, FOXO3 restringe la sobre-expresión de α-SMA 58,59. Por lo tanto, hipotetizamos que otros factores no regulados por FOXO1 pueden estar contribuyendo a la expresión de α-SMA. En las heridas existe un aumento fisiológico de las especies reactivas de oxígeno debido a la ruptura de la red vascular. En un modelo de estrés oxidativo crónico en fibroblastos  $junD^{-/-}$  se observó que el aumento de ROS induce la diferenciación a miofibroblastos  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> in vitro. El aumento de ROS induce la producción de la quimioquina CXCL12 que puede actuar de forma paracrina sobre otros fibroblastos e inducir su diferenciación <sup>60</sup>. La utilización tópica en heridas cutáneas de un vector que expresa CXCL12 ha demostrado efectos favorables sobre la reparación de heridas, reduciendo significativamente los tiempos de cierre de la herida<sup>61</sup>. Lo anterior puede explicar parcialmente la expresión de  $\alpha$ -SMA en el grupo knock-out de FOXO1 y la tasa de cierre de herida similar al grupo control en los animales envejecidos.

Aunque la expresión y función de  $\alpha$ -SMA es importante para la contracción de la herida, no es el único factor por considerar en el proceso de contracción. En un modelo de fibroblastos cardiacos se evaluó el efecto de la mecano-biología de la matriz en la expresión de  $\alpha$ -SMA. Los autores de este trabajo demostraron que una matriz de colágeno flotante (baja tensión) induce una reducción en la expresión de  $\alpha$ -SMA. Por lo tanto, el grado de organización de la matriz es una señal extracelular en el proceso de contracción <sup>62</sup>. Estos datos complementan nuestros resultados, ya que los fibroblastos estimulados con el inhibidor de FOXO1 presentaron menor expresión de fibronectina y una desorganización de sus fibras.

Los miofibroblastos se encuentran activamente censando la matriz a través de las integrinas y la traducción de estas señales promueven la actividad contráctil. Se ha reportado una relación temporal y biológica entre la expresión de  $\alpha$ -SMA y la expresión de integrinas (en adhesiones focales). Los fibroblastos pueden adherirse y organizar matrices de colágeno y fibronectina a través de integrina- $\beta$ 1. Además, TGF- $\beta$ 1 induce un aumento del tamaño de las adhesiones focales durante la diferenciación a miofibroblastos <sup>63</sup>.

Nuestros resultados reportan por primera vez que FOXO1 participaría regulando la formación de clústeres de integrina- $\beta$ 1 en fibroblastos gingivales humanos. La ausencia de FOXO1 disminuyó el área de integrina- $\beta$ 1 en la membrana basal de la célula y redujo tanto los niveles de transcrito como de proteína. Estudios previos han demostrado que el reclutamiento del heterodímero  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 se asocia a una mayor fuerza de adhesión a ligandos como fibronectina, lo que le permite resistir fuerzas de magnitud fisiológicas. Los autores de este estudio también reportan la importancia de una clusterización inicial de las fibras de fibronectina para promover el reclutamiento de las integrinas  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 al sitio de adhesión <sup>64</sup>. Por lo tanto, nuestros resultados de falta de organización de fibronectina y menor clusterización de integrina- $\beta$ 1 mediada por FOXO1, se ajusta al modelo propuesto por Roca-Cusachs et al. donde la menor clusterización de integrina- $\beta$ 1 afectaría la capacidad de resistir fuerzas tensiles.

Otra posible causa de la disminución de integrinas en la membrana puede deberse a una alteración en el tráfico de estas proteínas. La integrina-β1 está sujeta a constantes ciclos de exocitosis-endocitosis. Este ciclo permite que las integrinas pueden ser internalizadas para posteriormente ser degradadas o recicladas y devueltas a la membrana. Se ha descrito que la endocitosis controlada de las integrinas facilita la migración celular, como también la organización y degradación de matrices de fibronectina. La integrina-β1 internalizada puede seguir una ruta de endocitosis dependiente de caveolina 1 (CAV-1) en miofibroblastos <sup>65,66</sup>. En particular, FOXO3 presenta sitios de unión al promotor de CAV-1 y se ha confirmado la regulación directa de la expresión de CAV-1 por FOXO3 y FOXO4 <sup>67</sup>. Además, en un modelo de cáncer de colon, se reportó la regulación transcripcional de CAV-1 por parte de FOXO1 <sup>68</sup>. Estos datos nos permiten abrir la pregunta si FOXO1 podría estar regulando mecanismos de tráfico de integrinas durante la reparación de heridas.

Un estudio reciente ha demostrado la importancia de la producción de fibronectina y la unión de integrina-fibronectina, en la contracción de matrices de colágeno. Se ha reportado que la incapacidad de producir fibronectina peri-celular disminuye la capacidad contráctil de los fibroblastos, a pesar de expresar integrinas que se puedan unir a otras proteínas de la MEC. La producción de fibronectina y el anclaje de los fibroblastos mediante integrinas como  $\alpha 5\beta 1$ (integrina de unión a fibronectina) promueve una eficiente contracción de la matriz de colágeno y *spreading* celular <sup>69</sup>. Otros estudios han reportado que la ausencia de integrina- $\beta 1$  enlentece la reparación de heridas cutáneas. Además, se ha demostrado una disminución en la capacidad de adhesión y *spreading* celular sobre matrices fibronectina. Por lo tanto, la falta de integrina- $\beta 1$  indujo finalmente una menor capacidad para contraer matrices de colágeno. Los efectos generados por la ausencia de integrina- $\beta 1$  y la vía de señalización de TGF- $\beta 1$  <sup>33</sup>. Nuestros resultados proponen una modulación de los procesos de adhesión, *spreading* y diferenciación celular a través de un eje TGF- $\beta 1$ -FOXO1.

El estudio de la familia de factores de transcripción FOXO es de alto interés biológico debido a la gran variedad de funciones celulares que regula y que se ven alterados en enfermedades crónicas tan frecuentes como la diabetes (Vivar *et al.*, 2021). En particular, la disrupción de la homeostasis a causa de una herida es un inductor de FOXO1. A su vez FOXO1 promueve la expresión de TGF-β1, por lo que se produce una retro alimentación durante el proceso de reparación tisular <sup>27</sup>. A su vez FOXO1 modula genes asociados al control del ciclo celular, fibrosis y diferenciación celular <sup>23,71,73</sup>. En los últimos años se ha presentado evidencia que demuestra la participación de FOXO1 en múltiples etapas de la reparación de heridas. Entre las familias de genes expresados positivamente en las heridas destacan las metaloproteinasas, inhibidores de proteasas, interleuquinas y anti-oxidantes. En particular, SOD2 y GPX3 son dos clásicos genes blanco de FOXO1 <sup>28</sup>. Nuestros datos de secuenciación de célula única en ratones jóvenes muestran que la ausencia de FOXO1 induce la disminución de los genes que codifican para *SOD2* y *GPX4*.

Por otra parte, el ensayo de herida in vitro nos sugiere que FOXO1 estaría regulando procesos de adhesión y migración. Se ha destacado la importancia de la expresión de integrinas en la direccionalidad de la migración sobre matrices de fibronectina <sup>74</sup>. Fibroblastos provenientes de embriones de rata sembrados sobre una matriz de fibronectina son capaces de migrar manteniendo una direccionalidad durante 16h. Los autores de este estudio sugieren que la direccionalidad es parcialmente atribuible a la función de las integrinas  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 sobre la matriz de fibronectina. Estos datos podrían explicar nuestros resultados debido a que el inhibidor de FOXO1 reduce la producción de fibronectina, altera su organización y reduce la expresión de integrina- $\beta$ 1. Por lo que FOXO1 podría disminuir la migración al reducir la producción de matriz extracelular y alterar la clusterización de integrina- $\beta$ 1.

## 6.1 Limitaciones del estudio in vitro

Los ensayos de spreading celular se realizan soltando las células y sembrándolas sobre una nueva matriz, donde las integrinas se ponen nuevamente en contacto con sus ligandos. Lo anterior favorece la organización de complejos intracelulares que inducen la formación de protrusiones de la membrana y un aumento del área celular <sup>75</sup>. Dependiendo del tipo de ensayo, distintos métodos de desanclaje son aplicados para romper las uniones entre integrinas-MEC. El método enzimático de desanclaje celular puede utilizar enzimas proteolíticas, colagenolíticas o combinaciones de ambas. La tripsina corresponde a una serina-proteasa ampliamente utilizada en cultivos celulares para el pasaje de las células adherentes como fibroblastos. Esta proteasa genera la ruptura de la fracción C-terminal de las proteínas y genera residuos de arginina o lisina <sup>76</sup>. La tripsina puede generar 70 sitios distintos de proteólisis para la integrina  $\beta$ 1 en células madre mesenquimales <sup>77</sup>. Para algunos tipos celulares y ensayos experimentales, este método puede resultar muy agresivo. Su uso puede disminuir significativamente la expresión de integrina  $\beta$ 1 en la superficie de células madre embrionarias al ser comparadas con una remoción manual en ensayos de citometría de flujo 78. Esto podría estar afectando la respuesta de los fibroblastos gingivales humanos en nuestros ensayos de spreading por inmunofluorescencia. Una alternativa para preservar la integridad de los receptores de membrana podría ser mediante el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). EDTA es un agente quelante de calcio. Al remover el calcio, iones necesarios para mantener la adhesión mediante integrinas, las células pierden anclaje. Es un método más suave para remover las células, pero requiere más tiempo de incubación para lograr su efecto. En un estudio se probó una solución con dos quelantes de calcio (EDTA y ácido nitrilotriacético) y se observó que requirieron 6 veces más tiempo que la tripsina para recuperar la misma cantidad de células. Además, con 30 minutos de incubación con los quelantes de calcio se generó una disminución significativa en la viabilidad de las células <sup>77</sup>. Un aspecto negativo de la utilización de agentes quelantes de calcio es que las interacciones integrina-ligandos son dependientes de algunos iones como magnesio, manganeso y calcio para su activación. Algunos autores han hipotetizado que un incremento de calcio extracelular podría estimular la heterodimerización de las integrinas <sup>79,80</sup>. Por lo tanto, ambos mecanismos, enzimáticos o quelantes, tienen ventajas y desventajas que podrían modificar la viabilidad celular o la activación y clusterización de las integrinas.

Se ha reportado que durante el envejecimiento se generan cambios en la composición celular de los órganos y tejidos <sup>81</sup>. Por ello, utilizamos la técnica de secuenciación de célula única para evaluar los genes regulados durante el envejecimiento y por FOXO1. Los estudios de secuenciación de tejidos orales se han centrado mayoritariamente en la respuesta de las células inmunes y han descrito brevemente las subpoblaciones de fibroblastos.

En un estudio reciente de secuenciación de célula única en mucosa oral sana en humanos, se detectaron cuatro grandes poblaciones celulares. La más abundante correspondió a células endoteliales, luego los fibroblastos, células inmunes y, por último, las células epiteliales <sup>82</sup>. Nuestros datos identificaron tres grandes grupos: fibroblastos, células inmunes y fibras nerviosas. En particular, en las muestras provenientes de ratones viejos se observó una contaminación con células epiteliales. Nuestras diferencias con el trabajo de Williams *et al.* se deben a el proceso de exclusión de los linajes epiteliales y endoteliales durante la selección por citometría de flujo. Otra diferencia con los resultados de Williams *et al.* es el número de subpoblaciones mesenquimales que pudieron identificar. En las muestras de mucosa gingival sana humana identificaron cinco subpoblaciones mesenquimales en la mucosa de ratones jóvenes y 16 subpoblaciones en ratones envejecidos al séptimo día de reparación tisular. Para nuestro estudio, enriquecimos la muestra en células mesenquimales mediante FACS lo que permitió tener una mayor definición de la heterogénea población de fibroblastos orales.

Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de célula única muestran una regulación diferencial por parte de FOXO1 sobre algunas poblaciones mesenquimales. En ratones jóvenes, la deleción de FOXO1 genera una disminución en la proporción de clústeres tipo miofibroblastos. En estos clústeres es posible detectar una disminución en la expresión de múltiples colágenos fibrilares y componentes no fibrilares de la matriz extracelular. En particular, la ausencia de FOXO1 redujo 1.7 veces la expresión de periostina (Postn) en el clúster 3. La expresión de *Postn* está restringida a ciertos procesos

durante la fase embrionaria y neonatal. Sin embargo, se ha demostrado su expresión en heridas a partir del 3er día de reparación, con un peak de expresión al día 7, lo que se correlaciona con la presencia de miofibroblastos<sup>83</sup>. En ratones knockout *Postn<sup>-/-</sup>* se observó un retraso en el cierre de heridas producto de menor proliferación de queratinocitos y una reducción en el número de miofibroblastos presentes en el tejido de granulación<sup>84,85</sup>. Como se resume en la **Figura 71**, la deleción de FOXO1 genera un cambio en la proporción de miofibroblastos, favorece la diferenciación de fibrocitos inflamatorios y disminuye colágenos formadores de fibrillas.



# Figura 33. Resumen de funciones reguladas por FOXO1 en modelo de reparación de herida en animales jóvenes.

La deleción de FOXO1 en ratones jóvenes induce cambios en poblaciones celulares y producción de colágenos. Las flechas azules representan el aumento o disminución en la condición control y las flechas rojas representan los efectos observados en el grupo experimental por deleción de FOXO1.

Cabe destacar que la deleción de FOXO1 en ratones jóvenes favoreció la aparición de una población enriquecida tanto en genes asociados a matriz extracelular como inmunes y con un gran componente pro-inflamatorio (Clúster 2). En base a este perfil transcriptómico, se sugiere que este clúster correspondería a una población de fibrocitos. Los fibrocitos son células de origen mieloide con características estromales que provienen de la médula ósea y que representa al 0.1-0.5% de los leucocitos circulantes en sangre <sup>86,87</sup>. Se caracterizan por expresar marcadores inmunes como CD45, CD14, CD34 y estromales como colágeno tipo I, III y vimentina<sup>88</sup>. Estas células tipo fibroblastos pueden incluso transdiferenciarse a miofibroblastos<sup>89,90</sup>. Sin embargo, durante el proceso de diferenciación estimulado por TGF-β1, la expresión de CD45 y CD34 disminuye, lo cual hace difícil su caracterización. Los fibrocitos son reclutados durante las fases tempranas de las heridas o en procesos fibróticos de pulmón o corazón <sup>91</sup>. A pesar de no ser considerados grandes productores de MEC al ser comparados con miofibroblastos o fibroblastos, destaca su acción paracrina. En un estudio se utilizó el sobrenadante de fibrocitos *Postn<sup>-/-</sup>* para estimular fibroblastos pulmonares. Los resultados de este estudio indican que la periostina producida por los fibrocitos es necesaria para estimular la diferenciación de fibroblasto, ya que aumenta la expresión de  $\alpha$ -SMA <sup>92</sup>. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la deleción de FOXO1 en ratones jóvenes facilita la aparición de una población inmune-estromal que podría colaborar con la producción de matriz extracelular.

Los perfiles moleculares, proteómicos y transcriptómicos asociados al decaimiento gradual de las funciones celulares durante el envejecimiento han sido constantemente estudiados. A nivel sistémico destaca el aumento de citoquinas pro-inflamatorias y a nivel celular se ha reportado una disminución y alteración en la composición de la MEC que puede alterar la arquitectura normal de diferentes tejidos <sup>93</sup>. Nuestros resultados muestran un aumento en la proporción de miofibroblastos y una disminución significativa de una amplia gama de colágenos en el modelo de envejecimiento en los ratones wild type (**Tabla 5**). Por otro lado, algunos colágenos formadores de fibrillas como *Col1a1* y *Col5a2* disminuyen tanto en ratones envejecidos como en ratones jóvenes FOXO1-KO. El colágeno tipo V está presente en un bajo porcentaje en los tejidos, pero incrementa su

expresión durante la reparación de heridas y resulta crítico para la fibrilogenesis del colágeno tipo I <sup>94</sup>. En un modelo de haploinsuficiencia de Col5a1 se reportó un enlentecimiento en la reparación de heridas dermales debido a un pobre anclaje celular a la matriz extracelular y alteraciones en la migración <sup>95</sup>. Además, reportamos una disminución de colágeno tipo XIV en ratones envejecidos (**Figura 72**). La disminución de colágeno tipo XIV también ha sido reportada en tejido pulmonar de ratones viejos (24 meses) <sup>96</sup>. La importancia de Col14a1 radica en que favorece la unión entre fibras de colágeno y sirve como sitio de unión de otros proteoglicanos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que con el envejecimiento se observa una menor transcripción de colágenos fibrilares, asociados a fibrillas y una persistencia de miofibroblastos.



**Figura 34. Resumen de los efectos inducidos por el envejecimiento en las poblaciones mesenquimales.** Producción de matriz extracelular de ratones jóvenes y envejecidos wild type.. Las flechas azules representan el aumento o disminución en la condición control y las flechas rojas representan los efectos observados en el grupo experimental por deleción de FOXO1.

En la **Figura 73** se resumen los efectos de la deleción de FOXO1 en los ratones envejecidos. Se observó que la falta de FOXO1 en ratones envejecidos indujo un aumento en la expresión de MMPs-13 y -3 en el clúster mesenquimal más abundante (Cluster 0). El aumento de MMP-13 permite la migración de fibroblastos y el reemplazo de la matriz provisional de fibrina. Cabe destacar que MMP-13 es raramente detectada en heridas dermales en adultos, pero TGF- $\beta$ 1 induce la expresión de MMP-13 en tejidos gingivales generando un rápido recambio de la matriz extracelular, favoreciendo una reparación sin formar cicatrices <sup>97</sup>. Por otra parte, MMP-3 es principalmente producida por fibroblastos y puede degradar fibronectina y algunos tipos de colágeno en sitios en remodelación activa. El déficit de MMP-3 en un modelo de heridas dermales reportó alteraciones en la fase temprana de contracción de la herida y una falta de organización en la red de actina <sup>98</sup>. Por lo tanto, FOXO1 es requerido para controlar la secreción de componentes proteolíticos en las heridas de ratones envejecidos.



Figura 35. Resumen de los efectos de la deleción de FOXO1 en ratones envejecidos.

Las flechas azules representan el aumento o disminución en la condición control y las flechas rojas representan los efectos observados en el grupo experimental por deleción de FOXO1.

Contrario a lo esperado, el clúster 2 mesenquimal, que se encuentra enriquecido en miofibroblastos, no arrojó grandes cambios transcripcionales entre especímenes envejecidos Cre- vs Cre+. Aun así, destaca la menor expresión de cistatina c (*Cst3*) en ratones que presentan la deleción de FOXO1. Se ha reportado que cistatina c reduce el crecimiento de bacterias orales como *Porphyromonas gingivalis* <sup>99</sup> lo que podría proteger contra infecciones durante la reparación de heridas. En condiciones patológicas profibróticas como la fibrosis oral submucosa ó agrandamiento gingival inducido por ciclosporina A, existe un aumento de la expresión de *Cst3* <sup>100</sup>. Sin embargo, en casos de fibrosis renal y pulmonar, la administración de CST3 tuvo efectos anti-fibróticos al alterar la vía de señalización de TGF- $\beta$  y disminuir la expresión de  $\alpha$ -SMA y colágeno tipo I <sup>101</sup>. A la fecha no hay reportes del rol de Cst3 en heridas dermales ni orales en sujetos envejecidos lo que dificulta la interpretación de los datos obtenidos en nuestros ensayos.

Structural Organization	Collagens	Young FOXO1-KO	Old FOXO1-WT	Old FOXO1-KO
	Col5a2	Down	Down	
	Col5a1			Up
Fibril-forming	Col1a1	Down	Down	
	Col3a1	Down		
	Col11a1		Down	
Fibril-associated	Col14a1		Down	
Network-forming	Col4a2		Down	Up
Network-forming	Col8a2		Down	
Multiplexins	Col18a1		Down	Up
Beaded-filaments	Col6a2		Down	
	Col6a3		Down	Up
Anchoring-filaments	Col7a1		Down	

#### Tabla 5. Tipos de colágeno regulados por FOXO1 o el envejecimiento.

Ratones jóvenes y envejecidos agrupados según tipo de organización estructural. Se realizó la comparación de Joven FOXO1-KO y Viejo FOXO1-WT respecto a Joven WT; Viejo FOXO1-KO respecto a Viejo FOXO1-WT.

Por lo tanto, la deleción de FOXO1 en fibroblastos produjo, en general, una reducción en la frecuencia de algunos clústeres mesenquimales tanto en ratones jóvenes como envejecidos. La **Tabla 5** resume alguno de los tipos de colágenos que disminuyen con la deleción de FOXO1 en ratones jóvenes y producto del envejecimiento. Además, se clasifican los transcritos de colágeno que aumentan con la deleción de FOXO1 en ratones envejecidos según el tipo de organización estructural que forman. Así, la deleción de FOXO1 en ratones de fibrillas, asociados a fibrillas, formadores de redes, multiplexinas y filamentos de cuentas (beaded-filaments). Sin embargo, se no observaron mejoras significativas en el cierre de heridas observado en los cortes histológicos en ratones envejecidos FOXO1-KO.

#### 6.2 Limitaciones del estudio in vivo

#### • Actividad basal de la recombinasa Cre

La deleción global de FOXO1 es letal y los embriones mueren al día E10.5 debido a grandes defectos a nivel vascular <sup>102</sup>. Por ello, la utilización de modelos de deleción condicional provee una alternativa para el estudio funcional postnatal de FOXO1. La utilización de la recombinasa Cre fusionada con un receptor de estrógeno mutado (ER), permite un control temporal de la deleción. Para esta tesis se utilizó una cepa de ratón que permite la deleción de FOXO1 específicamente en fibroblastos. Mediante la expresión de la enzima recombinas acre dirigida por un *enhancer* para el gen *Col1a2* ubicado río arriba del sitio de inicio de transcripción <sup>103</sup>. Este modelo utiliza el marcador de diferenciación terminal de los fibroblastos: la transcripción de colágeno tipo I. Esta región del enhancer se expresa mayoritariamente en células mesenquimales durante el desarrollo y reparación de heridas <sup>104</sup>. La administración de tamoxifeno, un estrógeno sintético, induce el ingreso de la recombinasa Cre al núcleo donde genera la escisión del gen de interés (FOXO1 flanqueado por dos sitios LoxP) del ADN cromosomal, específicamente en fibroblastos. Sin embargo, se ha reportado que el sistema de Cre/LoxP puede presentar actividad basal incluso en ausencia de tamoxifeno. Se han propuesto algunas causas y condiciones celulares que propiciarían este efecto. Entre ellas destacan la distancia entre los sitios LoxP, la vida media de las células, inespecificidad de la actividad Cre y la variabilidad de la actividad Cre entre individuos<sup>105</sup>. Se ha reportado que segmentos flanqueados por LoxP de mayor tamaño muestran menor actividad basal en células del sistema nervioso central <sup>106</sup>. Además, las células con mayor vida media pueden tener actividad residual de la Cre recombinasa por mayor tiempo. Por otra parte, resulta difícil seleccionar un gen específico para un tipo celular, por lo que es probable la actividad de la Cre recombinasa afecte otros tipos celulares. Todos estos factores pueden resultar en variables confundentes. En nuestro caso, no podemos descartar una posible actividad basal de la enzima Cre recombinasa. Y la utilización de ratones de genotipo Cre-negativo como controles, puede generar una sobre-estimación en las diferencias de expresión de mRNA. Además, el gen colágeno tipo I puede ser expresado por osteoblastos, células del músculo liso y

odontoblastos <sup>107,108</sup>. De ellos, células del musculo lisos provenientes de los vasos sanguíneos podrían ser potencialmente recombinados. Por ello, proponemos verificar la localización de la enzima Cre en ratones del genotipo genotipo Cre-positivo en presencia de tamoxifeno o el vehículo para estimar el ingreso de la recombinasa al núcleo en condiciones basales. Además, evaluar la deleción de FOXO1 específicamente en fibroblastos de la mucosa oral.

#### 7. CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman la participación de FOXO1 en la diferenciación miofibroblástica inducida por TGF- $\beta$ 1. Adicionalmente la inhibición de FOXO1 permitió evidenciar su participación en la contractibilidad, migración y *spreading* de los fibroblastos gingivales humanos. Además, se reportó por primera vez que FOXO1 regula la transcripción y la formación de clústeres de integrina- $\beta$ 1 en fibroblastos gingivales humanos.

Cabe destacar, que los datos de secuenciación de célula única presentado en esta tesis corresponden al atlas más detallado en términos de subpoblaciones mesenquimales en heridas orales de ratones jóvenes y envejecidos. De este atlas transcriptómico se concluye que:

- 1. FOXO1 regula la expresión de colágenos fibrilares en ratones jóvenes.
- FOXO1 controla la diferenciación de miofibroblastos y fibrocitos inflamatorios ratones jóvenes.
- 3. La presencia de FOXO1 es requerida para el cierre de heridas en ratones jóvenes.
- En ratones envejecidos disminuyen todos los tipos estructurales de colágeno y gran parte de la población de fibroblastos. Sin embargo, existe una persistencia de miofibroblastos durante el envejecimiento.
- 5. La falta de FOXO1 en ratones envejecidos favorece el aumento de metaloproteinasas y algunos tipos de colágeno asociados a fibrillas o formadores de redes fibrilares. Sin embargo, no favorece el cierre de las heridas.

Estos datos in vitro e in vivo sugieren que FOXO1 es requerido por los fibroblastos gingivales para su diferenciación, función secretoras y organización de matriz durante la remodelación del tejido gingival. Estos hallazgos podrían permitir guiar terapias en base a FOXO1 hacia poblaciones específicas de fibroblastos para obtener una respuesta óptima en términos de reparación tisular.

# 8. GLOSARIO

α-SMA: actina de músculo liso tipo alfa

ADN: ácido desoxirribonucleico

BSA: Albúmina de suero bovino

cADN: cadena complementaria del ADN

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

DAPI: 4 ',6-diamidino-2-fenilindol

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FBS: Suero fetal bovino

FOXO: Forkhead Box O

HRP: Peroxidasa de rábano

iFOXO: inhibidor de FOXO1

Lin: Linaje

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteinasa

mRNA: RNA mensajero

PBS: Buffer fosfato salino

PFA: paraformaldehido

PVDF: Membrana de fluoruro de polivinilideno

TGF- $\beta$ 1: Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ 1

TIRF: Fluorescencia de reflexión interna total

UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection

UMI: Unique molecular identifiers

# 9. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Oral Mucosa. in *Ten Cate's Oral Histology* 278–310 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-323-07846-7.00012-4.
- 2. Reed, D. A. & Diekwisch, T. G. H. Morphogenesis and Wound Healing in the Periodontium. *Stem Cell Biol. Tissue Eng. Dent. Sci.* 445–458 (2015) doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00039-4.
- Polimeni, G., Xiropaidis, A. V. & Wikesjö, U. M. E. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology 2000* vol. 41 30–47 (2006).
- 4. Sculean, A., Gruber, R. & Bosshardt, D. D. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *Journal of Clinical Periodontology* vol. 41 S6–S22 (2014).
- 5. Boudra, R. & Ramsey, M. R. Understanding transcriptional networks regulating initiation of cutaneous wound healing. *Yale Journal of Biology and Medicine* vol. 93 161–173 (2020).
- 6. Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M. K. & Ghahary, A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv. Wound Care* **2**, 215–224 (2013).
- Yang, L., Qui, C. X., Ludlow, A., Ferguson, M. W. J. & Brunner, G. Active Transforming Growth Factor-β in Wound Repair: Determination Using a New Assay. Am. J. Pathol. 154, 105–111 (1999).
- 8. Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**, 103–111 (1993).
- 9. Hinz et al. The Myofibroblast. Am. J. Pathol. 170, 1807–1816 (2007).
- 10. Carter, M. E. & Brunet, A. FOXO transcription factors. *Curr. Biol.* **17**, R113-4 (2007).
- 11. Paik, J. H. *et al.* FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell* **128**, 309–323 (2007).
- 12. Kurakazu, I. *et al.* FOXO1 transcription factor regulates chondrogenic differentiation through transforming growth factor β1 signaling. *J. Biol. Chem.* **294**, 17555–17569 (2019).
- 13. Zhang, C. *et al.* FOXO1 differentially regulates both normal and diabetic wound healing. *J. Cell Biol.* **209**, 289–303 (2015).
- 14. Zhang, C. *et al.* FOXO1 expression in keratinocytes promotes connective tissue healing. *Sci. Rep.* **7**, 42834 (2017).

- 15. Galili, N. *et al.* Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat. Genet.* **5**, 230–235 (1993).
- 16. Obsil, T. & Obsilova, V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* **27**, 2263–2275 (2008).
- 17. Brown, A. & Webb, A. Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **127**, 165–192 (2018).
- 18. Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857–868 (1999).
- 19. Brunet, A. *et al.* 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* **156**, 817–828 (2002).
- 20. Obsilova, V. *et al.* 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* **44**, 11608–11617 (2005).
- 21. Kim, Y. H. *et al.* A MST1–FOXO1 cascade establishes endothelial tip cell polarity and facilitates sprouting angiogenesis. *Nat. Commun. 2019 101* **10**, 1–17 (2019).
- 22. Nagashima, T. *et al.* Discovery of novel forkhead box O1 inhibitors for treating type 2 diabetes: improvement of fasting glycemia in diabetic db/db mice. *Mol. Pharmacol.* **78**, 961–970 (2010).
- 23. Vivar, R. *et al.* FoxO1 is required for high glucose-dependent cardiac fibroblasts into myofibroblast phenoconversion. *Cell. Signal.* **83**, 109978 (2021).
- 24. Jeon, H. H. et al. Clinical application of a FOXO1 inhibitor improves connective tissue healing in a diabetic minipig model. Am J Transl Res vol. 13 www.ajtr.org (2021).
- 25. Rajendran, N. K., Dhilip Kumar, S. S., Houreld, N. N. & Abrahamse, H. Understanding the perspectives of forkhead transcription factors in delayed wound healing. *Journal of Cell Communication and Signaling* vol. 13 151–162 (2019).
- 26. Vivar, R. *et al.* FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1863**, 128–138 (2016).
- 27. Ponugoti, B. *et al.* FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF-b1 and prevention of oxidative stress. *J. Cell Biol.* **203**, 327–343 (2013).
- 28. Markus Roupé, K., Alberius, P., Schmidtchen, A. & Sørensen, O. E. Gene expression demonstrates increased resilience toward harmful inflammatory stimuli in the proliferating epidermis of human skin wounds. *Experimental Dermatology* vol. 19 (2010).
- 29. Mori, R. *et al.* Reduced FOXO1 expression accelerates skin wound healing and attenuates scarring. *Am. J. Pathol.* **184**, 2465–2479 (2014).

- 30. Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J. & Mirastschijski, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur. Surg. Res.* **58**, 81–94 (2017).
- 31. Roupé, K. M. *et al.* Transcription factor binding site analysis identifies FOXO transcription factors as regulators of the cutaneous wound healing process. *PLoS One* **9**, (2014).
- 32. Jeon, H. H. *et al.* FOXO1 regulates VEGFA expression and promotes angiogenesis in healing wounds. *J. Pathol.* **245**, 258–264 (2018).
- 33. Liu, S. *et al.* Expression of integrin β1 by fibroblasts is required for tissue repair in vivo. *J. Cell Sci.* **123**, 3674–3682 (2010).
- 34. Koivisto, L., Heino, J., Häkkinen, L. & Larjava, H. Integrins in Wound Healing. *Adv. Wound Care* **3**, 762–783 (2014).
- 35. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
- 36. Spiess, M. *et al.* Active and inactive  $\beta$ 1 integrins segregate into distinct nanoclusters in focal adhesions. *J. Cell Biol.* **217**, 1929–1940 (2018).
- 37. Cavalcanti-Adam, E. A. *et al.* Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys. J.* **92**, 2964–2974 (2007).
- 38. Li, S. *et al.* P. gingivalis modulates keratinocytes through FOXO transcription factors. *PLoS One* **8**, (2013).
- 39. Josephson, A. M. *et al.* Age-related inflammation triggers skeletal stem/ progenitor cell dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 6995–7004 (2019).
- 40. Duscher, D. *et al.* Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. *Sci. Reports 2014 41* **4**, 1–9 (2014).
- 41. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* vol. 153 1194 (2013).
- 42. Klein, D. R. Oral soft tissue changes in geriatric patients. *Bull. New York Acad. Med. J. Urban Heal.* **56**, 721–727 (1980).
- 43. Holm-Pedersen, P. & Löe, H. Wound healing in the gingiva of young and old individuals. *Eur. J. Oral Sci.* **79**, 40–53 (1971).
- 44. Seccombe, K. & Ishii-Kuntz, M. Perceptions of Problems Associated with Aging: Comparisons Among Four Older Age Cohorts 1. (1991).
- 45. Engeland, C. G., Bosch, J. A., Cacioppo, J. T. & Marucha, P. T. Mucosal wound healing: The roles of age and sex. *Arch. Surg.* **141**, 1193–1197 (2006).

- 46. Cáceres, Oyarzun, A. & Smith, P. C. Defective Wound-healing in Aging Gingival Tissue. *J. Dent. Res.* **93**, 691–7 (2014).
- 47. Matsuzaki, T. *et al.* FoxO transcription factors modulate autophagy and proteoglycan 4 in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Sci. Transl. Med.* **10**, (2018).
- 48. Lee, K. Il *et al.* FOXO1 and FOXO3 transcription factors have unique functions in meniscus development and homeostasis during aging and osteoarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 3135–3143 (2020).
- 49. Birnbaum, A., Wu, X., Tatar, M., Liu, N. & Bai, H. Age-dependent changes in transcription factor FoxO targeting in female Drosophila. *Front. Genet.* **10**, 312 (2019).
- 50. Makrantonaki, E., Wlaschek, M. & Scharffetter-Kochanek, K. Pathogenesis of wound healing disorders in the elderly. *JDDG J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* **15**, 255–275 (2017).
- 51. Liang, C., Park, A. & Guan, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2**, 329–333 (2007).
- 52. Pfaffl, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. (2004).
- 53. Chen, Y., Yu, Q. & Xu, C.-B. Original Article A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. *Int J Clin Exp Med* **10**, 14904–14910 (2017).
- 54. Karamichos, D., Lakshman, N. & Petroll, W. M. Technique article: An experimental model for assessing fibroblast migration in 3-D collagen matrices. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 1–9 (2009).
- 55. Hinz, Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. & Chaponnier, C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2730–41 (2001).
- 56. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal* of *Investigative Dermatology* vol. 127 526–537 (2007).
- 57. Tomasek, J. J., Haaksma, C. J., Schwartz, R. J. & Howard, E. W. Whole animal knockout of smooth muscle alpha-actin does not alter excisional wound healing or the fibroblast-to-myofibroblast transition. *Wound Repair Regen.* **21**, 166–176 (2013).
- 58. Vivar, R. *et al.* Role of FoxO3a as a negative regulator of the cardiac myofibroblast conversion induced by TGF-β1. *Biochim. Biophys. acta. Mol. cell Res.* **1867**, (2020).
- 59. Holzhauser, L. et al. Foxo3 modulates cardiac remodeling via inhibition of

myofibroblast differentiation in accute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, A1010 (2015).

- 60. Toullec, A. *et al.* Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol. Med.* **2**, 211–230 (2010).
- 61. Vågesjö, E. *et al.* Accelerated wound healing in mice by on-site production and delivery of CXCL12 by transformed lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 1895–1900 (2018).
- 62. Shinde, A. V., Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. The role of α-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1863**, 298–309 (2017).
- 63. Dugina, V., Fontao, L., Chaponnier, C., Vasiliev, J. & Gabbiani, G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J. Cell Sci.* **114**, 3285–3296 (2001).
- 64. Roca-Cusachs, P., Gauthier, N. C., Rio, A. del & Sheetz, M. P. Clustering of  $\alpha 5\beta 1$  integrins determines adhesion strength whereas  $\alpha v\beta 3$  and talin enable mechanotransduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 16245–16250 (2009).
- 65. Caswell, P. & Norman, J. Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends Cell Biol.* **18**, 257–263 (2008).
- 66. Shi, F. & Sottile, J. Caveolin-1-dependent  $\beta$ 1 integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. *J. Cell Sci.* **121**, 2360–2371 (2008).
- 67. van den Heuvel, A., Schulze, A. & Burgering, B. Direct control of caveolin-1 expression by FOXO transcription factors. *Biochem. J.* **385**, 795–802 (2005).
- 68. Roy, U. *et al.* Wild-type APC regulates caveolin-1 expression in human colon adenocarcinoma cell lines via FOXO1a and C-myc. *Mol. Carcinog.* **47**, 947–955 (2008).
- 69. Beyeler, J., Katsaros, C. & Chiquet, M. Impaired Contracture of 3D Collagen Constructs by Fibronectin-Deficient Murine Fibroblasts. *Front. Physiol.* **10**, 166 (2019).
- 70. Ahmed, A. A., Mooar, P. A., Kleiner, M., Torg, J. S. & Miyamoto, C. T. Hypertensive patients show delayed wound healing following total hip arthroplasty. *PLoS One* **6**, (2011).
- 71. Smerieri, A., Montanini, L., Maiuri, L., Bernasconi, S. & Street, M. E. FOXO1 content is reduced in cystic fibrosis and increases with IGF-I treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 18000–18022 (2014).
- 72. Vivar, R. *et al.* FoxO1 is required for high glucose-dependent cardiac fibroblasts into myofibroblast phenoconversion. *Cell. Signal.* **83**, (2021).

- 73. Yuan, C., Wang, L., Zhou, L. & Fu, Z. The function of FOXO1 in the late phases of the cell cycle is suppressed by PLK1-mediated phosphorylation. *Cell Cycle* **13**, 807–819 (2014).
- 74. Missirlis, D. *et al.* Substrate engagement of integrins  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha v \beta 3$  is necessary, but not sufficient, for high directional persistence in migration on fibronectin. *Sci. Rep.* **6**, 1–18 (2016).
- 75. Berrier, A. & LaFlamme, S. Cell-spreading assays. *Methods Mol. Biol.* **294**, 55–68 (2005).
- 76. Olsen, J. V., Ong, S. E. & Mann, M. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 608–614 (2004).
- Tsuji, K. *et al.* Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* 26, 1089–1102 (2017).
- 78. Kallas-Kivi, A. *et al.* The role of integrin  $\beta$ 1 in the heterogeneity of human embryonic stem cells culture. (2018) doi:10.1242/bio.034355.
- 79. Tharmalingam, S. & Hampson, D. R. The Calcium-Sensing Receptor and Integrins in Cellular Differentiation and Migration. *Front. Physiol.* **0**, 190 (2016).
- Xie, C. *et al.* The integrin α-subunit leg extends at a Ca2+-dependent epitope in the thigh/genu interface upon activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15422–15427 (2004).
- 81. A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse. *Nature* **583**, 590–595 (2020).
- 82. Williams, D. W. *et al.* Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal-neutrophil axis regulating tissue immunity. *Cell* **184**, 4090-4104.e15 (2021).
- 83. Jackson-Boeters, L., Wen, W. & Hamilton, D. W. Periostin localizes to cells in normal skin, but is associated with the extracellular matrix during wound repair. *J. Cell Commun. Signal. 2009 32* **3**, 125–133 (2009).
- 84. Nishiyama, T. *et al.* Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing. *PLoS One* **6**, (2011).
- 85. Elliott, C. *et al.* Periostin modulates myofibroblast differentiation during full-thickness cutaneous wound repair. *J. Cell Sci.* **125**, 121–132 (2012).
- 86. Bucala, R., Spiegel, L. A., Chesney, J., Hogan, M. & Cerami, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.* **1**, 71 (1994).
- 87. Chesney, J. & Bucala, R. Peripheral blood fibrocytes: mesenchymal precursor cells

and the pathogenesis of fibrosis. Curr. Rheumatol. Rep. 2, 501–505 (2000).

- 88. Herzog, E. & Bucala, R. Fibrocytes in health and disease. *Exp. Hematol.* **38**, 548–556 (2010).
- 89. Hong, K. M., Belperio, J. A., Keane, M. P., Burdick, M. D. & Strieter, R. M. Differentiation of Human Circulating Fibrocytes as Mediated by Transforming Growth Factor- $\beta$  and Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  \*. *J. Biol. Chem.* **282**, 22910–22920 (2007).
- 90. Mori, L., Bellini, A., Stacey, M. A., Schmidt, M. & Mattoli, S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp. Cell Res.* **304**, 81–90 (2005).
- 91. Grieb, G. & Bucala, R. Fibrocytes in Fibrotic Diseases and Wound Healing. *Adv. Wound Care* **1**, 36 (2012).
- 92. Ashley, S. L., Wilke, C. A., Kim, K. K. & Moore, B. B. Periostin regulates fibrocyte function to promote myofibroblast differentiation and lung fibrosis. (2017) doi:10.1038/mi.2016.61.
- 93. Mahmoudi, S. *et al.* Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. *Nature* **574**, 553–558 (2019).
- 94. Wenstrup, R. J. *et al.* Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J. Biol. Chem.* **279**, 53331–53337 (2004).
- 95. Denigris, J., Yao, Q., Birk, E. K. & Birk, D. E. Altered dermal fibroblast behavior in a collagen v haploinsufficient murine model of classic Ehlers-Danlos syndrome. *Connect. Tissue Res.* **57**, 1–9 (2016).
- 96. Angelidis, I. *et al.* An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nat. Commun. 2019 101* **10**, 1–17 (2019).
- 97. Ravanti, L. *et al.* Transforming growth factor-β induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 37292–37300 (1999).
- 98. Bullard, K. M. *et al.* Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann. Surg.* **230**, 260–265 (1999).
- 99. Blankenvoorde, M. F. J., Henskens, Y. M. C., Hof, W. V. T., Veerman, E. C. L. & Amerongen, A. V. N. Inhibition of the Growth and Cysteine Proteinase Activity of Porphyromonas gingivalis by Human Salivary Cystatin S and Chicken Cystatin. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 377, 847–864 (1996).
- 100. Tsai, C., SF, Y., FM, H. & YC, C. The upregulation of cystatin C in human gingival fibroblasts stimulated with cyclosporine A. *J. Periodontal Res.* **44**, 459–464 (2009).

- Kim, Y., HW, S., YS, C. & JW, P. CST3 and GDF15 ameliorate renal fibrosis by inhibiting fibroblast growth and activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500, 288–295 (2018).
- 102. Hosaka, T. *et al.* Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2975–2980 (2004).
- 103. Zheng, B., Z, Z., CM, B., B, de C. & CP, D. Ligand-dependent genetic recombination in fibroblasts : a potentially powerful technique for investigating gene function in fibrosis. *Am. J. Pathol.* **160**, 1609–1617 (2002).
- 104. Rittié, L. Fibrosis Methods and Protocols. Fibrosis Methods and Protocols (SpringerLink, 2017).
- 105. Stifter, S. A. & Greter, M. STOP floxing around: Specificity and leakiness of inducible Cre/loxP systems. *Eur. J. Immunol.* **50**, 338–341 (2020).
- 106. Hove, H. Van *et al.* Identifying the variables that drive tamoxifen-independent CreERT2 recombination: Implications for microglial fate mapping and gene deletions. *Eur. J. Immunol.* **50**, 459–463 (2020).
- 107. Blair, H. C. *et al.* Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 23, 268 (2017).
- 108. Rocnik, E. F., Chan, B. M. & Pickering, J. G. Evidence for a role of collagen synthesis in arterial smooth muscle cell migration. *J. Clin. Invest.* **101**, 1889–1898 (1998).

# **10. ANEXO**



#### Figura S1. Localización celular de FOXO1 en fibroblastos gingivales humanos.

Imágenes representativas del FOXO1 total (epítopo C29H4) a las 3, 6 y 24h de estimulación, identificado por inmunofluorescencia. FOXO1 conjugado con anticuerpo secundarios Alexa Fluor® 488 (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul). Una réplica experimental por condición a excepción del grupo 6h (n=2).