



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN
PULMONAR DE LAS PROTEÍNAS LC3B Y P62 EN UN
MODELO DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD
DESARROLLADO EN RATÓN (*Mus musculus*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANDREA MONTSERRAT SÁNCHEZ BARAJAS



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno:

APELLIDO PATERNO: Sánchez
APELLIDO MATERNO: Barajas
NOMBRES: Andrea Montserrat
NO. DE CUENTA: 315029471
TELÉFONO: 5548117258
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología

2. Datos de la tutora y secretaria del jurado:

GRADO: Dra.
APELLIDO PATERNO: Cabrera
APELLIDO MATERNO: Benítez
NOMBRES: María Sandra
CORREO: scb@ciencias.unam.mx
TELÉFONO: 56225676
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias, Laboratorio de Fibrosis.

3. Datos del sinodal y presidente del jurado:

GRADO: Dra.
APELLIDO PATERNO: Pardo
APELLIDO MATERNO: Cemo
NOMBRES: Annie
CORREO: apardos@unam.mx
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias, Laboratorio de Fibrosis.

4. Datos del sinodal y vocal del jurado:

GRADO: Dra.
APELLIDO PATERNO: Escobar
APELLIDO MATERNO: Sánchez
NOMBRES: María Luisa
CORREO: escobarluisa@ciencias.unam.mx
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias

5. Datos del sinodal:

GRADO: Dr.
APELLIDO PATERNO: Cárdenas
APELLIDO MATERNO: Vázquez
NOMBRES: René de Jesús
CORREO: rcv@ciencias.unam.mx
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias

6. Datos del sinodal:

GRADO: Dr.
APELLIDO PATERNO: Cisneros
APELLIDO MATERNO: Lira
NOMBRES: José Guadalupe
CORREO: jose.cisneros@ciencias.unam.mx
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias, Laboratorio de Fibrosis.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Laboratorio de Fibrosis (Biopatología Pulmonar) de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas.

Al Dr. Luis Jiménez Álvarez, investigador del INER por la donación de los cortes de tejido pulmonar de ratón derivado del modelo de neumonitis por hipersensibilidad.

A la Dra. María Sandra Cabrera Benítez, mi tutora, de manera muy especial por su apoyo incondicional.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica proyecto PAPIIT-IN202221 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

A mis sinodales, por las observaciones y comentarios sobre mi trabajo de tesis, lo cual contribuyó a mejorar este escrito.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. ESTRUCTURA PULMONAR	2
1.2 SISTEMA INMUNE DEL PULMÓN.	3
1.3 NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD	7
1.4 CLASIFICACIÓN DE LA NH.	8
1.5 AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA NH.	9
1.6 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA DE LOS INDIVIDUOS Y FACTORES AMBIENTALES.	11
1.7 RESPUESTA INMUNE Y SU RELEVANCIA EN EL DESARROLLO DE NH.	12
1.8 RESPUESTAS DE HIPERSENSIBILIDAD FRENTE AL ANTÍGENO	14
1.9 AUTOFAGIA	16
1.10 ETAPAS DE LA AUTOFAGIA	20
1.10.1 Inicio o nucleación	20
1.10.2 Elongación	21
1.10.3 Maduración del autofagosoma	23
1.10.4 Fusión con el lisosoma y formación de autolisosoma	24
1.10.5 Degradación del cargo y reciclaje de productos degradados	26
1.11 AUTOFAGIA Y SU ASOCIACIÓN CON NH.	26
1.12 MODELOS ANIMALES DE NH EN RATÓN.	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo General:	31
4.2 Objetivos particulares:	31
5. MÉTODOS	31
5.1 Modelo de neumonitis por hipersensibilidad.	31
5.2 Inmunohistoquímica.	33
5.3 Evaluación por microscopía.	33
5.4 Prueba estadística.	34
5. RESULTADOS	34

6.1 INMUNOLOCALIZACIÓN DE LC3B EN PULMÓN.	34
6.2 INMUNOLOCALIZACIÓN DE p62 EN PULMÓN.	46
6. <i>DISCUSIÓN</i>	56
8. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura pulmonar y tipos de células.	3
FIGURA 2. Inhalación de partículas orgánicas e inorgánicas y organización del surfactante.	5
FIGURA 3. Expresión de citocinas en células inflamatorias.	7
FIGURA 4. Histología comparativa de pulmón con NH.	9
FIGURA 5. Respuesta inmunitaria innata.	13
FIGURA 6. Representación esquemática de los cuatro tipos de hipersensibilidad.	16
FIGURA 7. Representación esquemática de los 3 tipos de autofagia.	18
FIGURA 8. Resumen del proceso de autofagia.	19
FIGURA 9. Nucleación y elongación del fagóforo en mamíferos.	22
FIGURA 10. Fusión del autofagosoma con el lisosoma.	26
FIGURA 11. <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	29
FIGURA 12. Modelo de neumonitis por hipersensibilidad.	32
FIGURA 13. Controles negativos de la IHC para LC3B.	36
FIGURA 14. Evaluación de LC3B en pulmón de ratones control tratados con solución salina y sacrificados 4 días post-tratamiento.	37
FIGURA 15. Evaluación LC3B en pulmón de ratones tratados con administración intranasal del antígeno de <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , por tres semanas y sacrificados 1 día post-tratamiento (modelo inicial).	39
FIGURA 16. Evaluación de LC3B en pulmón de ratones tratados con administración intranasal del antígeno de <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> por tres semanas y sacrificados 4 días post-tratamiento (modelo avanzado).	40
FIGURA 17. Resumen comparativo de los distintos tipos de células positivas para LC3B en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , en el modelo de NH inicial y NH avanzada.	41
FIGURA 18. Cuantificación de células totales positivas para LC3B en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , en el modelo de NH inicial y NH avanzada.	44
FIGURA 19. Cuantificación de células positivas para LC3B en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , en el modelo de NH inicial y NH avanzada.	45
FIGURA 20. Comparación del porcentaje de macrófagos y neutrófilos positivos para LC3B en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> en el modelo de NH inicial y NH avanzada.	45
FIGURA 21. Controles negativos de la IHC para p62.	47
FIGURA 22. Evaluación de p62 en pulmón de ratones control tratados con solución salina.	49
FIGURA 23. Evaluación de p62 en pulmón de ratones tratados con administración intranasal del antígeno de <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , por tres semanas y sacrificados 1 día post-tratamiento (modelo inicial).	50
FIGURA 24. Evaluación de p62 en pulmón de ratones tratados con administración intranasal del antígeno de <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , por tres semanas y sacrificados 4 días post-tratamiento (modelo avanzado).	51
FIGURA 25. Resumen comparativo de los distintos tipos de células positivas para p62 en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con <i>saccharopolyspora rectivirgula</i> , en el modelo de NH inicial y NH avanzada.	52
FIGURA 26. Cuantificación de células totales para p62 en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , en el modelo de NH inicial y NH avanzada.	55
FIGURA 27. Cuantificación de células positivas para p62 en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> , en el modelo de NH inicial y NH avanzada.	55

FIGURA 28. Comparación de la cuantificación de macrófagos y neutrófilos positivos para p62 en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*, en el modelo de NH inicial y NH avanzada..... 56

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cuantificación de células totales (núcleos totales) y macrófagos positivos para LC3B en el pulmón de ratones control y en el pulmón de ratones del modelo inicial y avanzado de NH.....	42
TABLA 2. Cuantificación de células totales (núcleos totales) y neutrófilos para LC3B en el pulmón de ratones control y en el pulmón de ratones del modelo inicial y avanzado de NH.....	42
TABLA 3. Células totales (núcleos totales), porcentaje normalizado de macrófagos y neutrófilos positivos para LC3B en el pulmón de ratones control, del modelo inicial y avanzado de NH.....	43
TABLA 4. Cuantificación de células totales (núcleos totales) y macrófagos para p62 en el pulmón de ratones control y en el pulmón de ratones del modelo inicial y avanzado de NH.....	53
TABLA 5. Cuantificación de células totales (núcleos totales) y neutrófilos para p62 en el pulmón de ratones control y en el pulmón de ratones del modelo inicial y avanzado de NH.....	54
TABLA 6. Células totales (núcleos totales), porcentaje normalizado de macrófagos y neutrófilos positivos para p62 en el pulmón de ratones control, del modelo inicial y avanzado de NH.....	54

ABREVIATURAS

AT1 Alveolar Type I cell
AT2 Alveolar Type II cell
EPOC Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
NH Neumonitis por hipersensibilidad
APC Antigen Presenting Cell
PAMP Pathogen-Associated Molecular Patterns
TLR Toll-Like Receptor
DAMP Damage-Associated Molecular Patterns
PRR Pattern Recognition Receptor
NLR Nucleotide-binding oligomerization domain–Like Receptors
EPI Enfermedades Pulmonares Intersticiales
NSIP Non-Specific Interstitial Pneumonia
BAL BronchoAlveolar lavage
UIP Usual Interstitial Pneumonia
MHC Major Histocompatibility Complex
PBD Pigeon Breeders Disease
TAP Transporter associated with Antigen Processing
RE Retículo Endoplasmático
ATP Adenosine 5'-triphosphate
CLR C-type Lectin family
MHC I Major Histocompatibility Complex class I
MHC II Major Histocompatibility Complex class II
IL InterLeucina
MVB Multivesicular Body
CMA Chaperone-Mediated Autophagy
ATG AuTophagy-related genes
ULK1 Unc-51 Like autophagy activating Kinase I

AMPK *Active Protein Kinase*
EAT *Early Autophagy Targeting/tethering*
VMP1 *Vacuole Membrane Protein 1*
PIK3C3 *Phosphatidylinositol 3-kinase*
LC3 *Light Chain 3*
NLS *Nuclear Localization Signal*
LIR *LC3 Interaction Region*
KIR *KEAP1 Interaction Region*
UBA *Ubiquitin-Associated Domain*
ESCRT *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*
GTP *Guanosine-5'-triphosphate*
GDP *Guanosine-5'-diphosphate*
FYCO1 *FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1*
RILP *Rab-Interacting Lysosomal Protein*
FPI *Fibrosis Pulmonar idiopática*
FLD *Farmer's Lung Disease*
SR-Ag *antígeno S. rectivirgula*
PDE *Pigeon Dropping Extracts*

RESUMEN

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una de las enfermedades pulmonares intersticiales más frecuentes, puede ser desarrollada en personas de todas las edades, más frecuentemente en personas con edad laboral ya que se trata de una enfermedad ocupacional. Puede ser desencadenada por más de 300 antígenos que son capaces de llegar al epitelio pulmonar y desencadenar una reacción de hipersensibilidad de tipo III o IV en individuos susceptibles genéticamente. Entre los agentes etiológicos se encuentra *Saccharopolyspora rectivirgula* el agente causal de la enfermedad del granjero. La NH se clasifica en dos categorías: la NH aguda / inflamatoria y la NH crónica / fibrótica. Por otro lado, se ha descrito que la autofagia, un proceso de degradación intracelular, está involucrada en el desarrollo de diversas patologías pulmonares como asma, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fibrosis pulmonar idiopática, sin embargo, los estudios de su posible participación en la NH son escasos, por ello en esta tesis, como una primera aproximación, se evaluó la localización celular por inmunohistoquímica de las proteínas LC3B y p62, involucradas en la maquinaria de autofagia, en un modelo animal de NH inicial y avanzado inducido por *S. rectivirgula* desarrollado en ratón (*Mus musculus*). Se encontró la presencia de estas proteínas en mayor abundancia en células inflamatorias, principalmente en neutrófilos y macrófagos, aunque también en el epitelio bronquial y algunas células mesenquimales, específicamente para p62. Estos resultados sugieren que el proceso de la autofagia podría estar involucrado en el desarrollo de NH y nuestros hallazgos abren nuevas rutas de investigación para esta patología.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA PULMONAR

El sistema respiratorio, es un complejo multicelular que se vincula íntimamente con el sistema cardiovascular para lograr el intercambio gaseoso. Se puede dividir en la zona conductora y la zona respiratoria, la primera consta de las vías respiratorias que transportan los gases dentro y fuera de los pulmones, que incluye a la tráquea, bronquios y se extiende hasta los bronquiolos terminales, por otro lado, la zona respiratoria corresponde al parénquima pulmonar que incluye bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alveolos. Las diversas regiones anatómicas del tracto respiratorio están pobladas por diferentes tipos de células epiteliales, endoteliales, mesenquimales e inmunes únicas, críticas para el funcionamiento de cada compartimento. Hay principalmente células ciliadas, células club, células caliciformes y células basales en la tráquea y el epitelio bronquial, mientras que los bronquios más pequeños están compuestos por células ciliadas, células club y células neuroendocrinas en los puntos de ramificación (**Figura 1**) (Brune et al., 2015; Treuting et al., 2018; Wu & Song, 2020).

En los alvéolos hay dos linajes primarios de células en el epitelio: las células del epitelio alveolar tipo 1 o AT1 (del inglés, *Alveolar Type I cell*) y tipo 2 o AT2 (del inglés, *Alveolar Type II cell*) (**Figura 1**). Las células AT1 cubren el 95% de la superficie alveolar y están yuxtapuestas con el plexo capilar, son células planas muy delgadas, morfología esencial para el intercambio gaseoso y están unidas entre sí y a otras células por uniones ocluyentes. Las AT2 son células cúbicas secretoras que están dispuestas entre las AT1 (**Figura 1**), tienen tendencia de congregarse en uniones septales y son las responsables de generar el surfactante pulmonar, que está formado por una mezcla de lípidos y proteínas que se colocan en la interfaz alveolar aire-líquido y reducen la tensión superficial de la fina capa de agua que cubre el epitelio pulmonar, logrando una reducción en el trabajo respiratorio y la prevención del colapso alveolar (**Figura 2b**). Las células AT2 pueden actuar tanto como una población de células madre autorrenovables como en la regeneración de células AT1 después de una lesión en el pulmón adulto (Basil et al., 2020; Pawlina, 2017; López & Perez 2014).

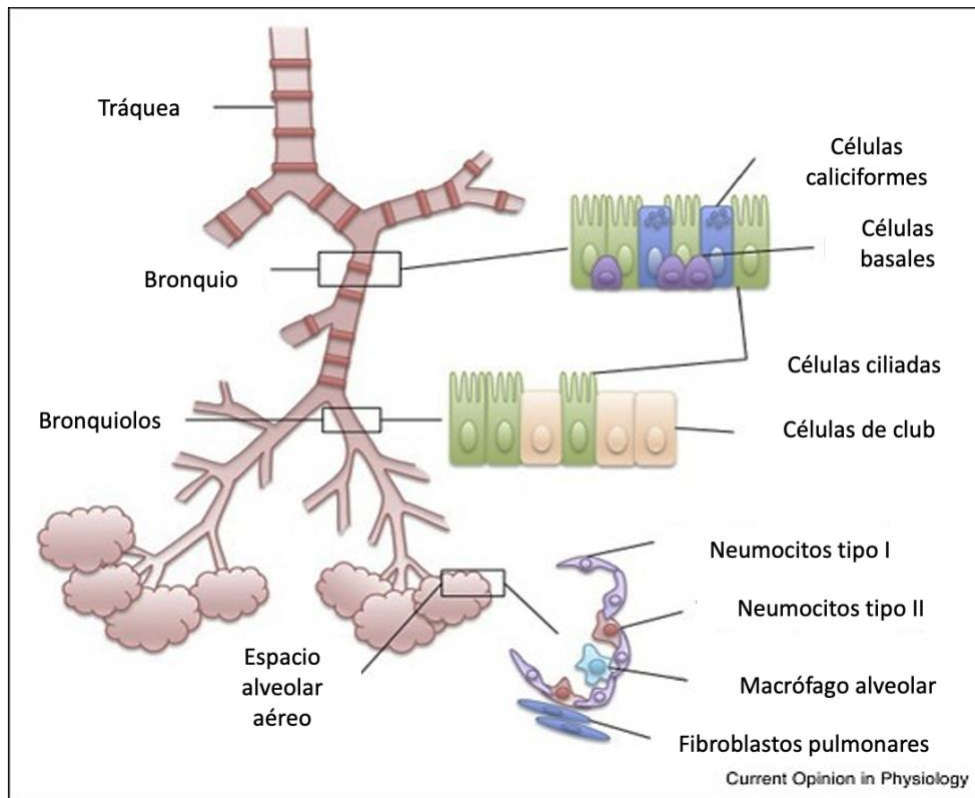


Figura 1. Estructura pulmonar y tipos de células. El pulmón está formado por ramas progresivamente más pequeñas; desde la tráquea central hasta los bronquiolos. Las vías respiratorias superiores están unidas por anillos cartilagosos y están revestidas con células basales, células ciliadas y células caliciformes productoras de moco. Las vías respiratorias inferiores carecen de cartilago y están revestidas principalmente por células epiteliales ciliadas y células epiteliales no ciliadas. Los bronquiolos terminales luego se dividen en conductos alveolares y finalmente alvéolos. Los alvéolos consisten en neumocitos de tipo I y II (células epiteliales AT1 y AT2), una matriz extracelular rodeada de capilares, fibroblastos pulmonares y macrófagos alveolares que escanean las vías respiratorias en busca de daños o patógenos. Tomada y modificada de: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2468867318300610-gr1.jpg>

Los pulmones están expuestos al medio ambiente, encontrándose a diario con patógenos transportados por el aire; incluyendo partículas de polvo, humo de cigarrillo, contaminantes, virus y bacterias. El pulmón tiene sistemas de defensa para protegerse de esta agresión (cilios, moco y macrófagos alveolares residentes). Sin embargo, la exposición repetida a ciertos agentes y la falla de los mecanismos de defensa pueden causar enfermedades pulmonares inflamatorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, neumonitis por hipersensibilidad (NH) y fibrosis pulmonar.

1.2 SISTEMA INMUNE DEL PULMÓN.

Los humanos tienen una frecuencia respiratoria promedio de 15 respiraciones/min y un volumen corriente promedio de 500 ml, los pulmones están expuestos a más de 10,000 L de aire ambiental por día. El aire inspirado consiste en una mezcla compleja de gases con cantidades variables de

partículas que incluyen polvos orgánicos e inorgánicos, polen, bacterias y virus, además de contaminantes, oxidantes y toxinas, esto provoca que el tracto respiratorio esté expuesto a agentes patógenos y nocivos desde los conductos nasales hasta los alvéolos (**Figura 2a**); las estructuras anatómicas que constituyen las vías respiratorias conductoras y el epitelio pulmonar desempeñan funciones distintas en la defensa innata de los pulmones y la diversidad de células epiteliales que recubren el tracto respiratorio contribuyen de manera única a la homeostasis pulmonar, sin embargo las partículas de 1 μm de tamaño o más pequeñas como bacterias, proteínas virales entre otras pueden atravesar todas estas barreras y llegar a la superficie alveolar donde interactúan con los componentes solubles y celulares responsables de la inmunidad del pulmón (Whitsett & Aleghat, 2015; Riches & Martin, 2018).

A nivel celular, la inmunidad innata está mediada principalmente por las funciones coordinadas de las vías respiratorias y las células epiteliales alveolares, macrófagos residentes, neutrófilos reclutados y monocitos que responden inmediatamente al material inhalado. Por otra parte, el sistema inmunitario adaptativo, que está compuesto principalmente por linfocitos T, linfocitos B y células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *Antigen Presenting Cell*), responde más lentamente pero con una especificidad considerablemente mayor y con el desarrollo de la memoria inmunológica (Riches & Martil, 2018).

El epitelio respiratorio y otras células pulmonares secretan una variedad de polipéptidos que cumplen funciones de defensa, además de crear múltiples barreras mediadas por productos secretorios como el glucocalix, las superficies de membrana y las proteínas de unión intercelular como claudinas, conexinas, paranexinas, cadherinas y proteínas de la zona ocluyente. Los componentes solubles de las vías respiratorias y los fluidos alveolares tienen un papel importante en la inmunidad innata de los pulmones. En las vías respiratorias conductoras, los componentes de los fluidos incluyen lisozima, que es lítica para muchas membranas bacterianas; lactoferrina, que excluye el hierro del metabolismo bacteriano; IgA e IgG; defensinas, que son péptidos antimicrobianos liberados por leucocitos y células epiteliales respiratorias. Las proteínas del complemento y las proteínas asociadas al surfactante sirven como opsoninas microbianas adicionales. Las proteínas que conforman al surfactante (SP-A, SP-B, SP-C y SP-D) ejercen un rol importante en la inmunidad innata del pulmón, la SP-A y SP-D son miembros de la familia de las colectinas, sus dominios tipo lectina carboxi-terminales se unen con especificidad variable a una diversidad de patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), incluidas las superficies de carbohidratos complejos de virus,

patógenos bacterianos, fúngicos y toxinas asociadas, estas proteínas pueden regular las actividades de macrófagos, neutrófilos y linfocitos, potenciando la opsonización y destrucción de patógenos. La mielina tubular es un complejo lípido-proteína que alberga otras proteínas de defensa innatas, incluidas la lisozima y la SP-C que tiene distintas actividades antivirales y antimicrobianas además de su capacidad de mejorar la actividad tensoactiva (**Figura 2**). La SP-B, una proteína catiónica, además de su rol en la función tensoactiva también mejora la destrucción de bacterias a pH ácido dentro de los macrófagos alveolares (Brune et al., 2015; Whirsett & Alenqhat 2014; Martin & Frevert, 2005).

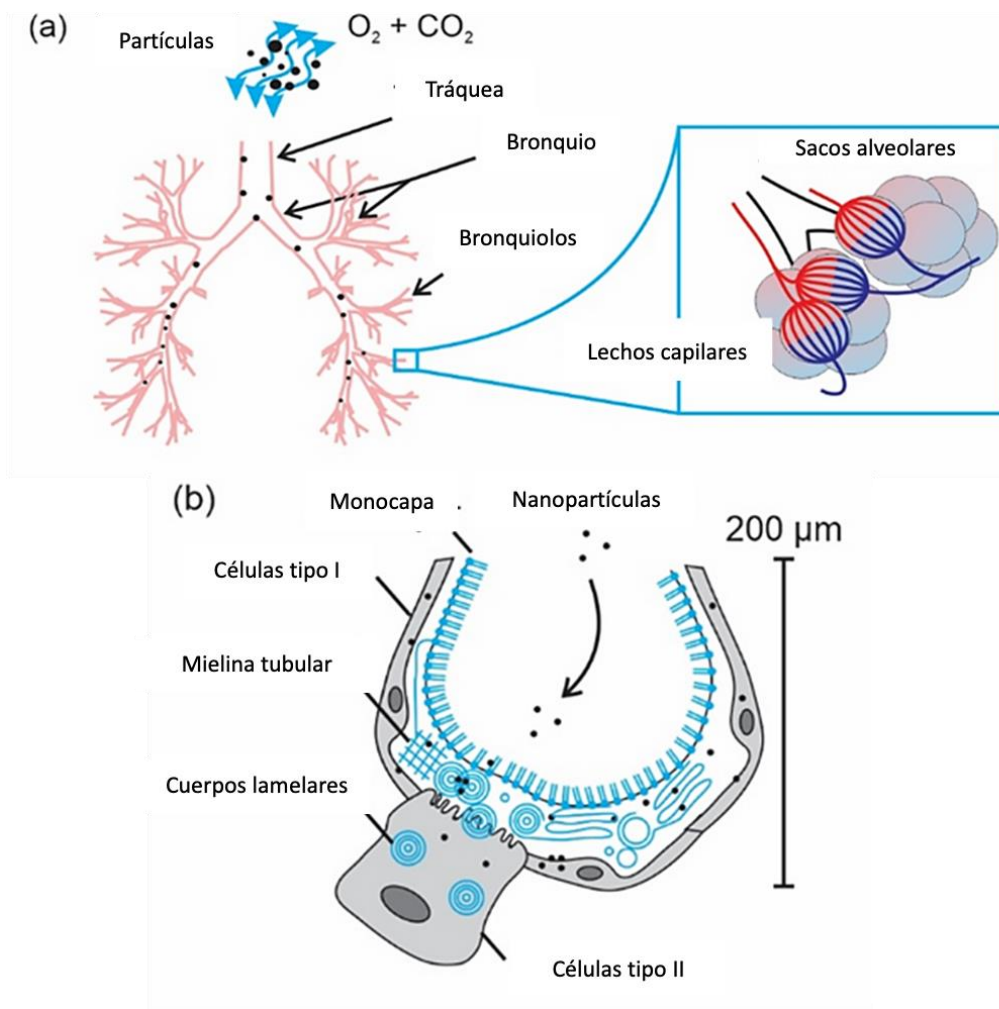


Figura 2. Inhalación de partículas orgánicas e inorgánicas y organización del surfactante. El tracto respiratorio está expuesto a agentes patógenos y nocivos que pueden llegar hasta los sacos alveolares, el epitelio alveolar está compuesto por células alveolares de tipo I y tipo II, estas últimas secretan el tensoactivo, formando una capa de tensoactivo en la interfaz aire-líquido y la mielina tubular, un complejo lípido-proteína constituido por proteínas de defensa innatas, incluidas la lisozima y la SP-C que tiene distintas actividades antivirales y antimicrobianas además de su capacidad de mejorar la actividad tensoactiva. Tomada y modificada de: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-76332-7>

Las células de las vías respiratorias y del entorno alveolar pueden detectar y responder ante PAMP o ante patrones moleculares asociado a daño o DAMP (del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*), por sus receptores de reconocimiento de patrones o PRR (del inglés *Pattern Recognition Receptor*), incluida la familia TLR (del inglés *Toll-Like Receptor*) que, algunos de sus miembros se encuentran en las paredes alveolares y el epitelio ciliado de las vías respiratorias conductoras, como el TLR4 que se expresa en los AT2; otros PRR como NLR (del inglés, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors*), Nod1 y Nod2 también se expresan en células epiteliales pulmonares, siendo estas señales esenciales para impulsar la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, el sistema inmunológico y la producción de quimiocinas y citocinas sirven de manera autocrino-paracrina para modular la expresión de genes que median la defensa innata e inmunodependiente, así como el crecimiento celular, crítico para la reparación del parénquima después de una lesión (Whitsett & Alenghat, 2014).

Los macrófagos alveolares representan aproximadamente el 95% de los leucocitos del espacio aéreo, del 1 a 4% lo ocupan los linfocitos y solo alrededor de 1% los neutrófilos, de modo que el macrófago alveolar es la célula fagocítica centinela del sistema inmunitario innato en los pulmones, su función principal es la eliminación de microbios y partículas inhaladas, así como la eliminación del surfactante pulmonar contribuyendo a la homeostasis, también ayudan a suprimir el desarrollo de respuestas inflamatorias e inmunes inapropiadas (Richies & Martin, 2018; Martin & Frevert, 2005).

Los granulocitos como neutrófilos y eosinófilos también participan en la inmunidad innata del pulmón, los eosinófilos se activan en respuesta a mediadores proinflamatorios (**Figura 3**) y migran a los pulmones donde liberan una serie de mediadores y proteínas granulares citotóxicas que causan daño e inflamación tisular; por su parte la migración de los neutrófilos depende de la integrina CD11b / CD18 en su superficie que reconoce al ligando ICAM-1 en la superficie endotelial, en el pulmón existen mecanismos dependientes de CD18 como independientes; una vez en los espacios aéreos los neutrófilos ingieren bacterias y hongos que han sido opsonizados por el complemento y las inmunoglobulinas que se acumulan en los espacios aéreos en los sitios de inflamación. Los neutrófilos tienen mecanismos efectores para matar bacterias y hongos, incluida la producción de oxidantes, proteínas microbicidas en gránulos azurófilos primarios y trampas extracelulares (Michaeloudes et al., 2020; Richies & Martin 2018).

Los monocitos tienen el potencial de migrar a tejidos inflamados y diferenciarse en macrófagos. Los monocitos reclutados tienen importantes actividades proinflamatorias y de defensa del

huésped, incluida la destrucción de microbios y la amplificación de la inflamación, pueden matar microbios con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Richies & Martin 2018)

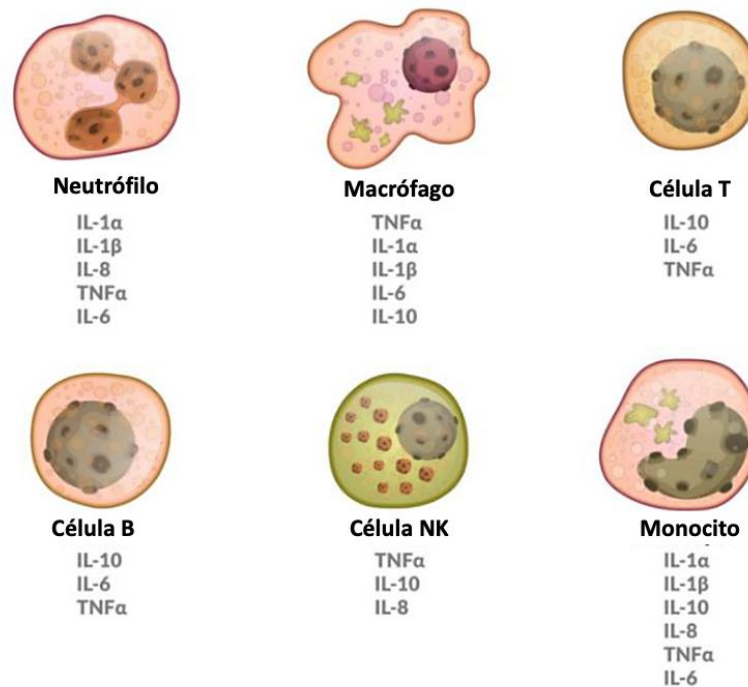


Figura 3. Expresión de citocinas en células inflamatorias. Representación esquemática de varias células inflamatorias y las diferentes citocinas que expresan. Los principales componentes de la inmunidad celular son los macrófagos, los monocitos, las células dendríticas, los neutrófilos, linfocitos T y B. Tomada y modificada de https://www.mdpi.com/ijms/ijms-20-06008/article_deploy/html/images/ijms-20-06008-g001.png

1.3 NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD

La neumonitis por hipersensibilidad (NH), también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una de las enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) más frecuentes, puede desarrollarse en personas de todas las edades, incluidos niños; la edad promedio al momento del diagnóstico es de 50 a 60 años. En general, se ha observado una distribución por sexos casi igual, pero existe variación según el tipo de NH y las condiciones de exposición, siendo la NH crónica más frecuente en varones. Es difícil estimar con precisión la incidencia y prevalencia debido al infradiagnóstico por ausencia de criterios de diagnóstico aceptados (Costabel et al., 2020). La NH se caracteriza por la exposición a un antígeno incitante inhalado que conduce a una reacción inmunológica del huésped que determina la inflamación intersticial y la distorsión de la arquitectura pulmonar (Leone, 2020).

1.4 CLASIFICACIÓN DE LA NH.

Históricamente, la NH se clasificó en tres categorías: aguda, subaguda y crónica; esta clasificación se basó tanto en el comportamiento de los síntomas como en el curso de la enfermedad. Mientras que una clasificación propuesta recientemente, con el objetivo de resolver algunos fenotipos compartidos entre la forma subaguda y crónica, reconoce solo dos categorías: la NH aguda / inflamatoria y la NH crónica / fibrótica (Leone, 2020).

En la NH aguda/inflamatoria los síntomas se presentan después de la exposición al antígeno y pueden tener una duración de <6 meses o <24 semanas, a menudo es reversible y se caracteriza por patrones radiológicos como opacidad en vidrio esmerilado predominante en lóbulos superior y medio, nódulos centrolobulillares poco definidos y patrones histopatológicos como infiltrados linfoplasmocíticos, mononucleares (macrófagos), linfocíticos centrados en las regiones peribronquiales, granulomas mal formados o sueltos, células gigantes multinucleadas, también se han descrito otros patrones morfológicos, incluida una inflamación intersticial relativamente homogénea y una fibrosis que se asemeja a la neumonía intersticial inespecífica o NSIP, (del inglés *Non-Specific Interstitial Pneumonia*) (Vasakova et al., 2017; Gaxiola et al., 2011); en el lavado broncoalveolar o BAL (del inglés, *BronchoAlveolar lavage*), se puede ver una marcada inflamación neutrofílica en los pulmones de los pacientes con NH en la fase aguda, inmediato a la inhalación de los antígenos. La IL-8 y la citosina CCL2 están significativamente elevadas en NH aguda (Inoue et al., 2019). En general, hay una mejoría espontánea después de evitar el antígeno, aunque algunos pacientes con episodios agudos recurrentes de pulmón de granjero pueden desarrollar una enfermedad pulmonar obstructiva con enfisema centrolobulillar en lugar de fibrosis (Selman et al., 2012).

La NH crónica es inducida por la exposición persistente y recurrente a un nivel bajo de antígenos, la duración de los síntomas suele ser mayor a 6 meses, donde hay un riesgo de progresión, estos pacientes evolucionan con frecuencia a fibrosis y finalmente mueren a causa de la enfermedad respiratoria. En el patrón radiográfico se puede observar fibrosis predominante en los lóbulos superior y medio, fibrosis peribronquioalveolar, panal de abeja, atenuación en mosaico, atrapamiento de aire y nódulos centrolobulillares; se caracteriza por patrones histopatológicos como una fibrosis NSIP y un patrón irregular de fibrosis periférica con distorsión de la arquitectura y focos de fibroblastos que se asemejan a la neumonía intersticial habitual o UIP, (del inglés *Usual Interstitial Pneumonia*) (**Figura 4**) (Vasakova et al., 2017; Gaxiola et al., 2011). Se observa una expresión elevada de IL-6, IL-8, IL-17 y CXCL2, FN- γ , IFN- γ -inducible 10 / CXC motivo ligando

10 (IP10 / CXCL10) y las citocinas Th1, estas últimas conocidos por contribuir a la formación de granulomas (Inoue et al., 2019).

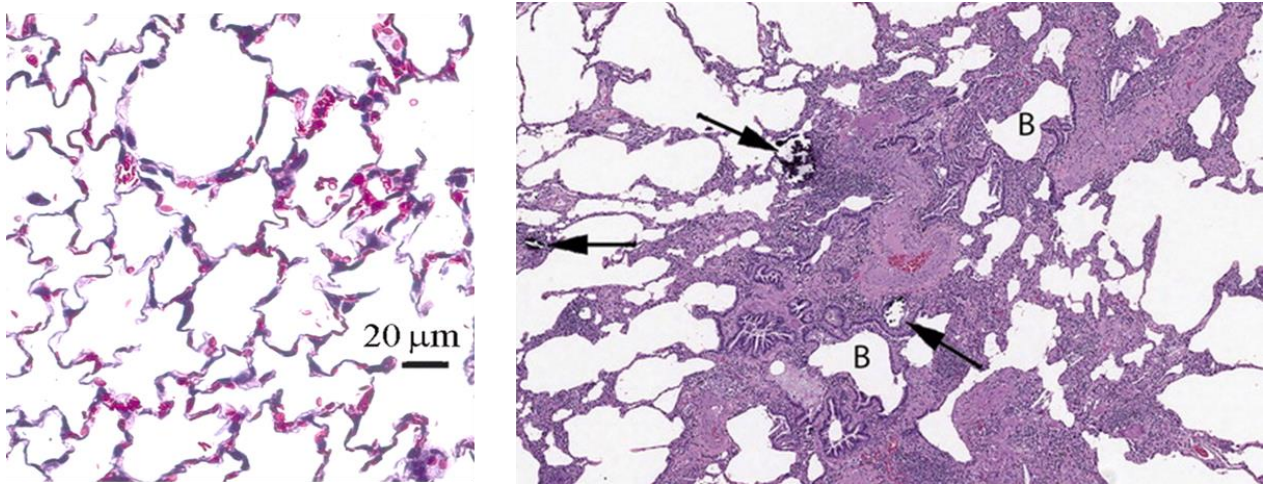


Figura 4. Histología comparativa de pulmón con NH. Comparación de la histología pulmonar de un individuo control (izquierda) y un individuo con NH (derecha). Tinción hematoxilina-eosina. Del lado derecho se muestra una biopsia pulmonar de un paciente con neumonitis fibrótica por hipersensibilidad, se observa una neumonía intersticial crónica, con células gigantes peribronquiales (flechas) que presentan cuerpos de Schaumann calcificados en su citoplasma, que son características de un posible diagnóstico de NH más certero. Figura tomada y modificada de: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.202005-2032ST> y <https://www.pnas.org/content/pnas/103/48/18278/F3.large.jpg>

1.5 AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA NH.

La exposición a factores ambientales o “inductores” en individuos predispuestos genéticamente converge en el desarrollo de la NH. La estructura molecular única y la forma característica de cada inductor influyen en una respuesta inmunitaria y, por tanto, también en el fenotipo clínico de la enfermedad. Se ha descrito más de 300 antígenos entre ellos una amplia variedad de partículas orgánicas lo suficientemente pequeñas como para alcanzar los alveolos (5 µm); los antígenos causantes incluyen hongos, bacterias, protozoarios, proteínas animales e insectos, compuestos químicos de bajo peso molecular y sustancias inorgánicas que se vuelven antigénicas después de unirse a proteínas humanas formando haptenos (Selman et al., 2012; Vasakova et al., 2019). La exposición a estos antígenos está relacionada con el trabajo del paciente, es decir que se trata de una enfermedad ocupacional, entre las más frecuentes se encuentran la enfermedad del criador de aves que es causado por proteínas animales de fuentes como el polvo de plumas de palomas y pericos, los excrementos y el suero de los animales; la enfermedad de granjero o agricultor que es causado por el actinomicete *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami* o *Wallemia sebi*, que se encuentran en la paja y heno; el pulmón del humidificador causada por actinomicetos termófilos y otras bacterias, mohos y

levaduras, por la exposición a humidificadores o acondicionadores de aire contaminados; recientemente se han identificado instrumentos de viento (pulmón del instrumentista de viento) como fuente de antígenos como *Ulocladium botrytis*, *Mycobacterium chelonae* y *Stenotrophomonas maltophilia* que pueden causar NH. Otras exposiciones ambientales como la posesión de pájaros, un jacuzzi interior, exposición a la ropa de cama rellena de plumas, aumentan significativamente la probabilidad de diagnóstico de NH en sujetos susceptibles (Leone, 2020; Selman et al., 2012; Morell et al., 2020; Costabel et al., 2020).

El cigarrillo tiene un papel dual, la NH parece afectar con mayor frecuencia a mujeres ancianas no fumadoras y en general es menos frecuente en fumadores que en no fumadores. También se han reportado varios casos en niños y adolescentes acostumbrados a “vapear”. El humo del cigarrillo parece tener un doble papel en la NH, por un lado parece proteger del desarrollo de la enfermedad, pero si hay antecedentes de tabaquismo positivo empeora el pronóstico (Leone, 2020). Los mecanismos por los que el humo del cigarrillo parece proteger de la NH no están claros, pero los enfoques experimentales atribuyen este efecto a la nicotina, molécula altamente lipofílica y por lo tanto tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y causar adicción. Este agonista nicotínico tiene algunos efectos inmunomoduladores y antifibróticos; inhibe la proliferación de linfocitos, a la IL-1 β , al TNF, la producción de IL-6 e IL-12 por macrófagos, la expresión de moléculas coestimuladoras como CD28 y CTLA-4 en células T y la proliferación de fibroblastos (Blanchet et al., 2004). La activación del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ reduce la secreción de varias citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, mientras que en los linfocitos disminuye la reactividad de los linajes Th1 y Th17, aumentando la respuesta Th2 (Nizri et al., 2009). Cuando la NH ocurre en los fumadores, éstos pueden desarrollar un curso clínico crónico con episodios más recurrentes y una tasa de supervivencia significativamente menor en comparación con los pacientes no fumadores (Selman et al., 2012).

La sintomatología de NH es inespecífica y se superpone con varias condiciones, caracterizándose por dificultad para respirar, empeoramiento agudo o leve, tos seca, malestar general, fatiga, pérdida de apetito, escalofríos, fiebre, etc. (Leone, 2020; Selman et al., 2012; Morell et al., 2020).

El primer paso para el tratamiento de la NH es evitar la exposición al antígeno causante, esto es eficaz principalmente en la fase temprana o aguda de la enfermedad. Otros pilares en el tratamiento son los inmunosupresores, corticosteroides y antifibróticos (Leone, 2020).

1.6 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA DE LOS INDIVIDUOS Y FACTORES AMBIENTALES.

Se ha sugerido la hipótesis de dos efectos en la etiología de la NH, en el que la susceptibilidad genética preexistente o los factores ambientales (es decir, el primer impacto) aumentan el riesgo de desarrollo de NH después de la exposición al antígeno (el segundo impacto). La exposición a antígenos actúa como factor inductor y los factores genéticos o ambientales actúan como factores de riesgo promotores (Selman et al., 2012).

La predisposición genética juega un papel importante ya que se encuentran involucrados alelos de diversos genes. Se ha demostrado que la susceptibilidad al desarrollo de NH se ve influenciada por el locus de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC (del inglés *Major Histocompatibility Complex*) (Vasakova et al., 2019). El MHC es una región de cuatro megabases (Mb) situada en el cromosoma 6 (6p21.3). En esta región se encuentran los genes MHC de clase I y II, los cuales codifican dos grupos de proteínas homólogas, con estructura diferente que participan en la presentación del antígeno. Las moléculas del MHC de clase I presentan los péptidos a los linfocitos T CD8+, y las moléculas de la clase II presentan los péptidos a los linfocitos T CD4+ (**Figura 5**). Son tres loci responsables de codificar las moléculas de la clase I del MHC, HLA-A, HLA-B y HLA-C y tres loci más de la clase II del HLA denominados HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Estos genes se caracterizan por su nivel de polimorfismos, es decir que tienen un alto grado de variación alélica en un locus genético, que da lugar a una gran variedad entre individuos que expresan alelos diferentes. En la población, el número total de alelos del HLA con diferentes secuencias de aminoácidos son alrededor de 5000, haciendo de este segmento el más polimórfico conocido en el genoma humano; estos aminoácidos determinan la especificidad de unión al péptido y el reconocimiento del antígeno por el linfocito T (Abbas et al., 2018; Gerald et al., 2021).

Se han encontrado polimorfismos en el MHC que aumentan la susceptibilidad a la NH, principalmente en el locus del MHC clase II, estos polimorfismos se han encontrado en diferentes grupos étnicos; se ha asociado un aumento de los alelos HLA-DR7 (Selman, et al., 1987), HLA-DRB1, HLA-DQB1 (Camarena et al., 2001) en pacientes con NH inducida por el antígeno aviar en mexicanos, por otra parte, en pacientes japoneses con NH provocada por *Trichosporon cutaneum* se ha observado un aumento en la frecuencia del alelo HLA-DQw3 (Ando, et al., 1989). También se ha encontrado un aumento en los haplotipos DRB1 * 1305-DQB1 * 0301 y una disminución de DRB1 * 0802-DQB1 * 0402 en pacientes con la enfermedad del criador de palomas o PBD (del inglés, **P**igeon **B**reeders **D**isease) (Camarena et al., 2001).

Se han identificado polimorfismos en los genes del transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP, por sus siglas en inglés de *Transporter associated with Antigen Processing*) asociados con un mayor riesgo de desarrollar NH. El complejo TAP es un heterodímero compuesto por TAP1 y TAP2; este complejo trasloca péptidos antigénicos del citosol al lumen del retículo endoplasmático (RE), donde se cargan en moléculas del MHC de clase I (**Figura 5**) (Aquino et al., 2008). Los polimorfismos en la secuencia de genes TAP resultan en sustituciones de aminoácidos que pueden aumentar la afinidad a antígenos intracelulares, pero también pueden provocar susceptibilidad a ciertas enfermedades, la presencia de Gly en lugar de Asp en la posición 637 ubicada dentro del dominio de unión de ATP de TAP1 podrían contribuir a la susceptibilidad de la enfermedad en la población mexicana (Aquino et al., 2008).

Se han asociado polimorfismos en los genes del proteosoma con la predisposición genética de la NH. El proteosoma es un complejo enzimático multimérico que degrada las proteínas en péptidos intracelulares para presentarse en la vía del MHC de clase I. Se sabe que el haplotipo PSMB9-RH / PSMB8 KQ se encuentra aumentado en pacientes con NH (Camarena et al., 2010).

También se han descrito polimorfismos en el gen de la mucina (MUC5B), en la antiproteasa (TIMP-3-915 TIMP-3-1296), y la longitud y mutaciones en los telómeros están relacionadas con la susceptibilidad de la enfermedad (Vasakova et al., 2019).

1.7 RESPUESTA INMUNE Y SU RELEVANCIA EN EL DESARROLLO DE NH.

En la respuesta inmune innata los PRR tienen dominios proteicos de reconocimiento a antígenos y se encuentran en las células presentadoras de antígeno (APC) y se clasifican, en TLR, NLR y dectinas miembros de la familia de receptores de lectina de tipo C (CLR del inglés, *C-type lectin family*), entre otros. Algunos de los PRR que contribuyen en la al reconocimiento de antígenos tras la inhalación son el TLR6 que forma un heterodímero con TLR2 y reconoce diacil lipopéptidos bacterianos y ácido lipoteicoico, TLR4 que se une y es activado por lipopolisacáridos (LPS), TLR2, que reconoce β -glicanos y zymosan de hongos, TLR9 reconoce ADN fúngico (Fong et al., 2010; Bhan et al., 2013; Higashino et al., 2016). La señalización a través de los PRR después conduce a la activación de células inmunes innatas y a la producción de citocinas como, IL-4, Interferón- γ (IFN- γ), IL-13 e IL-17, que contribuyen al desarrollo de NH frente a diferentes inductores (Vasakova et al.,2019).

Una vez que el antígeno es reconocido y fagocitado por APC (células dendríticas y macrófagos), es degradado en el proteosoma para expresarse en moléculas del complejo principal de

histocompatibilidad de clase I (MHC I) y poder ser presentados a los linfocitos CD8+ o ser degradados en el endosoma por la catepsina para expresarse en moléculas del MHC II y poder ser presentados a los linfocitos CD4+ (**Figura 5**). Las APC inducen la diferenciación de los linfocitos en una variedad de subgrupos efectores, principalmente a células TH1, impulsado por la expresión de IL-12, TNF e IFN γ . La progresión de la sensibilización a NH requiere de la acumulación de células CD4+ TH1 en el pulmón, creando un microambiente proinflamatorio (Costabel et al., 2020). El cambio a TH1 se ha asociado a la formación de granulomas, en un modelo de granulomatosis pulmonar en ratones, al inhibir receptores de quimioquinas Th1 se atenuó la formación de granulomas (Kishi et al., 2011), además, el IFN γ y TNF (citocinas secretadas por células TH1) promueven la acumulación, activación y agregación de macrófagos, resultando en el desarrollo de una inflamación granulomatosa (Costabel et al., 2020).

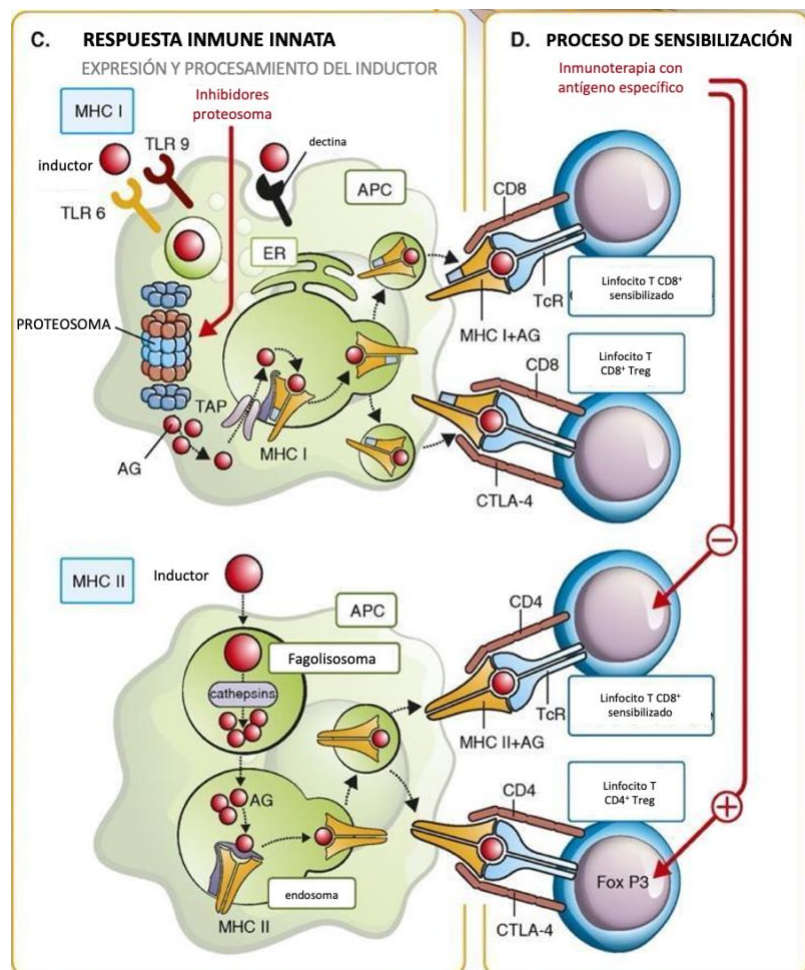


Figura 5. Respuesta inmunitaria innata. Se muestra el procesamiento del antígeno por moléculas del MHC de clase I y II, en el panel de arriba, el antígeno es reconocido por la dectina, una vez dentro es transportado al proteosoma donde será degradado en pequeños péptidos que son trasladados al lumen del retículo endoplásmico por el transportador TAP, y poder ser presentado a los linfocitos CD8 por moléculas del MHC de clase I. En el panel inferior el inductor es embebido en un fagolisosoma donde es degradado por la enzima catepsina, los péptidos resultantes son presentados a los linfocitos CD4 por moléculas del MHC de clase II (Tomada y modificada de Vasakova et al., 2019).

1.8 RESPUESTAS DE HIPERSENSIBILIDAD FRENTE AL ANTÍGENO

La hipersensibilidad se refiere a una mayor reactividad o mayor sensibilidad por parte del cuerpo del animal a un antígeno al que ha estado expuesto previamente. El término se usa a menudo como sinónimo de alergia, que describe un estado de reactividad alterada a un antígeno. Los trastornos de hipersensibilidad ocurren cuando la respuesta inmune es exagerada o inapropiada, lo que conduce al daño tisular (Momtazmanesh et al., 2020); las enfermedades por hipersensibilidad se clasifican de acuerdo con el tipo de respuesta inmunitaria y de mecanismos efectores responsables de las lesiones celular y tisular (Abbas et al., 2018).

La clasificación actual más ampliamente adoptada es la de Coombs y Gell que designa las reacciones de hipersensibilidad mediadas por inmunoglobulinas (inmediatas) como tipos I, II y III e hipersensibilidad mediada por células linfoides (tipo retardado) / inmunidad mediada por células como una reacción de tipo IV (**Figura 6**) (Momtazmanesh et al., 2020).

Tipo I: reacción mediada por anticuerpos IgE

Tipo II: reacción citotóxica mediada por anticuerpos IgG o IgM

Tipo III: reacción mediada por inmunocomplejos

Tipo IV: reacción retardada mediada por respuesta celular

Se cree que la NH se caracteriza principalmente por una inmunidad mediada por células T, principalmente por células Th1 (hipersensibilidad de tipo IV) este tipo de respuesta ocurre generalmente cuando el paciente se encuentra en una exposición constante y repetitiva con el antígeno inductor; sin embargo, la lesión pulmonar mediada por inmunocomplejos con anticuerpos IgG específicos (hipersensibilidad de tipo III) también puede participar (Vasakova et al., 2019).

La hipersensibilidad de tipo III ocurre cuando se producen en cantidades excesivas complejos antígeno-anticuerpo o no se eliminan eficientemente, esto ocasiona que se depositen en las paredes de los vasos sanguíneos y los tejidos. El depósito de estos inmunocomplejos activa la vía clásica del complemento que causa daño epitelial mediado por el complejo de ataque a membrana, ocasionando que los inmunocomplejos se filtren al tejido subyacente, agravando la activación del complemento, su acumulación lo que conduce a la producción de anafilotoxinas que son capaces de reclutar leucocitos y mastocitos que secretan citocinas y mediadores vasoactivos los cuales pueden provocar el depósito de más inmunocomplejos en las paredes vasculares, al aumentar la permeabilidad vascular y el flujo sanguíneo (Momtazmanesh et al., 2020; Abbas et al., 2018).

La NH es el resultado de una combinación de reacciones de hipersensibilidad mediadas por complejos inmunes (tipo III) y de tipo retardado (tipo IV) tras la exposición de una persona susceptible a un antígeno o sustancia química provocadora. La reacción dominante al principio y en la NH aguda o no fibrótica parece estar mediada por complejos inmunitarios. Con la exposición continua, la reacción predominante pasa a ser una reacción de hipersensibilidad retardada (tipo IV). La activación de células T por APC puede conducir a la inflamación mediada por citocinas o a la muerte celular directa, al estimular la diferenciación de los linfocitos CD4+ a subgrupos celulares, los linfocitos CD4+ son los mediadores de la inflamación, los subgrupos Th1 puede promover la activación de macrófagos por IFN- γ , reclutar monocitos por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), agravar la proliferación de Th1 por IL-2, activan fibroblastos y la angiogénesis por factores de crecimiento. El subgrupo de los Th17 recluta neutrófilos, los cuales junto con los macrófagos producen factores tóxicos como especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores inflamatorios, que provocan lesiones tisulares (Mak et al., 2014). Las células T citotóxicas CD8+ pueden causar la muerte directa de la célula, que puede llevar a una lesión tisular al matar células infectadas, aunque el virus o antígeno por si mismo no tenga efectos citopatológicos ya que los linfocitos CD8+ son incapaces de distinguir entre virus citopáticos y no citopáticos (Abbas et al., 2018), en el caso de la NH se caracteriza por una diferenciación de los linfocitos al subtipo de células Th1 por la estimulación de la IL-12 y el IFN γ , estimulando la formación de granulomas, este estado puede ser reversible, por el contrario, una respuesta Th2 predominante, conduce al mantenimiento de la inflamación y al desarrollo de fibrosis en etapas posteriores, pues las citosinas asociadas al fenotipo TH2, principalmente IL-4 e IIL-13, se han relacionado con el desarrollo de la fibrosis en enfermedades inflamatorias crónicas (Vasakova et al.,2019; Wynn, 2011), a demás de que la IL-13 parece inducir fibrosis estimulando la producción y activación de TGF β 1 y activando directamente la proliferación de fibroblastos (Firszt et al., 2014).

Las células B son reclutadas al sitio de inflamación, reconocen antígenos en moléculas de MHC y se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad.

Las células T reguladoras (Treg) son una población de células T CD4+ que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio entre los efectos dañinos para los tejidos y los efectos protectores de la respuesta inmunitaria, estas se diferencian por la expresión extracelular de CD25, la cadena α de alta afinidad del receptor de interleucina (IL) -2 (IL-2R α) y la expresión intracelular de FoxP (Girard et al., 2011). Se ha informado que la respuesta inmune a los antígenos causantes de NH puede estar modulado por las células Treg, al tener una función linfo-supresora en

sujetos asintomáticos, esta es capaz de atenuar la magnitud de la respuesta inmune de las células Th1 y Th2, generando tolerancia a los antígenos (Girard et al., 2011).

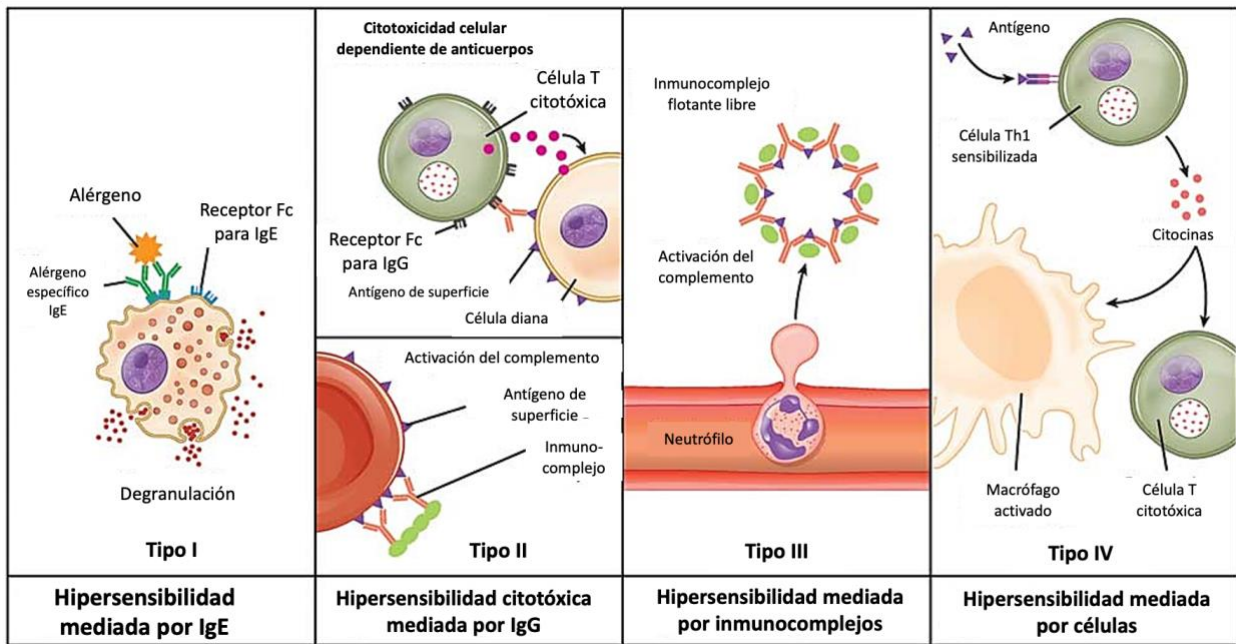


Figura 6. Representación esquemática de los cuatro tipos de hipersensibilidad. 1) Hipersensibilidad de tipo I: se caracteriza por una producción excesiva de IgE en respuesta a antígenos inofensivos, llamados alérgenos, los anticuerpos IgE se unen al receptor de inmunoglobulina E de alta afinidad (FcεRI) en la superficie de los mastocitos sensibilizándolos, en la siguiente exposición al alérgeno, este se entrecruza con moléculas de IgE unidas a FcεRI en los mastocitos lo que conduce a su activación y degranulación. 2) Hipersensibilidad de tipo II está mediada por la unión de IgG e IgM a antígenos endógenos o exógenos esta unión puede producir citotoxicidad mediada por el sistema del complemento provocando la muerte directa de la célula diana o, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); en la ADCC, las células NK o citotóxicas detectan los complejos antígeno-anticuerpo por las colas Fc del anticuerpo y se activan liberando compuestos citotóxicos como perforinas que provocan la muerte celular. 3) La Hipersensibilidad de tipo III está mediada por inmunocomplejos, producidos por el entrecruzamiento de pares de antígeno-anticuerpo, estos tienen la capacidad de activar la vía clásica del complemento, lo que resulta en un aumento en la permeabilidad vascular, permitiendo el ingreso de leucocitos al tejido. 4) Hipersensibilidad de tipo IV, está mediada por células T y macrófagos. Tiene dos mecanismos de acción, tras la activación de células T CD4+ por las APC pueden conducir a inflamación mediada por citocinas promoviendo la activación de macrófagos o causar muerte celular directa por células T citotóxicas. Tomada y modificada de: <https://www.thesciencenotes.com/wp-content/uploads/2020/07/Hypersensitivity-Type-I-Type-II-Type-III-Type-IV.jpg>

1.9 AUTOFAGIA

Parte del objeto de estudio de esta tesis fue evaluar si el proceso celular de la autofagia podría estar participando en el desarrollo de la enfermedad. A continuación se describe de forma general este proceso.

Las células eucariotas degradan sus componentes dañados u obsoletos principalmente por dos sistemas de degradación, la autofagia y el proteosoma. La autofagia es un proceso dependiente de lisosomas, esta vía de degradación y reciclaje permite eliminar grandes componentes como material extracelular, proteínas de membrana plasmática, agregados de proteínas e incluso

organelos completos a diferencia de la degradación proteosomal, la cual es selectiva, reconociendo generalmente sólo sustratos ubiquitinados, que son principalmente proteínas de vida corta (**Figura 7B**). La autofagia es un proceso celular altamente regulado, evolutivamente es activado en todos los eucariontes cuando hay un déficit de nutrientes, pero también puede ser desencadenado por una variedad de estímulos que incluyen señales de estrés como el estrés oxidativo, la inflamación, el estrés del retículo endoplásmico, el estrés metabólico, la presencia de patógenos y alteraciones de la función mitocondrial (Mizushima et al., 2011; Painter et al., 2020). Esta vía actúa como control de calidad metabólico, citoplasmático y proceso homeostático general, la autofagia es principalmente citoprotectora, protectora de tejidos y anti-inflamatoria y también puede estar asociada con muerte celular (Galluzzi et al., 2017).

La autofagia puede ser selectiva o no selectiva (macroautofagia). La primera se encarga de eliminar y reciclar por medio de enzimas lisosomales materiales agregados, dañinos o simplemente innecesarios para la célula, que involucran el reconocimiento de sustratos (y de acuerdo a éstos se han asignado distintos prefijos para clasificar a la autofagia); estos incluyen agregados de proteínas (agregofagia), mitocondrias dañadas (mitofagia), peroxisomas (pexofagia), porciones del núcleo (nucleofagia), exceso de ribosomas (ribofagia), retículo endoplasmático (reticulofagia) y endosomas, gotitas de lípidos (lipofagia) incluso patógenos intercelulares (xenofagia bacteriana/viral). Por su parte, la autofagia no selectiva se desencadena por inanición y es fundamental para mantener un suministro celular de lípidos, aminoácidos, carbohidratos y nucleótidos (Hurley et al., 2017).

Dependiendo de las vías para la entrega de la carga al lisosoma, la autofagia en células de mamíferos se puede subdividir en tres (**Figura 7**):

1) La microautofagia (**Figura 7iii**) internaliza directamente la carga en los lisosomas a través de invaginaciones directas en la membrana lisosomal. Un proceso similar también puede ocurrir a lo largo de la superficie de los endosomas tardíos, lo que lleva a la formación de cuerpos multivesiculares o MVB (del inglés, *Multivesicular Body*). Luego, los MVB se fusionan con lisosomas para degradar la carga. Esta última forma de autofagia se denomina microautofagia endosómica lisosomal (Liao et al., 2019)

2) La Autofagia mediada por chaperonas o CMA (del inglés *Chaperone-Mediated Autophagy*) (**Figura 7ii**) implica la entrega directa de proteínas citosólicas dirigidas a degradación directamente al lisosoma. Esta vía sólo degrada proteínas solubles que llevan un motivo similar a KFERQ unido

a HSPA8. Los sustratos de CMA unidos a la chaperona son traslocados al lumen del lisosoma a través de complejos LAMP2A (Galluzzi et al., 2017).

3) La macroautofagia (**Figura 8**) a menudo se define como autofagia celular, es el principal mecanismo catabólico utilizado por las células eucariotas para mantener la homeostasis de los nutrientes y el control de la calidad de los orgánulos. Se caracteriza por la formación de una estructura de doble membrana llamada fagóforo (o membrana de aislamiento), que se alarga para secuestrar el material citoplasmático antes de que se cierre para formar un autofagosoma. Está mediada por un conjunto de genes conservados evolutivamente, los genes ATG (del inglés *AuTophagy-related genes*) (Levine & Kroemer, 2019), cuya función es orquestar y mediar la formación del autofagosoma, que entregan el contenido citoplasmático al lisosoma para su degradación (Levine & Kroemer, 2019).

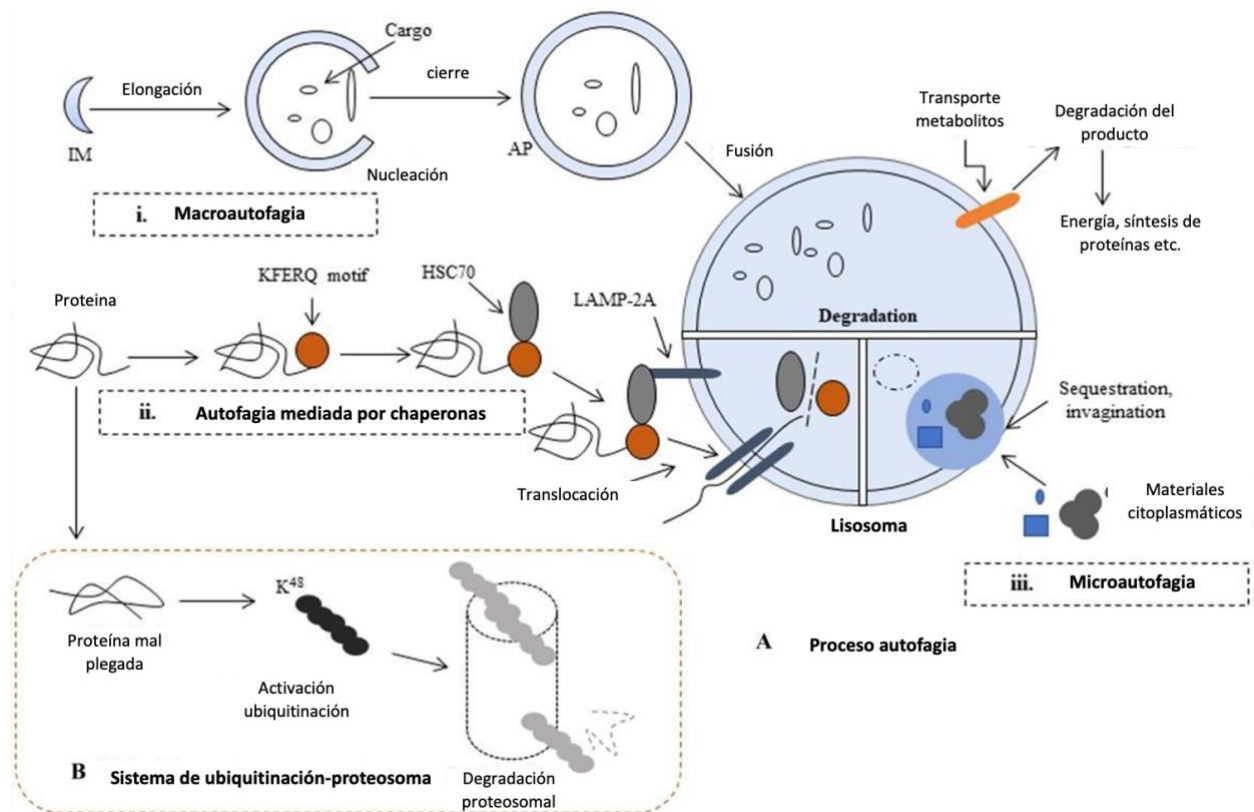


Figura 7. Representación esquemática de los 3 tipos de autofagia. i) Macroautofagia, donde la carga es envuelta en una vesícula de doble membrana que se fusionará con el lisosoma; ii) Autofagia mediada por chaperonas, donde la entrega al lisosoma es mediante chaperonas que se pueden unir al motivo KFERQ; iii) Microautofagia que internaliza directamente la carga en los lisosomas a través de invaginaciones directas en la membrana lisosomal. Tomada y modificada de: <https://nyaspubs-onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/10.1111/nyas.14305>

La autofagia incluye varias etapas secuenciales (**Figura 8**).

- i) inicio o nucleación
- ii) elongación

- iii) maduración del autofagosoma
- iv) fusión con el lisosoma (formación de autolisosoma)
- v) degradación del cargo o contenido por hidrolasas lisosomales y reciclaje de productos degradados (aminoácidos, nucleótidos, lípidos)

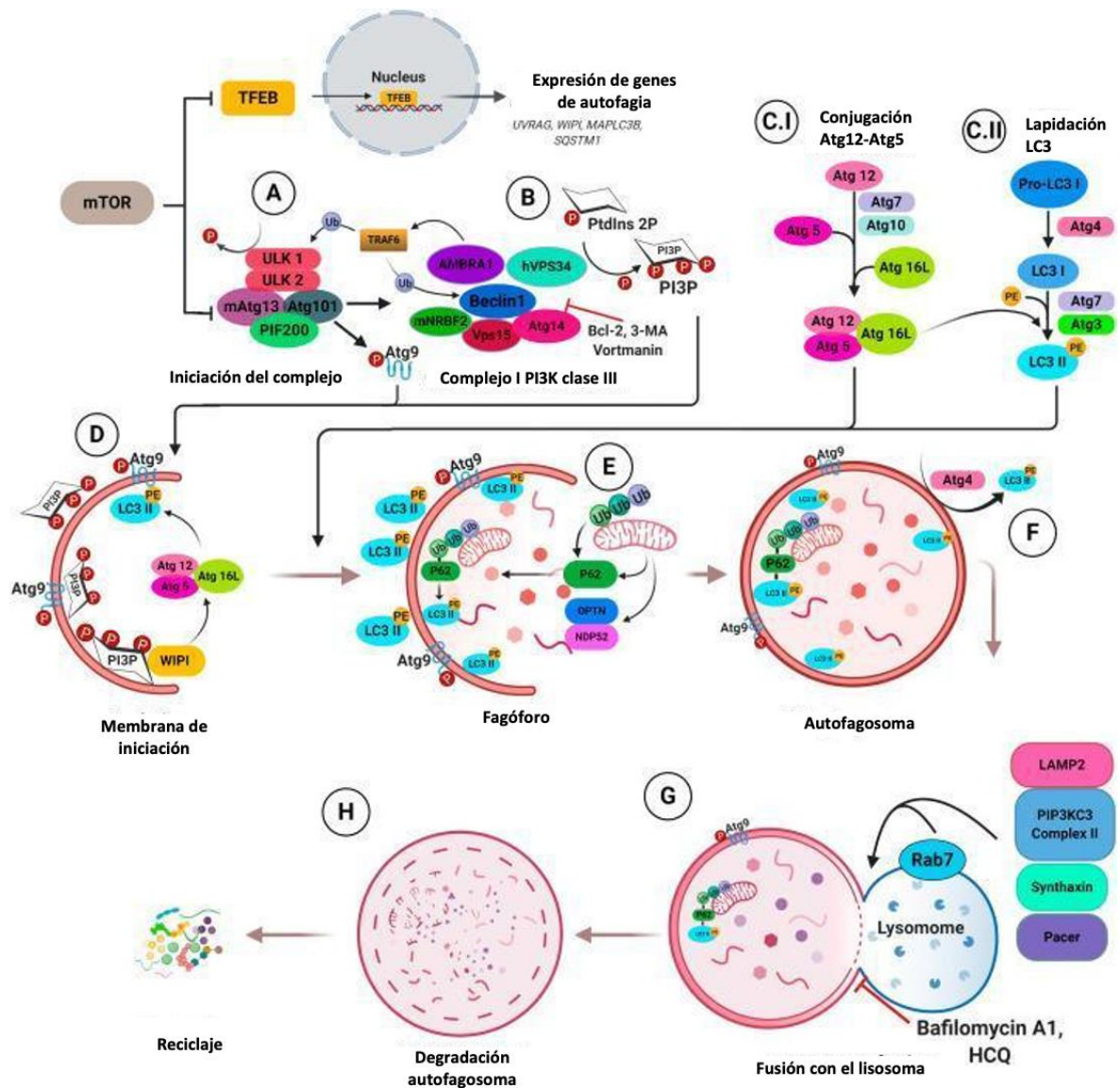


Figura 8. Resumen del proceso de autofagia. A. Cuando la célula se encuentra en condiciones de inanición, mTOR se inactiva provocando la translocación al núcleo de TFEB lo que desencadena la transcripción de genes de la maquinaria de la autofagia, simultáneamente ULK1 y AMBRA1 son activados. B. AMBRA1 activado interactúa con TRAF6 catalizando la ubiquitinación de ULK y Beclin. El resultado de la fosforilación de Beclin1 por ULK1 es la activación del complejo PI3K3C3 y con ello la generación de PtdIns3P por VPS34 activado en la superficie de la estructura de nucleación de autofagia, llamada membrana de aislamiento/omeganosoma. C. La biogénesis del autofagosoma implica dos sistemas de conjugación similar al sistema de ubiquitina ATG12 y LC3; C.I ATG12 es conjugado con ATG5 por las enzimas ATG7 y ATG10 para después unirse con ATG16L. C.II / D pro-LC3 es escindido por ATG4 para formar LC3-I, posteriormente se genera LC3-II en la superficie del fagóforo por la adición de fosfatidiletolamina (PE) a LC3-I por la acción del complejo ATH12-ATH5-ATG16L. E. p62 actúa como una proteína adaptadora que se une a dianas de autofagia poliubiquitinadas que las dirige al fagóforo por su interacción con LC3-II. F. El fagóforo se cierra dando origen al autofagosoma, que luego se fusionará G. con la membrana lisosomal en un proceso mediado por Rab7, LAMP-1/2, UVRAG, conduciendo a la liberación de hidrolasas ácidas H. que degradan la carga y se reciclan componentes que aumentan la disponibilidad de nutrientes para la célula. Tomada y modificada de: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118926>

1.10 ETAPAS DE LA AUTOFAGIA

1.10.1 Inicio o nucleación

La nucleación y formación del fagóforo es iniciada por la cinasa de serina y treonina ULK1 (del inglés *Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1*) ubicada dentro del complejo ULK1 junto con las subunidades no catalíticas FIP200, ATG13 y ATG101. El objetivo mecanicista de la rapamicina (mTOR) es un importante regulador de la autofagia, crecimiento y metabolismo celular, es una proteína cinasa de serina / treonina. Forma la subunidad catalítica de dos complejos de proteínas distintos; el Complejo mTOR 1 (mTORC1) y el Complejo mTOR 2 (mTORC2) (Schmeisser & Parker, 2019), mTORC1 participa en la regulación de la autofagia, al suprimir mediante la fosforilación inhibitoria en la Ser-757 y 637 de ULK1 y Ser-258 de ATG13. mTOR se inactiva durante los periodos de agotamiento de nutrientes (inanición) y/o agotamiento de energía al haber un incremento de AMP citosólico resultando en la activación de la proteína cinasa activada por AMP o AMPK, (del inglés, *Active Protein Kinase*) quien fosforila mTORC1 inactivándolo (Hurley et al., 2017; Galluzzi & Green, 2019), tras su inactivación ULK1 se activa, al autofosforilarse o ser fosforilado por AMPK, una vez activo, ULK1 fosforila a ATG13 y FIP200 conduciendo a la activación del complejo ULK (Sørensen et al., 2018; Lorzadeh et al., 2020).

ULK1 y ULK2 contienen un dominio C-terminal de unión a la membrana, llamado dominio de focalización de la autofagia temprana o EAT (del inglés, *Early Autophagy Targeting/tethering*), que permite que el complejo ULK sea reclutado en el sitio de formación del fagóforo (Hurley et al., 2017; Sørensen et al., 2018). Además, ATG13 tiene un grupo N-terminal de aminoácidos positivos que pueden interactuar con fosfolípidos ácidos y proporcionar unión a la membrana. Este dominio está involucrado en llevar el complejo ULK al RE justo al sitio de formación del fagóforo que ha sido marcado por ATG9 (Karanasios, et al., 2013). ULK1 parece ser reclutado en estructuras preexistentes que contienen VMP1 (del inglés, *Vacuole Membrane Protein 1*) proteína residente del RE (Sørensen et al., 2018).

En la nucleación del fagóforo (**Figura 9A**). Está involucrado el complejo Pi3K de clase III o PIK3C3 (del inglés, *Phosphatidylinositol 3-kinase*). Hay dos tipos de complejos de PIK3C3, PIK3C3-C1 y PIK3C3-C2, UVRAG es un componente del complejo II que se encarga de la maduración del autofagosoma, por otro lado, ATG14L forma parte del complejo I y participa en la formación del fagóforo al ser fosforilado en la serina 29 (Kim et al., 2018), ambos complejos están formados por AMBRA1, Beclin1, Vps15, Vps34. En condiciones libres de estrés, AMBRA1

estabiliza al complejo I de PI3KC3 en el citoesqueleto al interactuar con Beclin1, lo que provoca su bloqueo. AMBRA1 está regulado por la fosforilación inhibitoria mediada por mTOR en la Ser-57. Cuando se inactiva mTOR, se elimina la fosforilación de AMBRA1 en Ser-57. Esto conduce a la interacción de AMBRA1 con el factor 6 asociado al receptor de necrosis tumoral (TRAF6), una ligasa E3 involucrada en las respuestas inflamatorias que promueve la ubiquitinación de ULK1 en Lys 63, facilitando la actividad de las quinas del complejo ULK, cataliza la ubiquitinación ligada a Lys 63 en Beclin1 para promover la iniciación de la autofagia (Lorzadeh et al., 2020).

ULK1 fosforila a Beclin1 induciendo la activación de PIK3C3, el cual es reclutado al RE a través de ATG14L lo que desencadena la fosforilación del fosfatidilinositol en la posición 3 del inositol por Vps34 dando como resultado PtdIns3P (Yu et al., 2015; Liao et al., 2019) formando dominios o estructuras del RE ricas de este compuesto llamado omegasomas (Yu et al., 2017; Sørensen et al., 2018).

Los omegasomas son estructuras de membrana en forma de copa de las que parecen surgir los fagoforos, estas estructuras están en contacto con el retículo endoplásmico, donde se recluta la maquinaria central restante, proporcionan un sitio de unión para proteínas de unión a PtdIns3P como FYVE 1, DFCP1 y WIPI.

ATG9, la única proteína de autofagia transmembrana. Atg9 se localiza en la red trans-Golgi y en los endosomas tardíos; puede localizarse en el sitio de formación del autofagosoma. Además, ATG9 es un objetivo de ULK1 y se cree que su fosforilación está involucrada en las primeras etapas de la formación del autofagosoma que conduce a su expansión (Coutts & La Thangue, 2016). En el omegasoma también se recluta a los dos sistemas de conjugación, dando inicio a la siguiente etapa.

1.10.2 Elongación

La biogénesis del autofagosoma implica dos sistemas de conjugación similar al sistema de ubiquitina y son conocidos como sistemas de conjugación ATG12 y LC3 (**Figura 9B**). En el primer sistema de conjugación ATG12 se conjuga covalentemente a ATG5, mediante una serie de reacciones similares a la ubiquitinación, esto involucra a la proteína ATG7 que actúa como una enzima activadora de ubiquitina E1, activa a ATG12 de una manera dependiente de ATP al unirse a su residuo de glicina C-terminal, posteriormente ATG12 se transfiere a ATG10, una proteína portadora de ubiquitina similar a E2 que potencia el enlace covalente de ATG12 a la lisina 130 de ATG5, formando el complejo ATG5-ATG12 (Glick et al., 2010). El complejo ATG12-ATG5 se une de forma no covalente a ATG16L para formar un complejo de unión trimérico, ATG15-ATG5-

ATG16L el cual se recluta al sitio de inicio del fagóforo a través de la interacción de ATG16L1 con WIPI2 (Dikic & Elazar, 2018). Este complejo se asocia con el fagóforo extensor y es esencial para definir el sitio del reclutamiento de LC3B-II procesado induciendo la curvatura del fagóforo. La conjugación de ATG5-Atg12 es independiente de la activación de la autofagia.

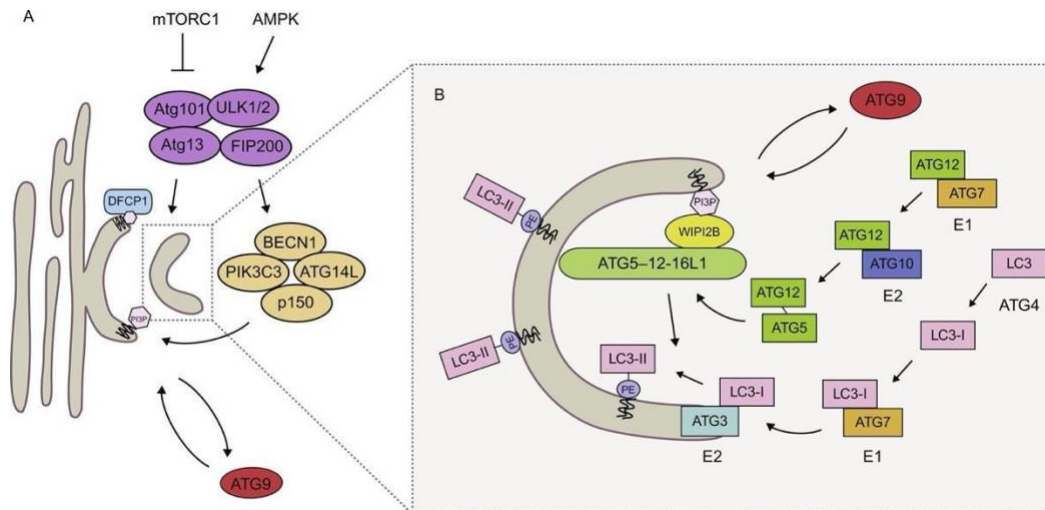


Figura 9. Nucleación y elongación del fagóforo en mamíferos. A. La autofagia se desencadena tras la activación del complejo ULK (ULK1, FIP200, ATG13 y ATG101) regulado por mTOR y AMPK, una vez activado es reclutado al retículo endoplasmático en donde ULK1 activa a PI3KC3 por la fosforilación a Beclin1, este complejo cataliza la formación de PtdIns3P formando los omegasomas marcados por proteínas de unión a PtdIns3P (DFCP1 y WIPI). B. La biogénesis del autofagosoma implica dos sistemas de conjugación similar al sistema de ubiquitina y son conocidos como sistemas de conjugación ATG12 y LC3. ATG12 se conjuga con ATG5 mediante la enzima ATG7 similar a E1 y ATG10 similar a E2, el resultado (ATG12-ATG5) se une a ATG16L, resultando en un conjunto dimérico unido a la membrana del fagóforo (ATG12-ATG5-ATG16L). La pro-LC3 es escindida por ATG4 produciendo LC3-I que es activado por ATG7 y transferido a la enzima ATG3 similar a E2, finalmente el sistema de conjugación ATG12-ATG5-ATG16L facilita la conjugación de LC3-I a PE formando LC-II unido a la membrana interna y externa del fagóforo. Tomado de: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.001>

En el segundo sistema de conjugación, es el procesamiento de la proteína de cadena ligera 3 B (LC3B del inglés, *Light Chain 3*) la proteasa ATG4B procesa a la proteína pro-LC3B para exponer un residuo de glicina en su extremo carboxilo terminal; este corte genera a la forma LC3B-I, que entonces es activada por ATG7 y conjugada con ATG3 una proteína portadora de tipo E2. El complejo ATG3-LC3B-I se une al complejo trimérico de ATG12-ATG5-ATG16L y la glicina expuesta se conjuga luego con fosfatidiletanolamina (PE) generando la forma LC3B-II. La conjugación de LC3B-I a PE promueve la expansión del fagóforo. La síntesis y procesamiento de LC3 aumentan durante la autofagia, además de que LC3B-II permanece unido hasta que se recicla durante la degradación lisosomal, características que lo convierten en un marcador clave de autofagia (Coutts & La Thangue, 2016).

La membrana del fagóforo necesita expandirse y alargarse para formar un autofosoma completo, esta expansión implica la entrada de vesículas de membrana de varias fuentes, se ha sugerido que los sitios de salida del retículo endoplásmico (ERES), las mitocondrias, los sitios de contacto RE-mitocondrias, el compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC), el aparato de Golgi y la membrana plasmática proveen de lípidos a la membrana en crecimiento del fagóforo en las células de mamíferos, pero el mecanismo exacto que media en este proceso sigue siendo ambiguo (Wei et al., 2018).

1.10.3 Maduración del autofosoma

LC3B-II al tener un componente lipídico, se incorpora tanto a la membrana externa como a la interna del autofosoma, lo que lleva al alargamiento y maduración de éste. LC3B-II interactúa directamente con el receptor SQSTM1 / p62 (Sequestosome-1). Este participa en la autofagia selectiva reconociendo y clasificando la carga citosólica, tiene ocho dominios, el dominio phox y bem1p en los residuos 6-88; Dominio de dedos de zinc (residuos 122-167); Dominio de unión a TRAF6; señal de localización nuclear o NLS (del inglés *Nuclear Localization Signal*); señal de exportación nuclear o NES (del inglés *Nuclear Export Signal*); región de interacción con LC3 o LIR (del inglés *LC3 Interaction Region*), región de interacción KEAP1 o KIR (del inglés, *KEAP1 Interaction Region*) y dominio asociado a ubiquitina o UBA (del inglés *Ubiquitin-Associated Domain*) en sus residuos 391-346 (Cao et al., 2021). p62 tiene la capacidad de unirse a proteínas ubiquitinadas a través de su dominio UBA seguido de la interacción con LC3 a través de su dominio LIR lo que la hace una proteína adaptadora entre el cargo y LC3B-II, promoviendo la elongación del autofosoma alrededor de la carga ubiquitinada. La ubiquitinación es una modificación postraduccional que juega un papel esencial en el reconocimiento del sustrato y la degradación de proteínas tanto por el proteosoma como por la autofagia selectiva. Este sistema de marcado de ubiquitina utiliza una serie de reacciones enzimáticas que involucran la enzima activadora de ubiquitina E1, la enzima conjugadora de ubiquitina E2 y la proteína ligasa de ubiquitina E3. La ubiquitina tiene siete residuos de lisina internos (K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63) que son utilizados para conjugar proteínas como monómeros o como cadenas de poliubiquitina. Los residuos unidos a K48 se han identificado como señales que dirigen los péptidos al proteosoma; mientras que las cadenas de mono o poliubiquitinación unidas a K27 y K63 son reconocidas por p62 y otras proteínas como NBR1, TAX1BP1, NDP52, OPTN, TRIM y TOLLIP para su incorporación al fagóforo y posterior degradación (Jeong et al., 2019).

p62 además de reconocer agregados de proteínas, mitocondrias dañadas, peroxisomas marcados con ubiquitina, bacterias ubiquitinadas, proteínas ribosómicas, proteínas de la cápside del virus entre otros (Mizushima et al., 2011), también funciona como un centro de señalización que puede determinar si las células sobreviven activando la vía del factor 6 asociado al receptor TNF (TRAF6) y con esto la activación de NF- κ B o muere al facilitar la agregación de caspasa-8 y caspasas efectoras. También puede interactuar con el sitio de unión a Nrf2 en Keap1, estabilizando a Nrf2 y activando la transcripción de sus genes dianas (Mizushima et al., 2011).

Durante el cierre del autofagosoma, las membranas interna y externa deben sufrir fisión y fusión para formar la vesícula de doble membrana; antes del cierre las proteínas ATG unidas a la membrana externa del autofagosoma se eliminan gradualmente por un cambio en la composición lipídica en la membrana, para dar paso a la maquinaria responsable de la fusión con el lisosoma (Dikic & Elazar, 2018). LC3 y p62 permanecen unidas hasta que se degradan en el autolisosoma. La maquinaria de ESCRT (del inglés, *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) juega un papel directo en el cierre del autofagosoma durante la macroautofagia selectiva como durante la inanición. ESCRT media varios eventos de escisión de membrana dentro de las células, consta de 4 subcomplejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II y ESCRT-III, este último regulado por la ATPasa VPS4. La subunidad ESCRT-III se ha localizado de forma transitoria en el autofagosoma en formación (Zhen et al., 2020).

1.10.4 Fusión con el lisosoma y formación de autolisosoma

Una vez el autofagosoma maduró, éste se dirige hacia los lisosomas al área perinuclear para su fusión, degradación y el reciclaje de los distintos componentes. El hambre provoca un aumento en el pH intracelular, lo que induce la relocalización del lisosoma en al área perinuclear, por otro lado el autofagosoma es transportado por microtúbulos (Yu et al., 2017). RAB7 es miembro de la familia RAB de GTPasas, pueden unirse de forma reversible a las membranas y unirse a los nucleótidos guanosina-5'-di- (GDP) o -trifosfato (GTP), esta proteína une los autofagosomas a los microtúbulos, para lograr su migración al extremo positivo, Rab7 unida a la membrana de los autofagosomas interactúa con la kinesina mediante la unión a FYCO1 (del inglés, *FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1*), en caso de que el autofagosoma deba moverse al extremo negativo, Rab7 interactúa con la dineína mediante la unión de RILP (del inglés, *Rab-interacting Lysosomal Protein*) (**Figura 10**) (Hikita et al., 2018). Se ha informado que en la autofagia selectiva de proteínas agregadas, la remodelación de actina que involucra a la desacetilasa de histonas 6

(HDAC6) es otro movimiento de autofagosomas a lisosomas que es independiente de microtúbulos (Lee et al., 2010).

La membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana del lisosoma para formar un autolisosoma de membrana única. Este fenómeno ocurre en concierto con la proteína de membrana lisosomal 1/2 (LAMP-1/2), GTPasas, PI3KC3-CII, HOPS, proteínas SNARE como STX17 entre otras proteínas potenciadoras de la autofagia (Lorzadeh et al., 2020).

Las proteínas GTPasa, RAB reclutan proteínas efectoras específicas, como adaptadores de carga para formar vesículas de transporte, así como proteínas de unión para ayudar a la maquinaria de fusión cuando la carga vesicular llega a su destino. Cada proteína RAB se localiza en un compartimento de membrana específico y esto ayuda a dar especificidad al tráfico vesicular. Se ha informado que RAB7 forma un complejo con PLEKHM1 (del inglés, *Pleckstrin homology and RUN domain-containing protein M1*) y HOPS esencial para la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Hikita et al., 2018). PLEKHM1 está implicado en la fusión mediante la formación de complejos con RAB7, HOPS y LC3 en endosomas y lisosomas tardíos (Lorzadeh et al., 2020). UVRAG, un componente del complejo II de PI3C3 regulado por mTOR que está involucrado en la maduración y fusión del autofagosoma-lisosoma a través de RAB7. UVRAG se une a VPS16, una subunidad de las 6 (núcleo de clase C: Vps 11, Vps 16, Vps 28, Vps 33A y las dos subunidades de unión a Rab7: Vps41 y Vps39) que componen a HOPS dando como resultado la estimulación de la actividad de GTPasa de Rub7 y la fusión del autofagosoma-lisosoma (Nakamura & Yoshimori 2017).

Las proteínas SNARE son esenciales para la fusión de la membrana externa del autofagosoma con la membrana del lisosoma, durante este proceso la STX17 (syntaxin 17), una proteína SNARE, en los autofagosomas forma un complejo con VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8), otra proteína SNARE, en los lisosomas y con SNAP29 (synaptosomal-associated protein 29) en el citoplasma. La subunidad Vps33A de HOPS promueve el ensamblaje y cierre del complejo SNARE evitando que se desmonte.

Se ha encontrado que los PI(3)P, PI(3,5)P₂, PI(4)P y PI(4,5)P₂ pueden estar implicados en la fusión autofagosoma-lisosoma, pero aun se sabe poco sobre la composición lipídica de las membranas autofagosomicas (Lőrincz & Juhász, 2020)

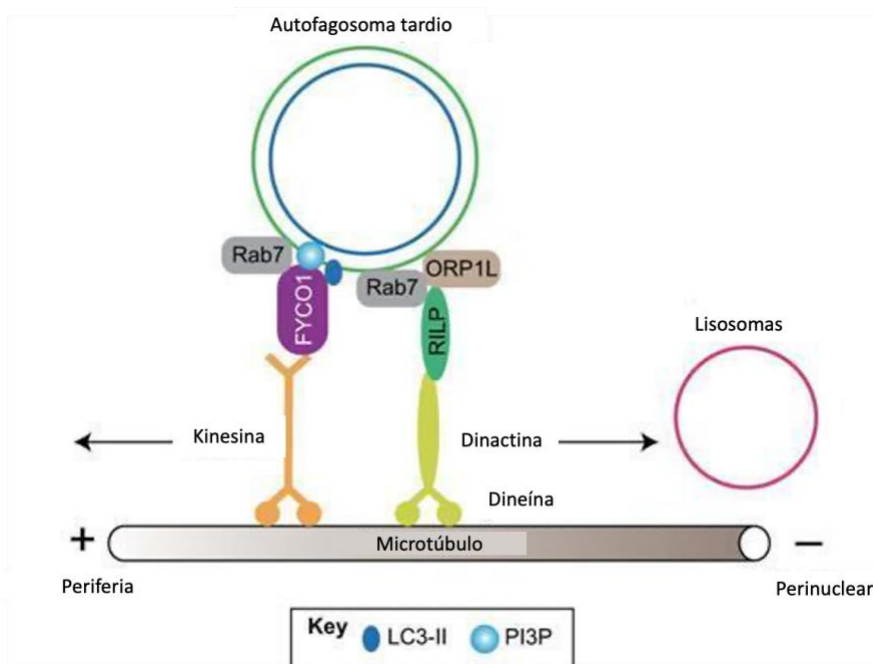


Figura 10. Fusión del autofagosoma con el lisosoma. La GTPasa Rab7 une a los autofagosomas a la kinesina a través de FYCO1 o a la dineína a través de RILP y ORP1L para facilitar el movimiento hacia la región perinuclear y el encuentro con el lisosoma. Tomada y modificada de: <https://doi.org/10.1242/jcs.196352>

1.10.5 Degradación del cargo y reciclaje de productos degradados

La fusión se completa mediante la degradación de la membrana autofagosómica interna por las hidrolasas lisosómicas y la exposición del contenido del autofagosoma a la luz del lisosoma (Yu et al., 2017), logrando el comienzo del proceso de degradación de la carga autofagosómica.

Los componentes de degradación de las biomoléculas degradadas como aminoácidos y azúcares son devueltos al citoplasma a través de transportadores de salida del lisosoma, provocando un aumento local en la disponibilidad de nutrientes para la obtención de energía y la síntesis de nuevas biomoléculas. Estos fenómenos conducen a la reactivación de la vía de señalización de mTORC1 y la regeneración de lisosomas maduros a partir de autolisosomas es un proceso de remodelación dinámico conocido como regeneración de lisosomas autofágicos (ALR, autophagic lysosome regeneration).

1.11 AUTOFAGIA Y SU ASOCIACIÓN CON NH.

La autofagia influye en el desarrollo, la homeostasis y la supervivencia de las células inflamatorias, incluidos los macrófagos, los neutrófilos y los linfocitos, que desempeñan funciones fundamentales en el desarrollo y la patogenia de los procesos inflamatorios. Además, hay pruebas contundentes que han demostrado que la autofagia es fundamental en la regulación de los procesos inflamatorios y en las respuestas inmunes adaptativas en el sistema respiratorio a través de la regulación de la

presentación de antígenos y el desarrollo de linfocitos, actividades del inflamasoma, eliminación directa de patógenos invasores y modulación de la secreción y señalización de citocinas, entre otros (Deretic, 2018). Adicionalmente estudios recientes han asociado a la autofagia con el desarrollo de distintas enfermedades pulmonares como asma, cáncer pulmonar, EPOC y fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

Dado que la autofagia tiene un papel crítico tanto en la respuesta inflamatoria como en la homeostasis pulmonar, recientemente Cabrera et al., 2020 evaluaron si había una alteración en la expresión de algunos marcadores de la vía de la autofagia en el pulmón de pacientes con NH, por lo que actualmente la relación de la autofagia con el desarrollo de NH es una línea de investigación de su grupo. En este estudio se evaluó por western blot los niveles de expresión y por inmunohistoquímica la localización de las proteínas LC3B, p62, ATG5, ATG4B y ATG7 en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH y clasificados como agudos y como crónicos (con evidencia de fibrosis pulmonar), así como en individuos control.

En este estudio, detectaron un nivel de expresión basal de todos los marcadores de autofagia en extractos de pulmón de sujetos de control, probablemente porque la autofagia es un mecanismo constitutivo, sin embargo en el extracto de tejido proveniente de biopsias de pacientes con NH, se observó un aumento significativo en el nivel de LC3B, p62, ATG4B y ATG7. Por inmunohistoquímica, se observó una fuerte tinción positiva de las proteínas LC3B, p62, ATG4B y ATG7 en las células epiteliales bronquiales y alveolares de los tejidos de pacientes con NH aguda y crónica. También se observó señal positiva de LC3B, p62, ATG4B, ATG5 y ATG7 en macrófagos tanto alveolares como intersticiales y neutrófilos positivos para LC3B y p62. Por lo tanto, los autores sugieren que la expresión de proteínas de autofagia aumenta en las células epiteliales e inflamatorias de los pulmones de pacientes con NH probablemente después de la exposición a antígenos orgánicos o inorgánicos. Sin embargo, este trabajo inicial fue descriptivo y los autores discuten que estos hallazgos no necesariamente indican niveles altos de autofagia activa; sino, podría reflejar una autofagia defectuosa y una acumulación de autofagosomas durante la patogénesis de NH, o la autofagia podría estar involucrada con la muerte de células epiteliales. Dada la heterogeneidad en los pacientes diagnosticados con NH (tipo de antígeno inhalado, edad del paciente, etapa de evolución de la enfermedad) y el problema que implica poder hacer asociaciones o correlaciones, se planteó para este proyecto evaluar la expresión de LC3B y p62 en un modelo animal de NH desarrollado en ratón (*Mus musculus*), que permitiera controlar las variables antígeno, carga antigénica y período de evolución de la enfermedad.

1.12 MODELOS ANIMALES DE NH EN RATÓN.

Se han utilizado varias especies de animales para evaluar los efectos de sustancias que se sabe que causan NH en humano, entre ellos están incluidos los ratones, cobayos, conejos, terneros y primates; gran parte de los trabajos publicados han utilizado *Saccharopolyspora rectivirgula* como antígeno, el agente causante de la enfermedad pulmonar del agricultor o granjero FLD (del inglés *Farmer's Lung Disease*) un tipo común de NH ocupacional, que es desencadenada por la inhalación de antígenos de microorganismos presentes en condiciones de alta humedad como en el heno, la paja y el polvo de granos almacenados en los patios y bodegas agrícolas (Burleson et al., 2018; Nogueira et al., 2019). *Saccharopolyspora rectivirgula*, (**Figura 11**) también llamada *Mucropolyspora faeni* es un actinomiceto termofílico grampositivo aerobio y filamentoso con esporas resistentes a la desecación, el micelio del sustrato tiene un tamaño entre 0.5 y 0.8 μm , el micelio aéreo entre 0.8 y 1.2 μm y las esporas entre 0.7 y 1.5 μm de diámetro, sus proteínas no glicosiladas, así como la cadena lateral de carbohidratos de las glucoproteínas actúan como determinantes antigénicos en este tipo de NH ocupacional (Schäfer et al., 2011; Madigan et al., 2015; Mundt et al., 1996).

El modelo experimental más común para NH implica la administración intratraqueal o intranasal repetida del antígeno *S. rectivirgula* (SR-Ag) en ratones C57BL / 6 (Joshi et al., 2009), el modelo desarrolla infiltrados mononucleares con una distribución peribroncovascular al igual que la enfermedad humana (Ishizuka et al., 2015), lesiones granulomatosas peribronquiales y perivasculares linfocíticas. El líquido de lavado broncoalveolar (BALF) de ratones tratados con SR-Ag revela grandes cantidades de neutrófilos; hay una inducción de citocinas proinflamatorias que incluye a TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN γ , IL-17 poco después de la exposición al antígeno (Andrews et al., 2015). A medida que aumenta el tiempo después de la exposición al antígeno, la alveolitis se vuelve más linfocítica con un aumento de las células T CD8 + y CD4 +.

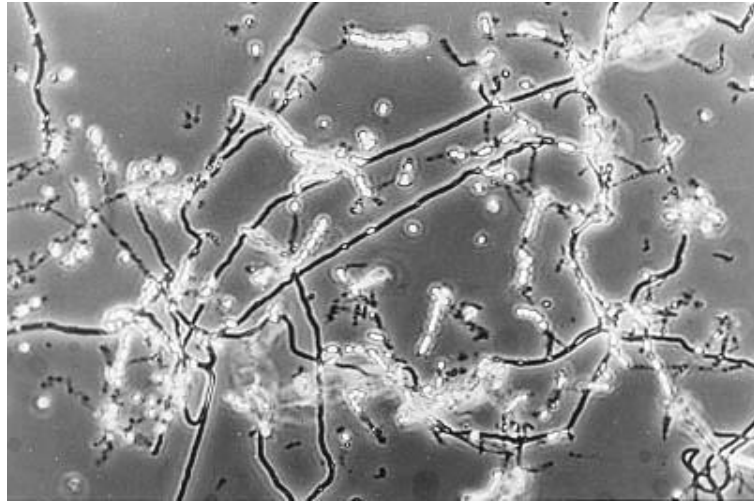


Figura 11. *Saccharopolyspora rectivirgula*. Bacteria grampositiva, que presenta filamentos largos y ramificados, de 1-2 μm . Crecen a 50-55 $^{\circ}\text{C}$, produciendo cadenas de esporas cortas sobre el sustrato y las hifas aéreas. Se pueden observar almohadillas interesporas características entre las esporas. Tomada de: http://www.actino.jp/DigitalAtlas1/section_3/pics_s3/3-12A.jpg

La utilización de estos modelos ha permitido ampliar el conocimiento de la enfermedad, en su estado agudo/inflamatorio y crónico/fibrótico. Generalmente el modelo murino crónico más común implica la instilación intratraqueal del SR-Ag 3 días consecutivos a la semana durante tres semanas (21 días), mientras que para el modelo agudo los ratones son desafiados con SR-Ag por tres días consecutivos y se sacrifican 24 h después de la última exposición (Bernatchez et al, 2017).

Otros antígenos son ampliamente usados para el estudio de la NH, como el extracto de paloma o PDE (del inglés *Pigeon Dropping Extracts*), en un estudio realizado para investigar las funciones de la IL-17A y los neutrófilos en la inflamación formadora de granulomas en la NH aguda, se realizó un modelo de NH aguda en ratones a los que se les inyectó de forma intraperitoneal PDE, luego se expusieron a PDE durante 4 días, al sacrificio la histología reveló que la exposición a PDE se asoció con la infiltración marcada de células inflamatorias en las áreas peribronquiolar y perivascular. También se observaron granulomas compuestos de linfocitos, macrófagos y granulocitos en las áreas peribronquiales y perivasculares y se observaron muchos granulocitos segmentados en las áreas perivasculares, en particular, cuando se neutralizó a la IL-17, se atenuó la formación de granulomas y el reclutamiento de neutrófilos, así como la expresión de quimiocinas, sugiriendo que la IL-17A y los neutrófilos son clave en la formación de granulomas en la NH aguda (Ishizuka, et al., 2015).

También se han propuestos otros modelos murinos, con el agente causal *Mycobacterium immunogenum*, una micobacteria que se ha asociado con brotes de NH en trabajadores de fábricas expuestos a aerosoles de fluidos de metales contaminados. Tras la aspiración orofaríngea de los

extractos o células viables por tres días consecutivos 1 vez al día para un total de tres instilaciones. La exposición dio como resultado respuestas robustas y tempranas de IL-6 y TNF α pero niveles bajos de IFN γ (según el tipo de dosis) en el pulmón del ratón, en el BALF y la histología mostraron que el tipo de célula infiltrante predominante eran los neutrófilos, mientras la inflamación granulomatosa alcanzó su punto máximo entre las 8 y 24 h posteriores a la exposición y se resolvió a las 96 h, esta respuesta son consistente con eventos asociados con formas humanas agudas de HP (Johansson et al., 2017).

Se ha considerado ampliamente que la NH ocurre con predominio de células Th1; sin embargo, el papel del equilibrio Th1 / Th2 aún no es claro. Jiménez- Álvarez L, et al., 2010 trataron a ratones de las cepas C57BL/6 (con sesgo Th1), BALB/C WT (con sesgo Th2) y BALB/C Stat6^{-/-} (deficiente en Th2) con *Saccharopolyspora rectivirgula* (SR) o solución salina durante 3 semanas, y los sacrificaron 1 y 4 días (respuesta temprana y tardía) después de la última administración. Encontraron que los ratones C57BL/6 mostraron un aumento significativo en la extensión del daño pulmonar cuando se sacrificaron a los 4 días en comparación con los ratones sacrificados 1 día después de la última administración de SR. Por el contrario, los ratones BALB/C WT mostraron una disminución progresiva en la extensión del daño pulmonar y reportaron un aumento significativo células NK CD4 + en ratones C57BL / 6. Los ratones Stat6^{-/-} se comportaron de manera similar a los ratones C57BL / 6, mostrando un aumento progresivo en la extensión del daño pulmonar y un aumento significativo en los niveles de citocinas Th1, por lo tanto los autores confirman un papel predominante de la respuesta Th1 en NH (Jiménez- Álvarez L, 2010).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha mencionado, la autofagia desempeña un papel fundamental en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunitaria. Dado que el desarrollo de la NH es resultado de reacciones inmunes exacerbadas en individuos susceptibles frente a la exposición continua a diversos antígenos inhalados, el objetivo de esta tesis es evaluar si ocurren cambios en la expresión de los biomarcadores de autofagia LC3 y p62, y determinar los tipos celulares que los expresan en un modelo murino de NH. Los modelos animales proporcionan una herramienta clave para entender la patología y los procesos moleculares que hay detrás del desarrollo de la NH y lo que puede contribuir a un mejor diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

La expresión de los marcadores de autofagia LC3B y p62 estará aumentada en el pulmón de los ratones con NH inducida por la inhalación de *Saccaropolyspora rektivirgula*, en comparación con el pulmón de los ratones control, tratados con solución salina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Determinar si los marcadores de autofagia p62 y LC3B se expresan en el pulmón en un modelo de neumonitis por hipersensibilidad desarrollado en ratón (*Mus musculus*).

4.2 Objetivos particulares:

1. Evaluar qué tipos celulares producen las proteínas de autofagia p62 y LC3B en el pulmón de ratón bajo condiciones fisiológicas.
2. Evaluar qué tipos celulares producen las proteínas de autofagia p62 y LC3B en el pulmón de ratón después de la inducción de neumonitis por hipersensibilidad.
3. Cuantificar el número de células positivas para p62 y LC3B por campo en tejidos de pulmón en condiciones control y en el modelo de neumonitis por hipersensibilidad inducido por *Saccaropolyspora rektivirgula*.
4. Determinar si existen diferencias en la expresión de p62 y LC3B en las distintas poblaciones celulares en los tejidos inflamados en comparación con el tejido control.

5. MÉTODOS

5.1 Modelo de neumonitis por hipersensibilidad.

Ratones macho de 8 a 10 semanas de edad de la cepa C57BL/6 fueron tratados por vía intranasal con 2µg/µl de *Saccharopolyspora rektivirgula* disuelta en solución salina (volumen total por dosis

50µl), durante 3 días a la semana, durante 3 semanas consecutivas. Los ratones control fueron tratados con solución salina siguiendo el mismo esquema de tratamiento. Los ratones experimentales y control se sacrificaron 1 y 4 días después de la tercera semana de tratamiento. No se observaron diferencias entre los ratones control de los períodos 1 día y 4 días, y en esta tesis se utilizaron solo controles de 4 días post-tratamiento.

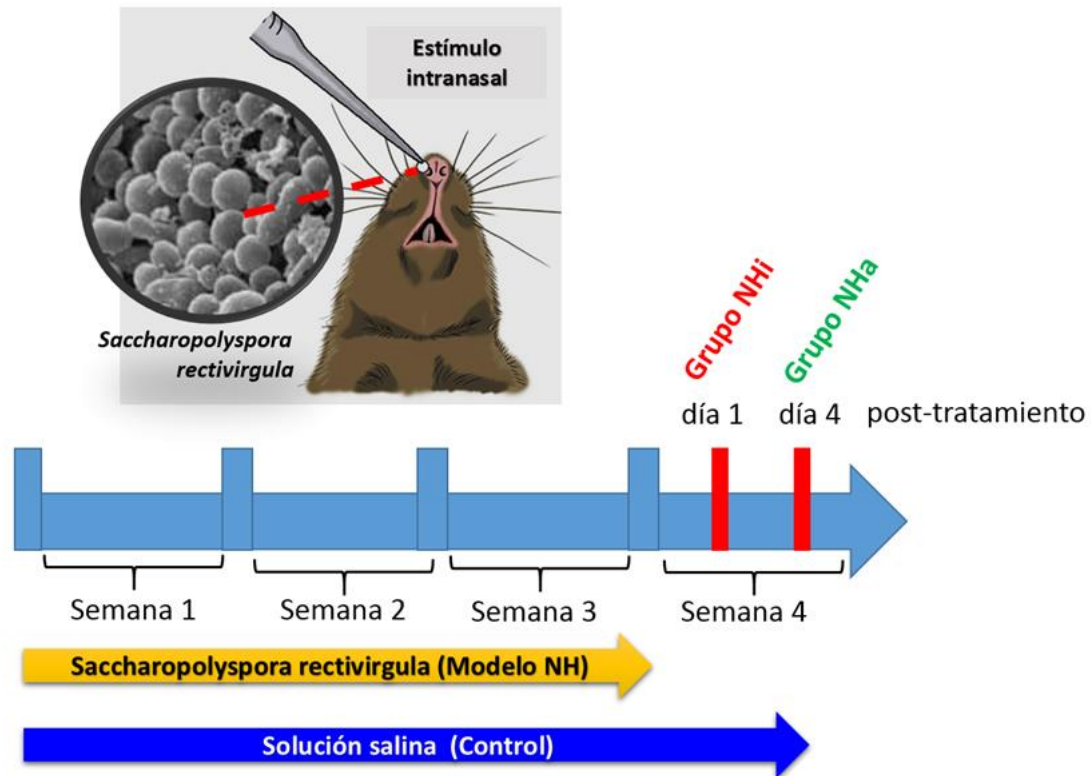


Figura 12. Modelo de neumonitis por hipersensibilidad. Grupo control: ratones tratados con solución salina y sacrificados 4 días post-tratamiento. Grupo NHI: ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula* por 3 semanas y sacrificados 1 día post-tratamiento. Grupo NHa: ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula* por 3 semanas y sacrificados 4 días post-tratamiento. Los grupos NHI y NHa no corresponden a la neumonitis aguda y crónica descrita en la enfermedad desarrollada en humanos, y es solo la nomenclatura utilizada en esta tesis para los períodos indicados en el modelo animal.

El modelo fue desarrollado por el Dr. Jiménez Álvarez Luis, los ratones fueron sacrificados y el pulmón completo fue fijado en paraformaldehído al 4% en PBS 1X. y embebido en parafina para generar bloques. Se utilizaron cortes de pulmón incluidos en parafina con un espesor de 5 micras y montados en portaobjetos de vidrio silanizados, que fueron donados por el Dr. Jiménez-Alvarez (Jiménez-Alvarez L, et-al, 2010) , mismos que fueron utilizados para localizar por inmunohistoquímica a las proteínas p62 y LC3B.

5.2 Inmunohistoquímica.

Los cortes de tejido se desparafinaron con lavados secuenciales (5 minutos cada uno) en xilol 100%, etanol (100, 80, 50%) y finalmente se rehidrataron en agua desionizada, posteriormente se bloquearon con 3% de H₂O₂ en metanol por 30 minutos para eliminar la actividad de peroxidasa endógena y se dieron dos lavados en PBS 1x de 5 minutos cada uno. Todo fue desarrollado a temperatura ambiente (20-22 °C). Para la revelación del antígeno, las laminillas se incubaron en buffer de citratos (pH 6) y se calentaron en el horno de microondas por 1 minuto a potencia 3 y después por 2 minutos a potencia 5.

Posteriormente, se dejaron enfriar las laminillas por 30 minutos y se lavaron con PBS 1x. El bloqueo de los tejidos se realizó mediante la colocación de solución bloqueadora a 1X (Universal Blocking Reagent 10x, BioGenex) en los tejidos durante 10 minutos y posteriormente con una solución de suero fetal bovino (SFB 1:100) diluido en PBS 1X. Los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios (2ug/mL) durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Al día siguiente las laminillas se lavaron dos veces con PBS-T 1X 0.05%. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario (0.5 ug/mL) durante 45 minutos a temperatura ambiente y después fueron incubados con estreptavidina durante 30 minutos. A continuación se realizaron dos lavados con Buffer de fosfatos PBS-T 1X 0.05%. Para obtener la reacción cromogénica, los tejidos se incubaron con una solución de buffer sustrato 1X (BioGenex), peróxido de hidrógeno y cromógeno Aminoetil-Carbazol. La contratinción de núcleos se realizó con hematoxilina acuosa y solución de bicarbonato de sodio, seguida por un baño con agua potable. Por último, a los tejidos fueron secados y fijados con medio de montaje Crystal Mount, y finalmente con resina Clarion para obtener laminillas permanentes. Anticuerpos primarios: anti-LC3B (1:100) y anti-p62 (1:1000) Sigma-Aldrich, posteriormente se hizo el análisis de los tejidos por microscopía de luz.

5.3 Evaluación por microscopía.

Se seleccionaron distintos campos representativos de los tejidos y fueron fotografiados al menos 3 campos distintos por cada individuo, tanto en el grupo control, como en el grupo experimental, por microscopía de luz en campo claro. Se utilizó una cámara Nikon modelo DXM-1200C. Para determinar el número total de células y si hay un incremento en la celularidad en NH en comparación con el control, se contó el número total de núcleos en el pulmón de 3 ratones control, 3 NH modelo inicial y 3 NH modelo avanzado, utilizando el software image J.

Como se mencionó previamente el pulmón completo fue fijado en paraformaldehído al 4% en PBS 1X, se usó una laminilla /corte de cada individuo para cada proteína (LC3B y P62) y una para control negativo. Se seleccionaron 3 campos al azar por cada individuo para cada proteína.

5.4 Prueba estadística.

Se evaluó el porcentaje de células positivas para cada marcador de autofagia en relación al número de células totales. Se identificó el tipo celular positivo (macrófagos y neutrófilos). Se comparó el porcentaje de células positivas en el grupo control vs el grupo de NH. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una y dos vías seguida de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las pruebas estadísticas y las gráficas se realizaron utilizando el programa Prism versión 6.0 (software Graph-Pad). N=3 para cada grupo experimental. Un valor de p menor o igual a 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo e indicado con el símbolo *, o a, b, c para cada valor específico.

6. RESULTADOS

6.1 INMUNOLocalización de LC3B en Pulmón.

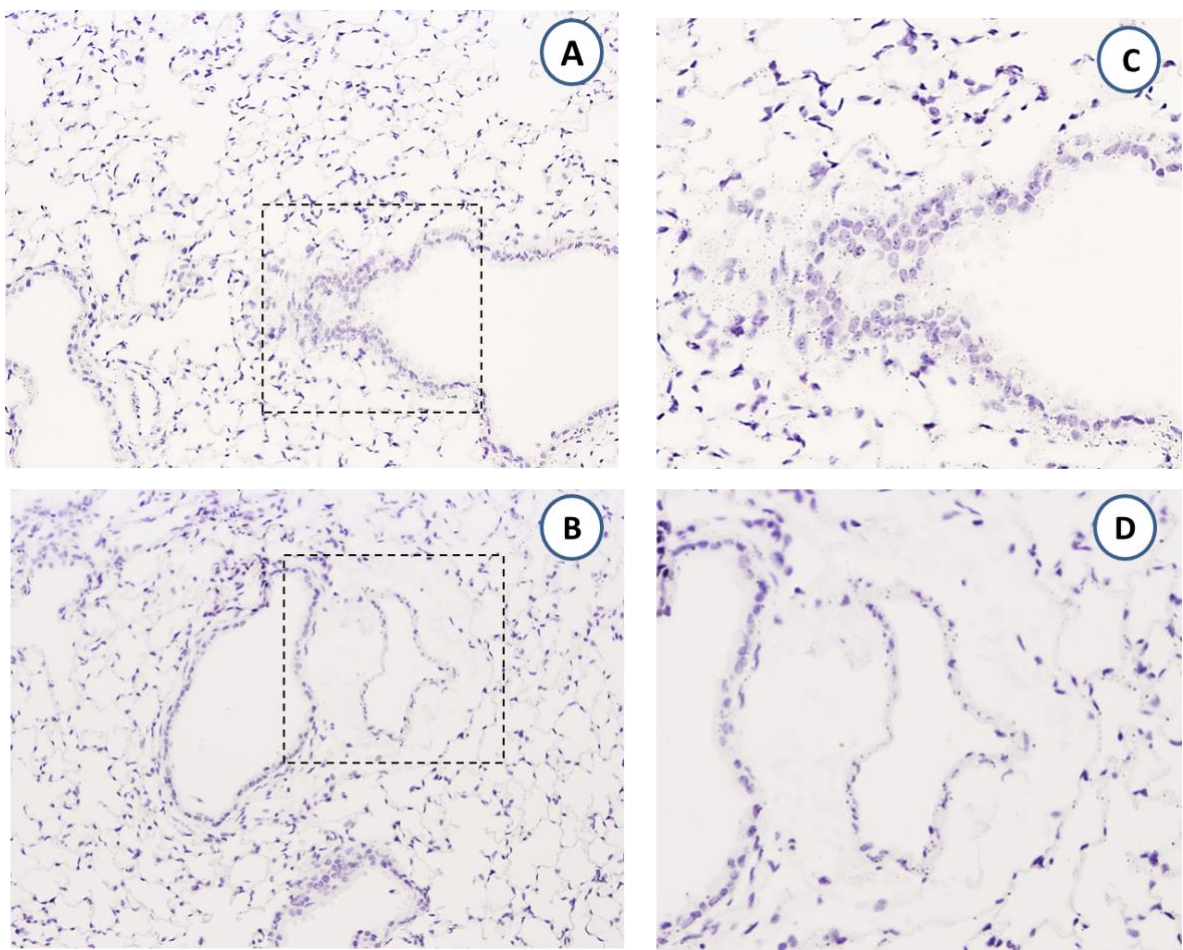
Controles tratados con solución salina.

Inicialmente se evaluaron cortes de tejido pulmonar de ratones control que fueron tratados con solución salina para determinar qué tipos celulares sintetizan LC3B en condiciones fisiológicas. LC3B se ha propuesto de forma ampliamente aceptada como un biomarcador del autofagosoma porque es una proteína que se incorpora tanto en la membrana interna como externa del autofagosoma.

En nuestro grupo de investigación consideramos BASAL a los ratones que no han sido tratados con nada. CONTROL son aquellos que están sometidos a los mismos procedimientos, pero fueron tratados con vehículo (solución salina), por ello son el control experimental.

Con el objetivo corroborar que la reacción positiva visualizada se debe a la interacción específica del epítipo de la molécula diana y el paratopo del anticuerpo del anticuerpo primario, 3 tejidos de

pulmón de ratones control, y 3 tejidos de ratones del modelo de NH fueron incubados sin anticuerpo primario, pero con anticuerpo secundario anti-conejo, y fueron sometidos a los mismos tratamientos durante todo el protocolo de IHC, para descartar cualquier posible interacción inespecífica, ya que, además de la molécula a la que se dirige el anticuerpo, los resultados de un ensayo inmunohistoquímico pueden revelar la presencia de moléculas estructuralmente relacionadas, así como la unión de los anticuerpos utilizados de forma no específica a otros componentes celulares y tisulares. Como se muestra en la **figura 13**, no se observó señal positiva (o tinción en color rojo), ni siquiera tenue, en ningún tipo celular, lo que indica que la interacción con el antígeno LC3 es específica.



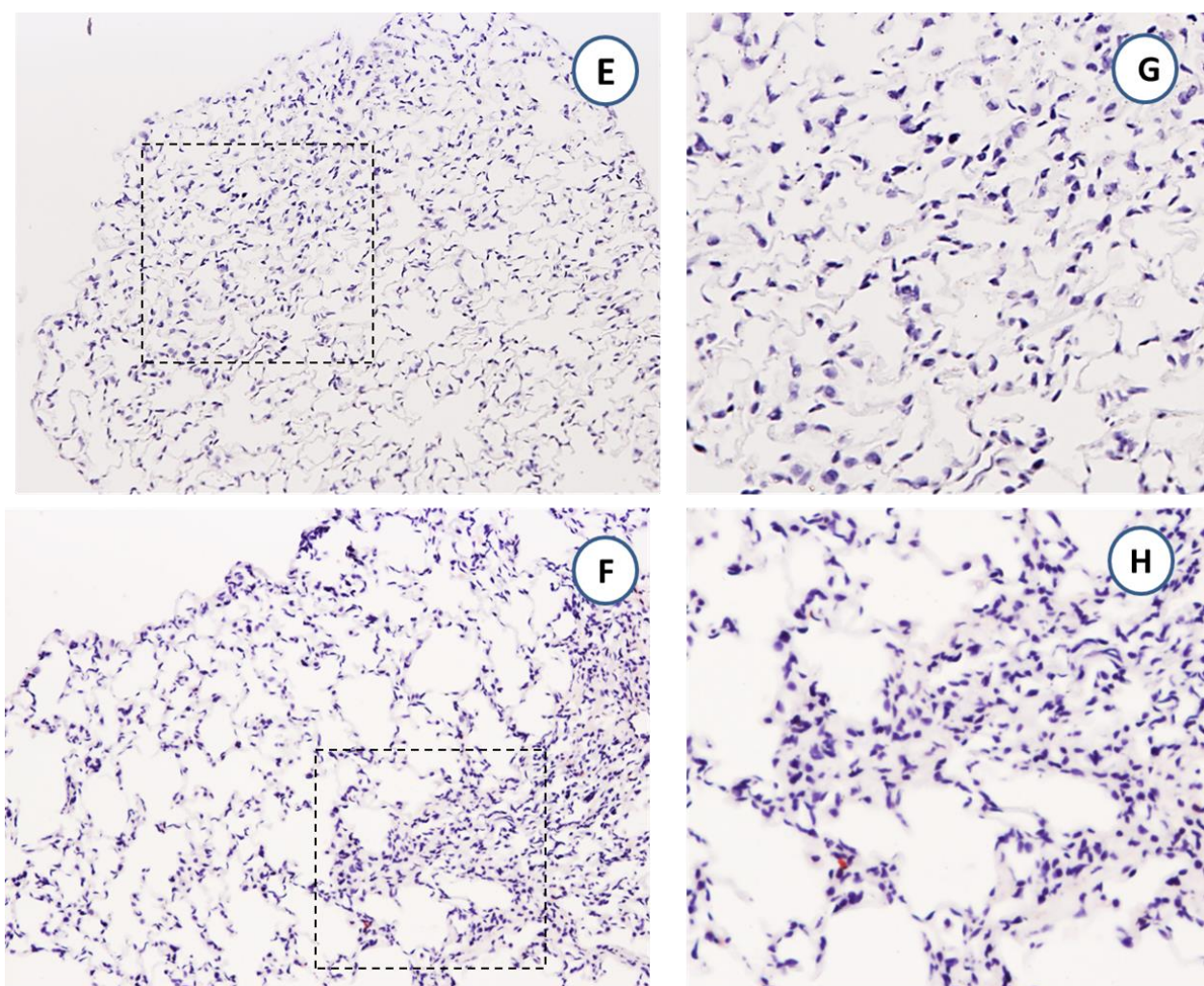


Figura 13. Controles negativos de la IHC para LC3B. Microfotografías representativas de los tejidos control negativo (tejidos incubados sin anticuerpo primario y con anticuerpo anti-conejo). Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Magnificación 200X. Inseto indicado con líneas punteadas (izquierda) y con magnificación digital de 4 veces (derecha). Grupo control (A-D): ratones tratados con solución salina y sacrificados 4 días post-tratamiento. Grupo NH (E-H): ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

En el pulmón de ratones control se observan los espacios alveolares preservados y se observan escasos macrófagos alveolares. Como se muestra en la **Figura 14**, se observa una señal positiva tenue en el epitelio bronquial, incluso algunos núcleos de las células bronquiales se ven positivos; también algunas células mesenquimales debajo del epitelio bronquial muestran señal positiva (**Figura 14, flecha inserto D**). El patrón que se observa es una tinción citoplasmática difusa y débil de LC3B en algunas células que se encuentran en las esquinas de los alvéolos (**Figura 14, círculos rojos inserto E y F**), sugiriendo que podrían ser neumocitos tipo 2, sin embargo sería necesario

hacer un colocalización con la proteína SP-C, para corroborar que se trata de éste tipo celular.

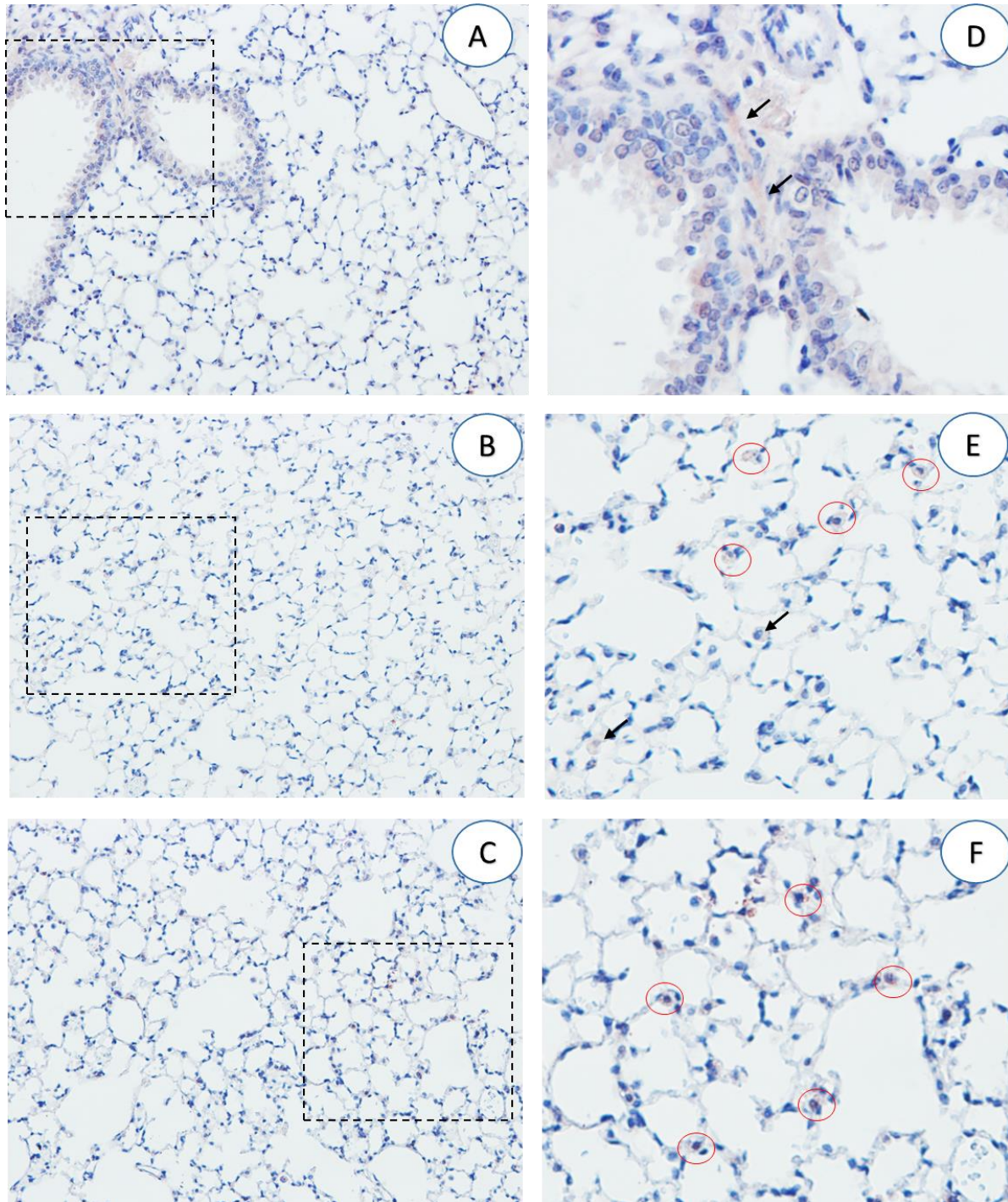


Figura 14. Evaluación de LC3B en pulmón de ratones control tratados con solución salina y sacrificados 4 días post-tratamiento. (A-C) Microfotografías representativas de la inmunolocalización de LC3B en el pulmón de tres ratones distintos. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Magnificación 200X. (D-F) Inseto indicado con líneas punteadas (izquierda) y con magnificación digital de 4 veces (derecha). Flechas: células mesenquimales; círculo rojo: posibles neumocitos tipo II. Grupo control: ratones tratados con solución salina y sacrificados 4 días post-tratamiento.

Ratones tratados con Saccharopolyspora rectivirgula (Modelo de NH inicial).

En comparación con el pulmón control, después de la exposición al antígeno de *S. rectivirgula* se observa un incremento en la celularidad, debido a la infiltración de células inflamatorias, principalmente neutrófilos, macrófagos y algunos linfocitos en los espacios intraalveolares, con una mayor densidad en la zona peribronquial de linfocitos (**Figura 15, B e inserto E**). Se observa una fuerte tinción positiva para LC3B en neutrófilos y en macrófagos alveolares e intersticiales. Casi todos los neutrófilos acumulados dentro de los espacios alveolares fueron positivos para LC3B y mostraron un patrón de tinción granular e intenso (**Figura 15**).

Ratones tratados con Saccharopolyspora rectivirgula (Modelo de NH avanzado).

Se aprecia una neumonía intersticial más avanzada en comparación con el modelo inicial, es posible observar acumulación de neutrófilos en la región subpleural y de manera consistente se observan neutrófilos en los espacios alveolares e intraalveolares positivos para LC3B. En comparación con el modelo inicial, se puede observar que hay una respuesta inflamatoria linfocítica peribronquiolar prominente en el tejido linfoide asociado a bronquiolos conocido como BALT (**Figura 16 asteriscos**). En el panel B y E de la **figura 16**, se observa una gran densidad de agregados linfocíticos y neutrófilos positivos para LC3B en la periferia del endotelio (flechas Figura 16E). También se observa una señal positiva difusa y tenue en el epitelio bronquial (**Figura 16 C y F**).

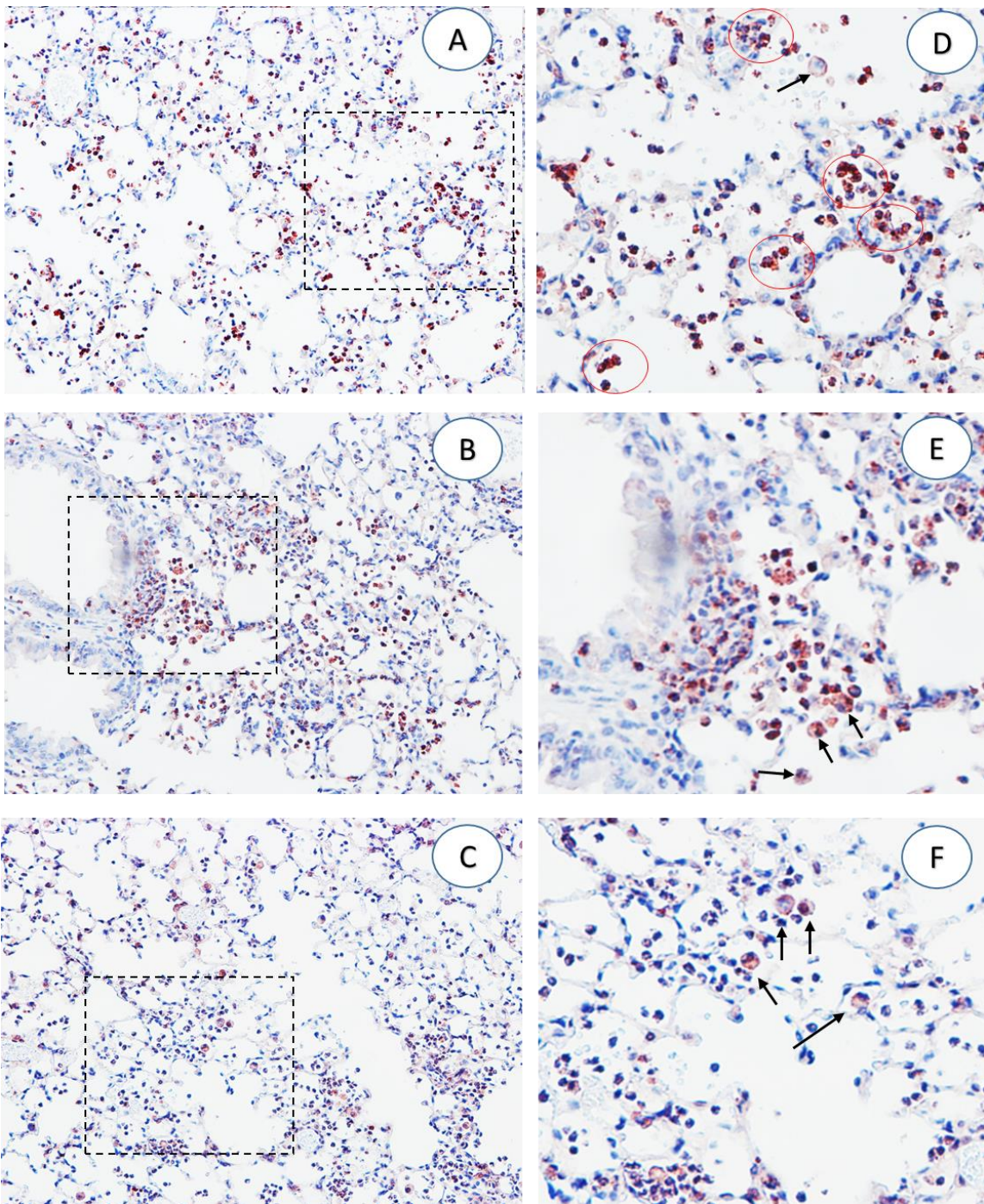


Figura 15. Evaluación LC3B en pulmón de ratones tratados con administración intranasal del antígeno de *Saccharopolyspora rectivirgula*, por tres semanas y sacrificados 1 día post-tratamiento (modelo inicial). (A-C) Microfotografías representativas de la inmunolocalización de LC3B en el pulmón de tres ratones distintos. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Magnificación 200X. (D-F) Inserto indicado con líneas punteadas (izquierda) y con magnificación digital de 4 veces (derecha). Círculo: neutrófilos; flechas: macrófagos. Grupo NHi: ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula* por 3 semanas y sacrificados 1 día post-tratamiento. Los grupos NHi y NHa no corresponden a la neumonitis aguda y crónica descrita en la enfermedad desarrollada en humanos, y es solo la nomenclatura utilizada en esta tesis para los períodos indicados en el modelo animal.

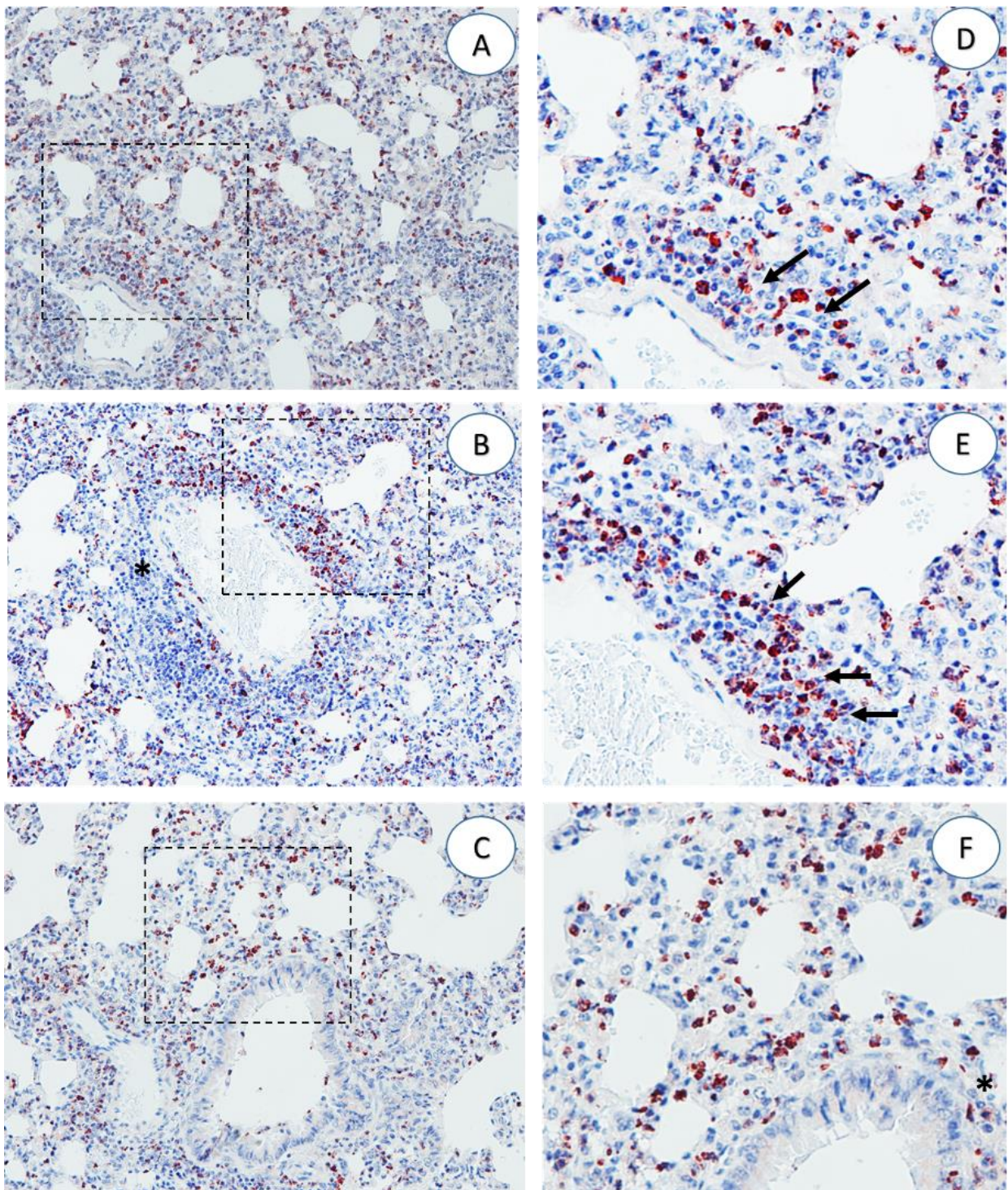


Figura 16. Evaluación de LC3B en pulmón de ratones tratados con administración intranasal del antígeno de *Saccharopolyspora rectivirgula* por tres semanas y sacrificados 4 días post-tratamiento (modelo avanzado). (A-C) Microfotografías representativas de la inmunolocalización de LC3B en el pulmón de tres ratones distintos. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Magnificación 200X. (D-F) Inseto indicado con líneas punteadas (izquierda) y con magnificación digital de 4 veces (derecha).

En resumen, en la **figura 17** se observa un cuadro comparativo de las células que son positivas para el marcador LC3B en el pulmón de controles y en el pulmón derivado del modelo de NH. En

el caso de las células del epitelio alveolar y mesenquimales no se encontró tinción positiva para LC3B en el modelo de neumonitis.

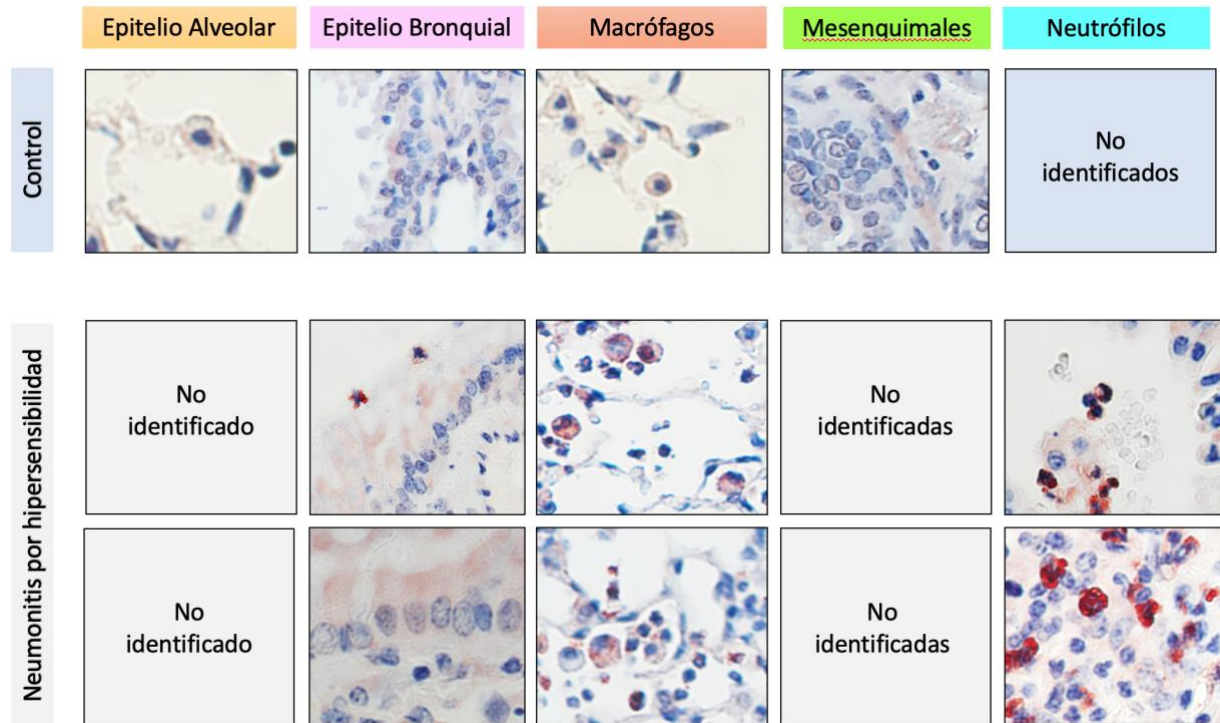


Figura 17. Resumen comparativo de los distintos tipos de células positivas para LC3B en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con Saccharopolyspora rectivirgula, en el modelo de NH inicial y NH avanzada. No identificado: no se encontró marcador para LC3B en ese tipo celular en los campos.

Como se describió previamente en métodos, se cuantificó el número total de núcleos por campo para tener una estimación del número total de células, y además se cuantificó el número de células con señal positiva (color rojo) por campo/ individuo. En la **tabla 1 y 2** se muestra el porcentaje de células positivas para LC3B de forma individual, y también se obtuvo un promedio del número de células en los individuos control (1085.33 células totales), para normalizar vs este valor cada uno de los datos, donde la intención fue que los valores normalizados permitieran la comparación de los valores con conjuntos de datos de manera que se eliminaran los efectos de influencias para medidas de proporción.

Tabla 1. Cuantificación de células totales (núcleos totales) y macrófagos positivos para LC3B en el pulmón de ratones control y en el pulmón de ratones del modelo inicial y avanzado de NH.

LC3 positivo en MACRÓFAGOS				
Controles	Núcleos totales	Macrófagos	Porcentaje/ caso individual	Normalización
A	1292.5	8	0.618955513	0.73710074
B	1052.5	9	0.760095012	0.82923833
C	911	7	0.878155873	0.64496314
promedio	1085.333333		0.752402132	0.73710074
NH inicial				
A	1649	19	0.485142511	1.75061425
B	1857	18.5	0.430802369	1.70454545
C	1556.5	23	0.513973659	2.11916462
promedio	1687.5		0.476639513	1.85810811
NH avanzada				
A	3427	2	0.233440327	0.18427518
B	3365.5	0	0.237706136	0
C	2194.5	1.5	0.364547733	0.13820639
promedio	2995.666667		0.278564732	0.10749386

Tabla 2. Cuantificación de células totales (núcleos totales) y neutrófilos para LC3B en el pulmón de ratones control y en el pulmón de ratones del modelo inicial y avanzado de NH.

LC3 positivo en NEUTRÓFILOS				
Controles	Núcleos totales	Neutrófilos	Porcentaje/ caso individual	Normalización
A	1292.5	0	0	0
B	1052.5	0	0	0
C	911	0	0	0
promedio	1085.333333		0	0
NH inicial				
A	1649	285	17.28320194	26.2592138
B	1857	205	11.03931072	18.8882064
C	1556.5	49	3.14808866	4.51474201
promedio	1687.5		10.49020044	16.5540541
NH avanzada				
A	3427	254	7.411730376	23.4029484
B	3365.5	166	4.932402318	15.2948403
C	2194.5	139	6.33401686	12.8071253
promedio	2995.666667		6.226049851	17.1683047

Tabla 3. Células totales (núcleos totales), porcentaje normalizado de macrófagos y neutrófilos positivos para LC3B en el pulmón de ratones control, del modelo inicial y avanzado de NH

	Núcleos totales	Macrófagos	Normalizado	Porcentaje	Neutrófilos	Normalizado	Porcentaje
Controles							
A	1293	8	0.00737	0.74%	0	0	0%
B	1053	9	0.00829	0.83%	0	0	0%
C	911	7	0.00645	0.64%	0	0	0%
\bar{X}	1085	8		0.73%	0		0%
σ	192.86	1			0		
NH inicial							
A	1649	19	0.01751	1.75%	285	0.2626	26.20%
B	1857	18.5	0.01705	1.70%	205	0.1889	18.90%
C	1557	23	0.02119	2.12%	49	0.0451	4.50%
\bar{X}	1688	20		1.80%	180		16.5%
σ	153.69	2.47			120		
NH avanzada							
A	3427	2	0.00184	0.18%	254	0.234	23.40%
B	3366	0	0	0%	166	0.1529	15.20%
C	2195	1.5	0.00138	0.13%	139	0.1281	12.80%
\bar{X}	2996	1		0.10%	186		17.10%
σ	694.356537	1			60.14		

En la **figura 18** se presenta de manera gráfica la cuantificación de núcleos totales por campo. En comparación con los pulmones del grupo control, se observa un pequeño aumento en la celularidad en los pulmones derivados del modelo de NH inicial aunque no es significativo, sin embargo, si observamos un aumento significativo en el número de células en los pulmones derivados del modelo de NH avanzada. Estos hallazgos indican que hay una mayor infiltración de células (esencialmente células inflamatorias) en los pulmones de los ratones tratados con *S. reactivigula* por 3 semanas.

La cuantificación de macrófagos positivos para LC3B (**Figura 19 A**) reveló que en la NH inicial hubo un aumento significativo y posteriormente se observa una disminución significativa en la NH avanzada. Respecto a los neutrófilos (**Figura 19 B**), en el pulmón de ratones control no se encontraron células positivas para LC3B, sin embargo el estímulo con el antígeno *S. reactivigula* indujo un incremento notable del 16.5%, aunque no significativo (0.0665), el cual se sostiene en la NH avanzada con un 17.1%, sin embargo tampoco fue significativo (0.0583). Se observa en la **Fig 19B**, así como en la **figura 20** una desviación estándar grande en el modelo de NH inicial para los

neutrófilos, esto sugiere que los datos son heterogéneos, como se muestra en la Tabla 3, un individuo tiene menos neutrófilos (49) con respecto a los otros dos individuos (285 y 205), por ello para futuros experimentos proponemos aumentar el número de individuos y campos por tratamiento.

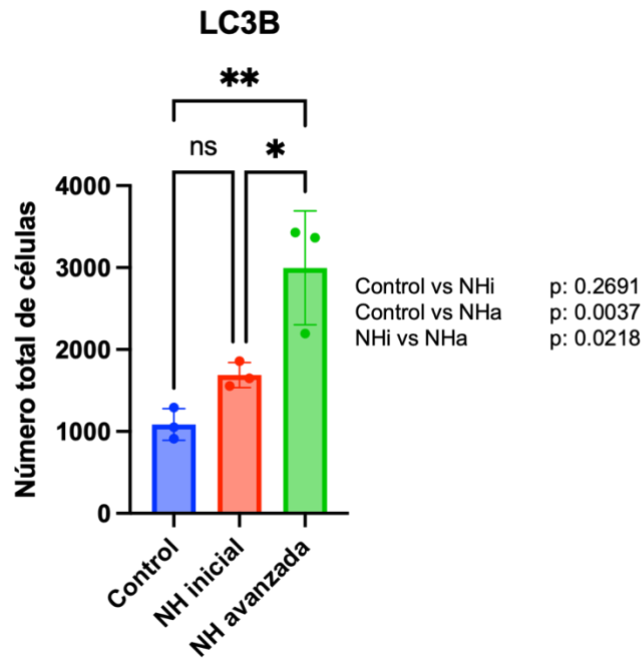


Figura 18. Cuantificación de células totales positivas para LC3B en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*, en el modelo de NH inicial y NH avanzada. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las prueba estadística y la gráfica se realizaron utilizando el programa Prism versión 6.0 (software Graph-Pad) y $p < 0,05$ se consideró significativa. $N=3$ para cada grupo experimental. 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), <0.0001 (****).

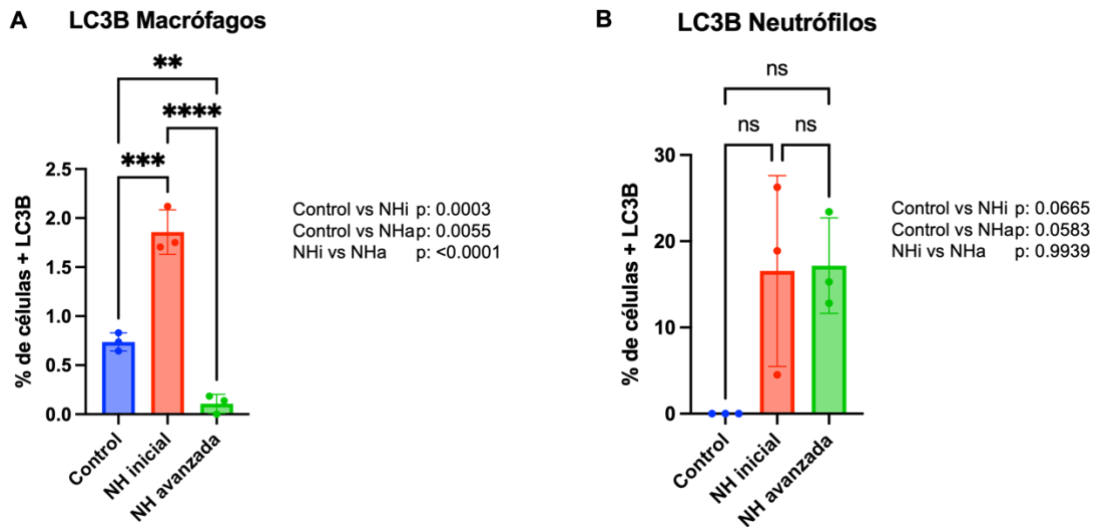


Figura 19. Cuantificación de células positivas para LC3B en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*, en el modelo de NH inicial y NH avanzada. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las prueba estadística y la gráfica se realizaron utilizando el programa Prism versión 6.0 (software Graph-Pad), y $p < 0,05$ se consideró significativa. 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), <0.0001(****).

Se realizó una comparación entre el porcentaje de macrófagos y neutrófilos positivos para LC3B (Figura 20), donde se ilustra que el porcentaje de neutrófilos fue significativamente mayor que el porcentaje de macrófagos positivos en la NH inicial y la NH avanzada.

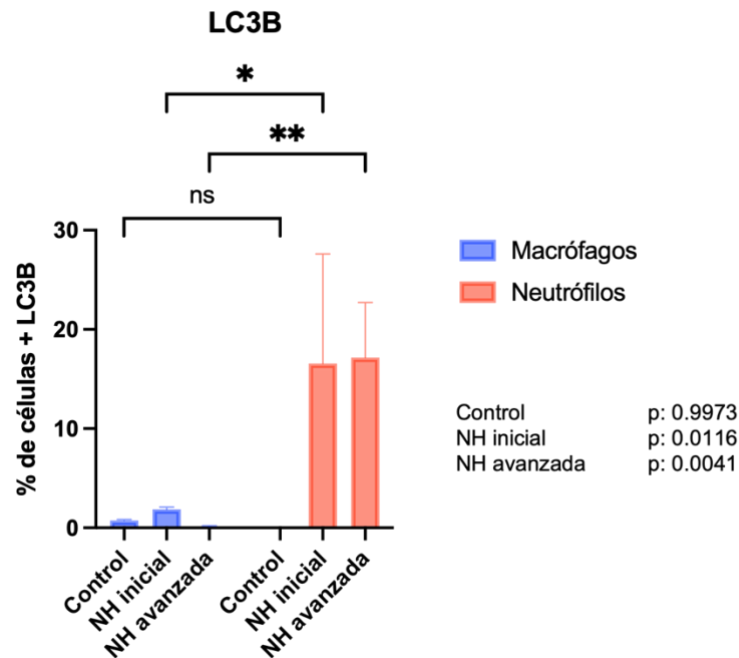
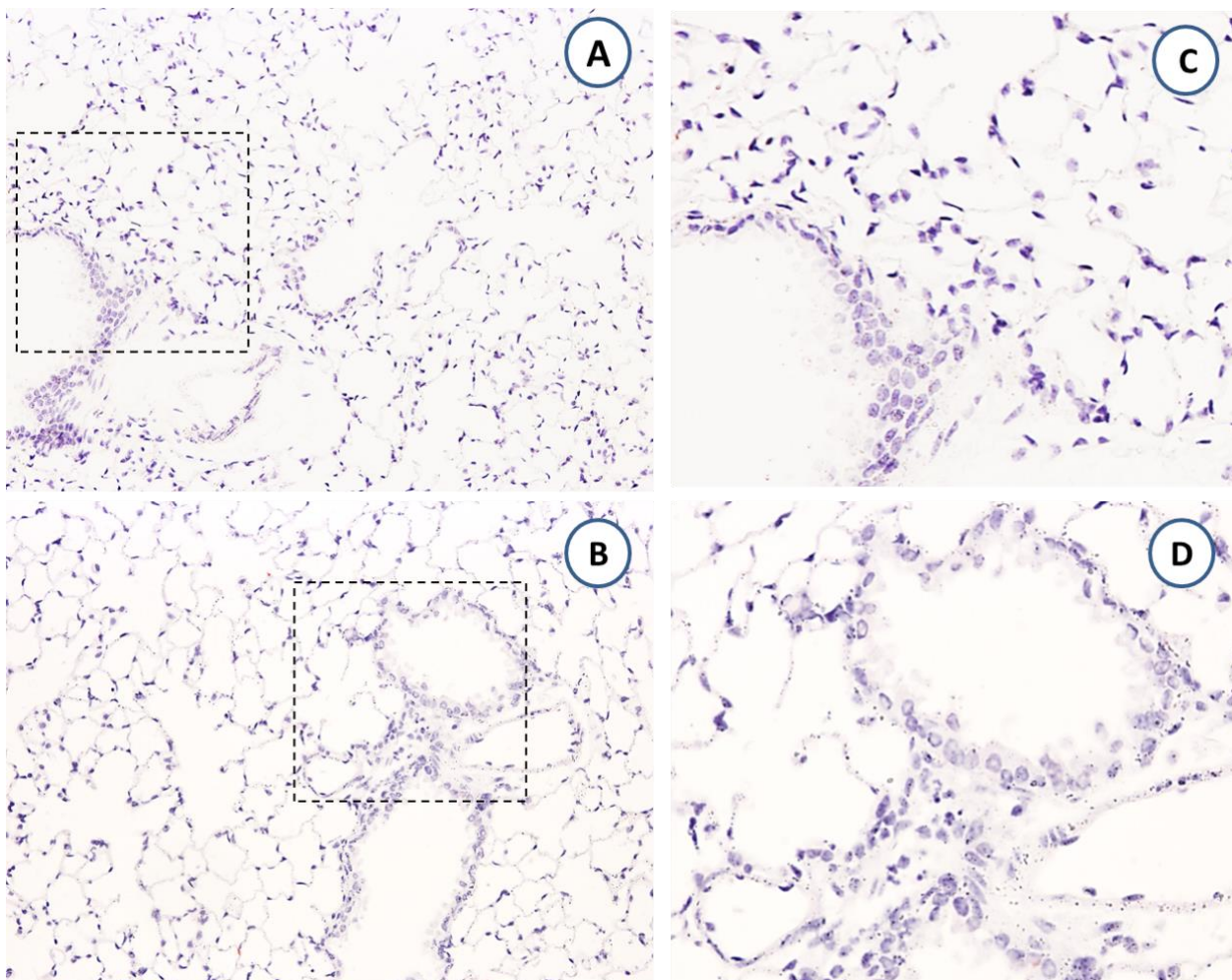


Figura 20. Comparación del porcentaje de macrófagos y neutrófilos positivos para LC3B en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula* en el modelo de NH inicial y NH avanzada. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las prueba estadística y la gráfica se realizaron utilizando el programa

Prism versión 6.0 (software Graph-Pad), y $p < 0,05$ se consideró significativa. $N=3$ para cada grupo experimental. 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***) , <0.0001 (****).

6.2 INMUNOLocalIZACIÓN DE p62 EN PULMÓN.

Con el objetivo corroborar que la reacción positiva visualizada se debe a la interacción específica del epítipo p62 y el paratopo del anticuerpo primario, 3 tejidos de pulmón de ratones control, y 3 tejidos de ratones del modelo de NH fueron incubados sin anticuerpo primario, pero con anticuerpo secundario anti-conejo, y fueron sometidos a los mismos tratamientos durante todo el protocolo de IHC, para descartar cualquier posible interacción inespecífica. Como se muestra en la **figura 21**, no se observó señal positiva (o tinción en color rojo), ni siquiera tenue, en ningún tipo celular, lo que indica que la interacción con el antígeno p62 es específica.



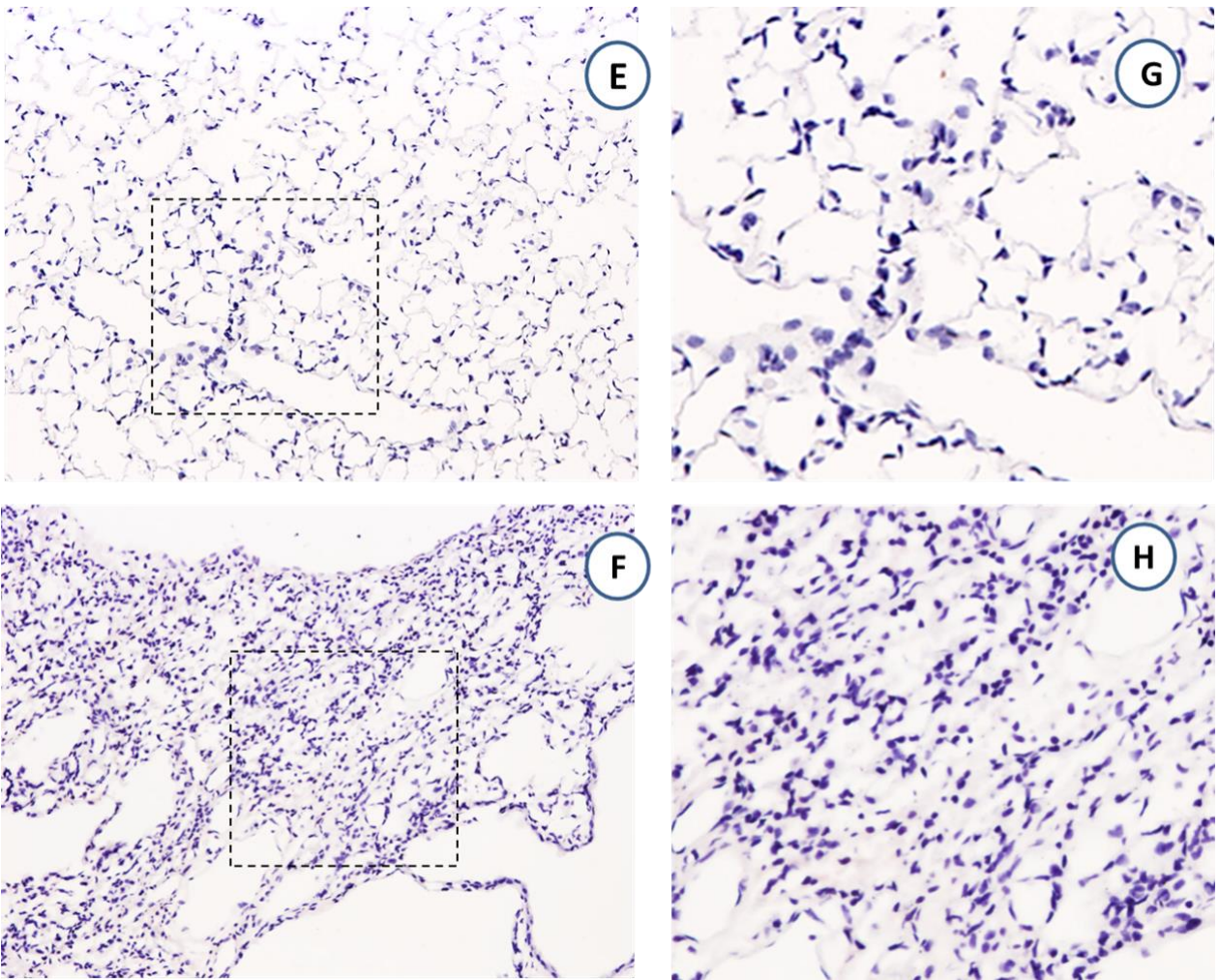


Figura 21. Controles negativos de la IHC para p62. Microfotografías representativas de los tejidos control negativo (tejidos incubados sin anticuerpo primario y con anticuerpo anti-conejo). Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Magnificación 200X. Inserto indicado con líneas punteadas (izquierda) y con magnificación digital de 4 veces (derecha). Grupo control (A-D): ratones tratados con solución salina y sacrificados 4 días post-tratamiento. Grupo NH (E-H): ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*.

Controles tratados con solución salina

En el pulmón de ratones control se observan los espacios alveolares preservados y escasos macrófagos alveolares presentan una tinción tenue de p62 (**Figura 22 E y F**) así como algunas células epiteliales bronquiales (**Figura 22 D flechas**).

Ratones tratados con Saccharopolyspora rectivirgula (Modelo inicial).

En comparación con el pulmón control, se observa un incremento en la celularidad debido a la infiltración de neutrófilos y macrófagos, además de la presencia de linfocitos en todo el parénquima pulmonar con mayor densidad en la región peribronquial (**Figura 23 B**). En comparación con los pulmones de los ratones control se observó una fuerte tinción positiva para p62 con un patrón

citoplasmático granular en macrófagos intersticiales y alveolares (**flechas Figura 23 D y F**). El epitelio bronquial también mostró una tinción positiva para p62 intensa con un patrón citoplasmático granular (**flechas Figura 23 E**). También se observó señal positiva en neutrófilos pero no tan intensa en comparación con el patrón de LC3B.

Ratones tratados con Saccharopolyspora rectivirgula (Modelo avanzada).

Se puede observar en general una neumonía intersticial más avanzada en comparación con el modelo inicial, hay un gran número de células inflamatorias, engrosamiento de los septos alveolares, además de la aparición de zonas densas en linfocitos y agrupaciones de macrófagos. En comparación con el pulmón control, se observa una señal más intensa para p62 con un patrón granular en el citoplasma y núcleo de macrófagos (**flechas Figura 24 D y E**). También se observó señal positiva en neutrófilos ubicados debajo del epitelio bronquial. También observamos que se atenuó la señal positiva de p62 en el epitelio bronquial en los pulmones de NH avanzada, en comparación con la etapa inicial de la NH (**Figura 24 F**).

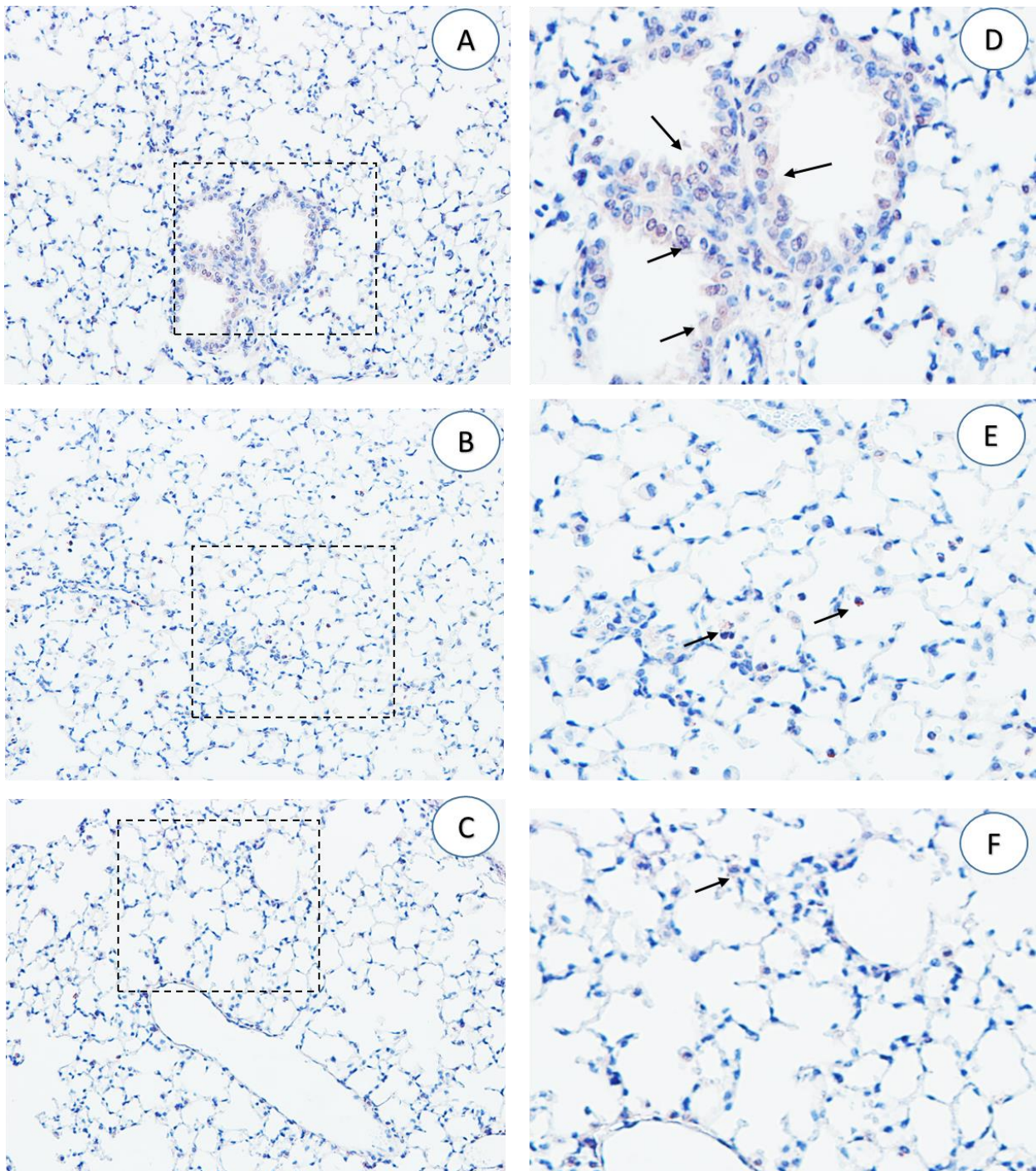


Figura 22. Evaluación de P62 en pulmón de ratones control tratados con solución salina. (A-C) Microfotografías representativas de inmunolocalización de p62 en el pulmón de tres ratones distintos. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Magnificación 200X. (D-F) Inseto indicado en las líneas punteadas con magnificación digital de 4 veces.

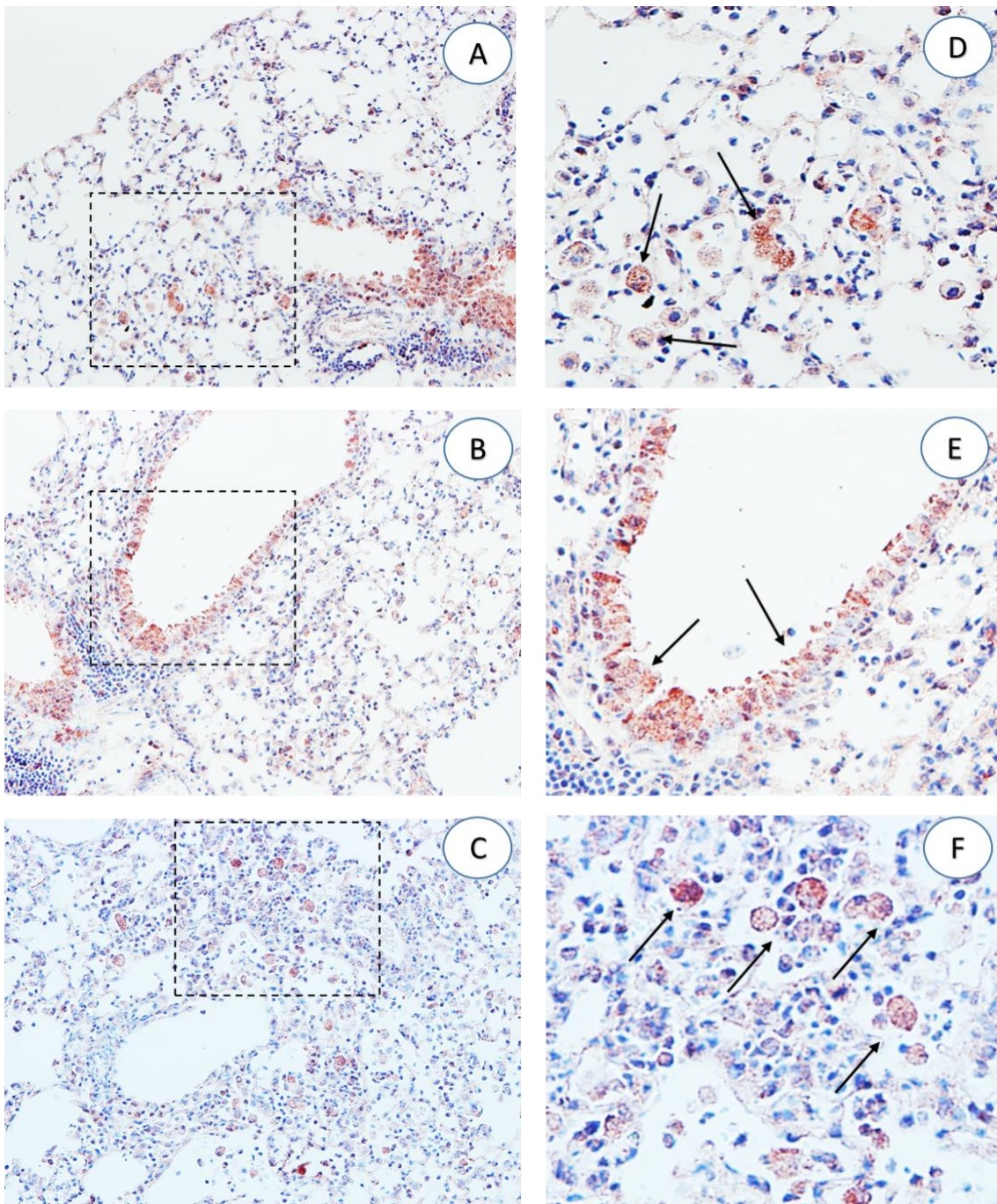


Figura 23. Evaluación de P62 en pulmón de ratones tratados con administración intranasal del antígeno de *Saccharopolyspora rectivirgula*, por tres semanas y sacrificados 1 día post-tratamiento (modelo inicial). (A-C) Microfotografías representativas de inmunolocalización de p62 en el pulmón de tres ratones distintos. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Magnificación 200X. (D-F) Inserto indicado en las líneas punteadas con magnificación digital de 4 veces.

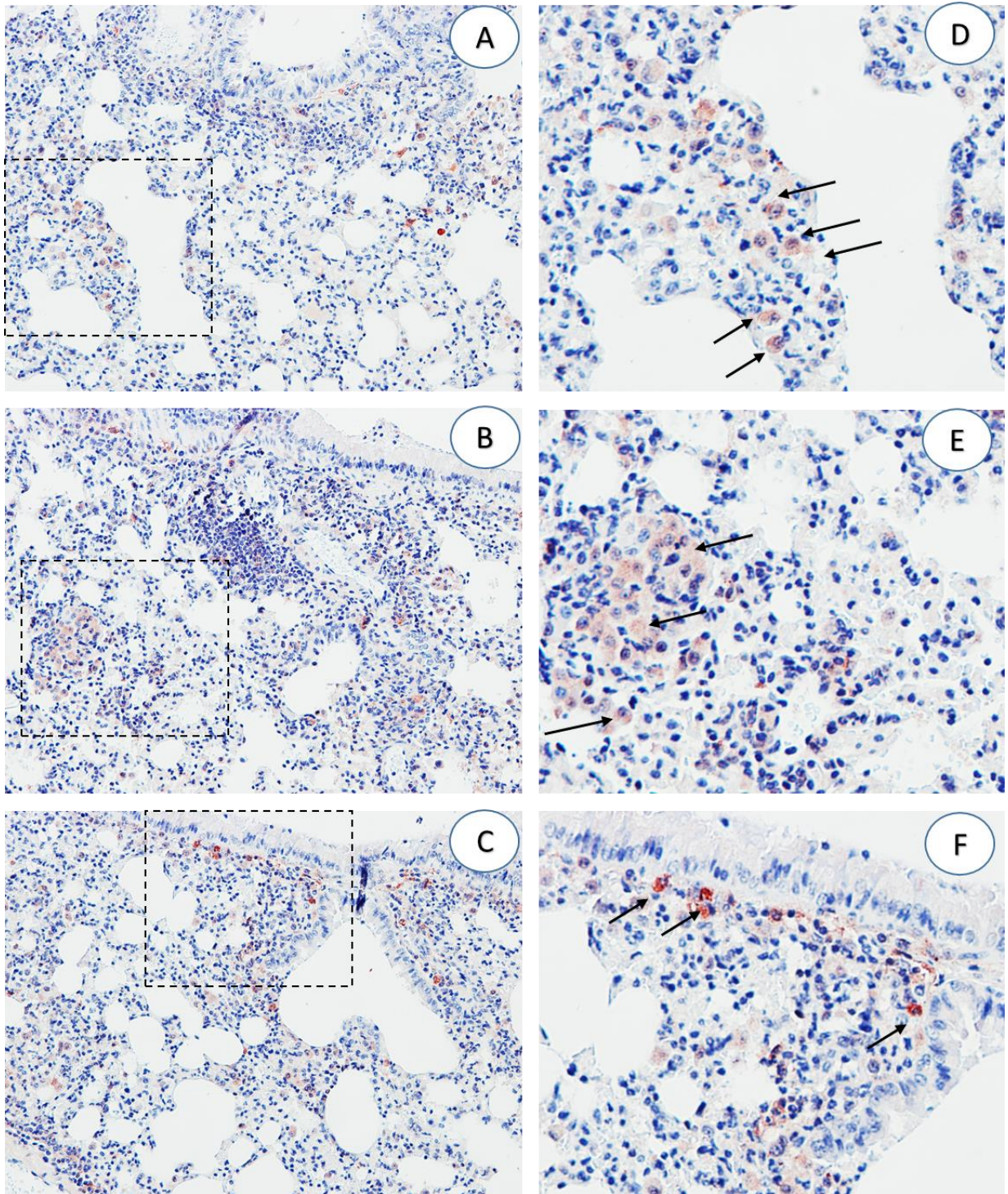


Figura 24. Evaluación de p62 en pulmón de ratones tratados con administración intranasal del antígeno de *Saccharopolyspora rectivirgula*, por tres semanas y sacrificados 4 días post-tratamiento (modelo avanzado). (A-C) Microfotografías representativas de inmunolocalización de p62 en el pulmón de tres ratones distintos. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Magnificación 200X. (D-F) Inserto indicado en las líneas punteadas con magnificación digital de 4 veces.

En la **Figura 25** se muestra un cuadro comparativo de las células que presentaron el marcador p62.

Al igual que con el antígeno LC3B, para p62 se cuantificó el número total de núcleos por campo para tener una estimación del número total de células, y además se cuantificó el número de células con señal positiva (color rojo) por campo/ individuo. En la **tabla 4 y 5** se muestra el número total de células positivas para p62, y el porcentaje de forma individual, y también se obtuvo un promedio del número total de células en los individuos control (1268.5 células), para normalizar vs este valor cada uno de los datos, donde la intención fue que los valores normalizados permitieran la comparación de los valores con conjuntos de datos de manera que se eliminaran los efectos de influencias para medidas de proporción, estos datos que se muestran en la **Tabla 6**.

En la **Figura 26** se muestran los datos graficados de la cuantificación de núcleos totales en el modelo inicial y avanzado así como en el grupo control, se observa un ligero aumento en la celularidad del pulmón en el modelo inicial, y un aumento significativo en la NH avanzada con respecto al modelo inicial y al control, demostrando que hay mayor infiltración de células inflamatorias en el pulmón del ratón tras la exposición al antígeno por 3 semanas.

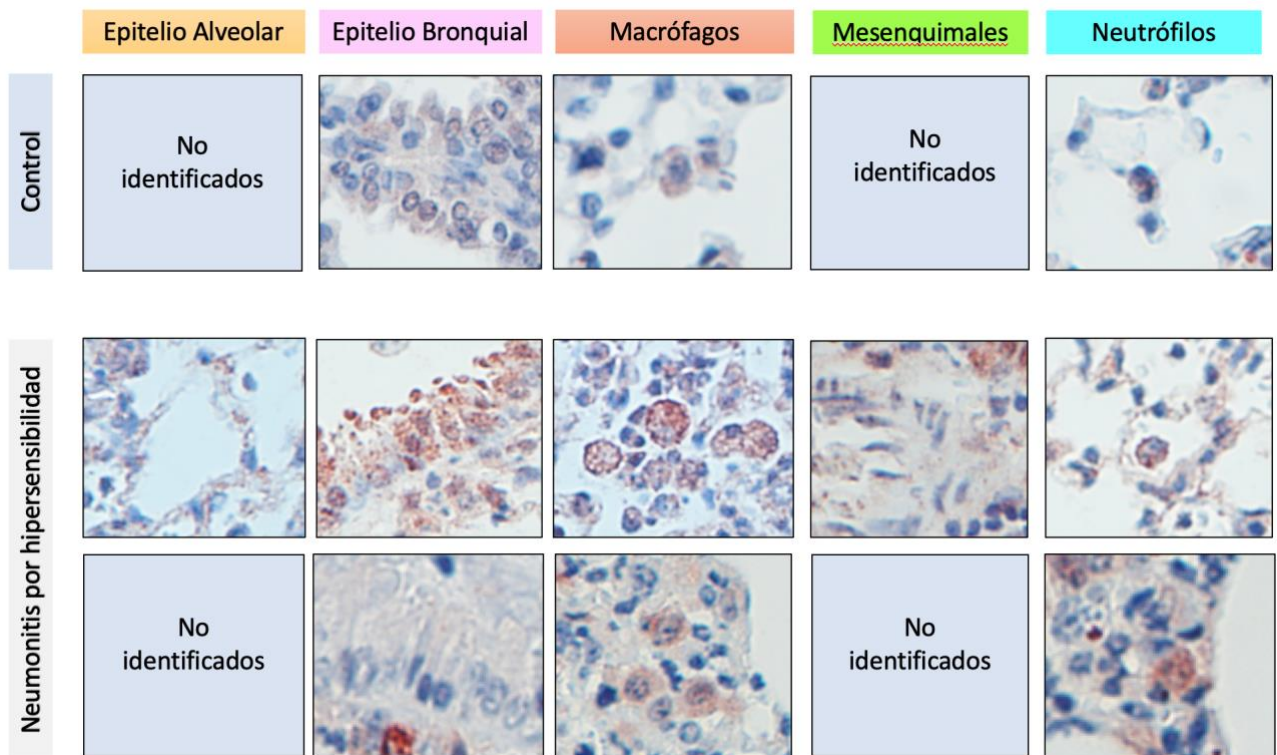


Figura 25. Resumen comparativo de los distintos tipos de células positivas para p62 en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*, en el modelo de NH inicial y NH avanzada. No identificado: no se encontró el marcador para p62 en ese tipo celular.

La cuantificación de células positivas para p62 (**Figura 27**) reveló que en el pulmón control, hubo un 0.52% de células positivas, que son principalmente macrófagos, en la NH inicial aumentó la presencia de macrófagos a 2.28% y en la NH avanzada se mantuvo en 2.18%, aunque ninguno de estos cambios fue significativo, este es un porcentaje más alto de macrófagos positivos para p62, que el que se observó para LC3B al inducir neumonitis. Por otro lado en el control se encontró que el 0.13% de las células eran neutrófilos positivos para p62, en la NH inicial se observó un aumento significativo al 9.2% seguido de una disminución en la NH avanzada al 4.7%, los porcentajes de neutrófilos positivos para p62, fueron menores que los mostrados para LC3B. En la comparación entre el porcentaje de macrófagos y el porcentaje de neutrófilos (**Figura 28**), nuevamente el porcentaje de neutrófilos resultó significativamente mayor, pero sólo en el modelo de la NH inicial.

Tabla 4. Cuantificación de células totales (núcleos totales) y macrófagos para p62 en el pulmón de ratones control y en el pulmón de ratones del modelo inicial y avanzado de NH.

p62 positivos para MACRÓFAGOS					
	Núcleos totales	Macrófagos	Porcentaje/ caso individual	Normalizado	
Controles					
A	1458	4	0.27434842	0.31533307	
B	1387	7	0.50468637	0.55183287	
C	960.5	9	0.93701197	0.70949941	
promedio	1268.5		0.57201559	0.52555512	
NH inicial					
A	1641.5	31	1.8885166	2.4438313	
B	1833	14	0.76377523	1.10366575	
C	1753	42	2.39589276	3.31099724	
promedio	1742.5		1.6827282	2.28616476	
NH avanzada					
A	2181.5	36	1.65024066	2.83799764	
B	2603.5	37	1.42116382	2.9168309	
C	2299.5	10	0.43487715	0.78833268	
	2361.5		1.16876054	2.18105374	

Tabla 5. Cuantificación de células totales (núcleos totales) y neutrófilos para p62 en el pulmón de ratones control y en el pulmón de ratones del modelo inicial y avanzado de NH.

p62 positivos para NEUTRÓFILOS				
Controles	Núcleos totales	Neutrófilos	Porcentaje/ caso individual	Normalizado
A	1458	3	0.20576132	0.2364998
B	1387	2	0.14419611	0.15766654
C	960.5	0	0	0
promedio	1268.5		0.11665247	0.13138878
NH inicial				
A	1641.5	127	7.73682607	10.011825
B	1833	71	3.87343153	5.597162
C	1753	153	8.72789504	12.0614899
promedio	1742.5		6.77938421	9.22349231
NH avanzada				
A	2181.5	53	2.42952097	4.17816318
B	2603.5	73	2.8039178	5.75482854
C	2299.5	54	2.34833659	4.25699645
	2361.5		2.52725846	4.72999606

Tabla 6. Células totales (núcleos totales), porcentaje normalizado de macrófagos y neutrófilos positivos para p62 en el pulmón de ratones control, del modelo inicial y avanzado de NH.

	Núcleos totales	Macrófagos	Normalizado	Porcentaje	Neutrófilos	Normalizado	Porcentaje
Controles							
A	1458	4	0.00315	0.31%	3	0.0024	0.24%
B	1387	7	0.00552	0.55%	2	0.0016	0.16%
C	960.5	9	0.00709	0.71%	0	0	0%
\bar{X}	1269	7		0.52%	2		0.13%
σ	217.79	1.65			1.528		
NH inicial							
A	1641.5	31	0.02443831	2.40%	127	0.10011825	10.01%
B	1833	14	0.01103666	1.10%	71	0.05597162	5.60%
C	1753	42	0.03310997	3.30%	153	0.1206149	12%
\bar{X}	1743	29		2.28%	117		9,2%
σ	96.18	14.11			41.9		
NH avanzada							
A	2181.5	36	0.02837998	2.84%	53	0.04178163	4.18%
B	2603.5	37	0.02916831	2.92%	73	0.05754829	5.75%
C	2299.5	10	0.00788333	0.78%	54	0.04256996	4.26%
\bar{X}	2362	28		2.18%	60		4.70%
σ	217.72	15.31			11.27		

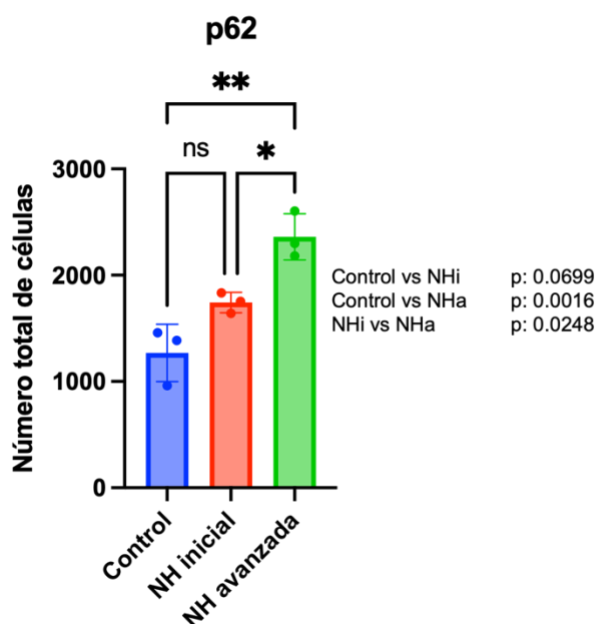


Figura 26. Cuantificación de células totales para p62 en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*, en el modelo de NH inicial y NH avanzada. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. La prueba estadística y la gráfica se realizaron utilizando el programa Prism versión 6.0 (software Graph-Pad), y $p < 0,05$ se consideró significativa. $N=3$ para cada grupo experimental. 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), <0.0001 (****).

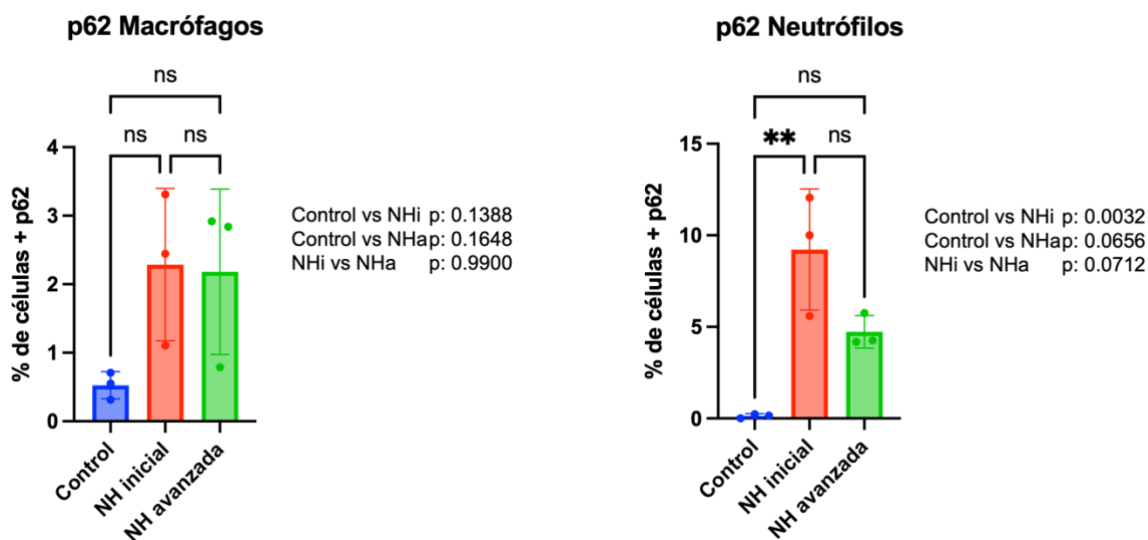


Figura 27. Cuantificación de células positivas para p62 en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*, en el modelo de NH inicial y NH avanzada. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las pruebas estadísticas y las gráficas se realizaron utilizando el programa Prism versión 6.0 (software

Graph-Pad), y $p < 0,05$ se consideró significativa. $N=3$ para cada grupo experimental. 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), <0.0001 (****).

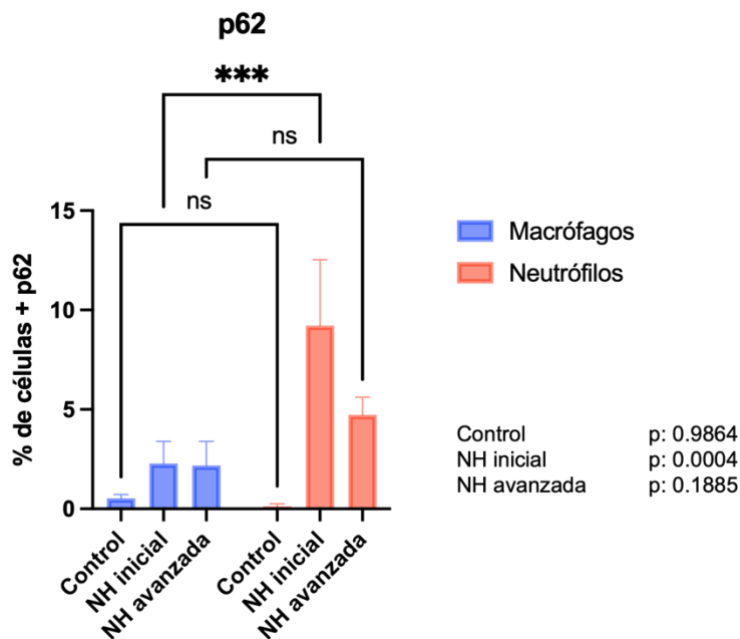


Figura 28. Comparación de la cuantificación de macrófagos y neutrófilos positivos para p62 en el pulmón de ratones control y pulmón proveniente de ratones tratados con *Saccharopolyspora rectivirgula*, en el modelo de NH inicial y NH avanzada. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA de dos vías, seguida de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Las prueba estadística y la gráfica se realizaron utilizando el programa Prism versión 6.0 (software Graph-Pad), y $p < 0,05$ se consideró significativa. $N=3$ para cada grupo experimental. 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), <0.0001 (****).

En resumen, observamos que la expresión de los principales marcadores de autofagia LC3B y p62 se induce en el pulmón en respuesta a la exposición frente a *Saccharopolyspora rectivirgula* principalmente en células inflamatorias como los son macrófagos y neutrófilos.

6. DISCUSIÓN

La autofagia es uno de los procesos que está relacionado con la patogénesis de diversas enfermedades respiratorias crónicas, como el cáncer de pulmón, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática, asma, hipertensión pulmonar, entre otras (Racanelli, et al., 2018). En esta tesis se evaluó la localización de LC3 y p62, por inmunohistoquímica después de la inducción de NH por *S. rectivirgula* en un modelo inicial de 2 semanas y uno avanzado de 3 semanas. LC3-II participa en la elongación y maduración del fagóforo y en la maduración del autofagosoma, por ello es un marcador del mismo. Por otro lado,

p62/SQSTM1 tiene una función dual, como centro de señalización y como proteína adaptadora dentro de la autofagia, ya que funciona como un receptor que se une a las dianas poliubiquitinadas que van a la degradación.

En este trabajo, los resultados histológicos mostraron un incremento en la celularidad especialmente de células inflamatorias, principalmente macrófagos y neutrófilos, así como, hipertrofia del epitelio alveolar en los pulmones de los ratones tratados con *S. rectivirgula*.

En el pulmón de ratones control, se observó un marcaje positivo tenue para LC3B en macrófagos y epitelio, al igual que para p62, que sólo se encontró en el epitelio bronquial y en escasos macrófagos. Es importante mencionar, que basado en la morfología celular, se reconocieron estos tipos celulares, sin embargo, para definir si efectivamente son ciertos tipos celulares, será necesario en un futuro hacer colocalización con marcadores específicos de cada tipo celular. Después de la inducción de NH en el modelo inicial y avanzado, las células predominantes fueron los neutrófilos, los macrófagos se encontraron en menor proporción, y no encontramos tinción positiva para linfocitos. La señal positiva para LC3B en neutrófilos fue muy intensa en NH tanto en el modelo inicial, como avanzado. Estos hallazgos nos hacen preguntarnos ¿cuál es el posible papel de la autofagia en los neutrófilos?

Se sabe que las primeras células en reclutarse en el pulmón son los neutrófilos por la secreción de IL-8 principalmente, esto se confirma por su abundancia en lavado bronquialveolar. Los neutrófilos participan en el desarrollo del daño pulmonar a lo largo del avance de la NH, al liberar diversas citocinas que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad por ejemplo el IFN- γ que colabora en la formación de granulomas, característicos de la etapa avanzada de NH, formados por macrófagos y células T rodeadas por fibroblastos (Hasan, et al., 2013), en los tejidos de los ratones del modelo de neumonitis no se encontró la presencia de granulomas, ya que éstos están asociados con procesos fibróticos resultado de modelos más extensos.

Se ha descrito que la autofagia regula las respuestas funcionales de las células del sistema inmune, como la fagocitosis, la presentación de antígenos, la producción de citocinas, establecimiento de tolerancia, degranulación y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, del inglés, *neutrophil extracellular traps*) entre otros mecanismos. Las NET son estructuras grandes, extracelulares, similares a redes, compuestas de proteínas citosólicas y granulares que se ensamblan en un andamiaje de cromatina descondensada. Las NET atrapan, neutralizan y matan bacterias, hongos, virus y parásitos, y se cree que previenen la diseminación de bacterias y hongos (Papayannopoulos V, 2018). Varios grupos han informado que la autofagia es necesaria para la

formación de NETs, la inhibición de PI3K previene la descondensación de la cromatina, la cual es esencial para la formación de NET y la netosis (Remijnsen, et al., 2011), también se ha documentado que la autofagia es esencial para la formación de NETs después de la infección neumocócica (Ullah, et al., 2017). Se ha documentado que la inhibición de la autofagia por inhibidores farmacológicos o por RNA de interferencia contra *Atg7* disminuye significativamente la generación de NET (Ma et al., 2016).

De manera muy relevante, recientemente se ha descrito que la autofagia participa en la diferenciación de neutrófilos y macrófagos. De acuerdo con un análisis global de RNA-seq de sangre humana, se reveló que durante la diferenciación monocítica y granulocítica participan 22 genes de autofagia, además, en otro estudio se demostró que la autofagia es esencial para la diferenciación normal de neutrófilos *in vivo*, pues la lipofagia controla la vía FAO-OXPHOS (oxidación de ácidos grasos-fosforilación oxidativa) que es crítica para el suministro de ATP en el proceso de diferenciación (Riffelmacher et al., 2017). La autofagia también ha sido implicada en la diferenciación de monocitos a macrófagos, pues su inhibición obstaculiza la diferenciación y producción de citocinas debido a la fosforilación de Bcl-2 mediada por JNK, y también se ha documentado su importancia en las funciones fisiológicas de los macrófagos y neutrófilos, como en la fagocitosis (Zhang et al., 2012; Jaquel et al., 2012).

En cuanto a p62, observamos que después de la inducción de NH hay una señal positiva fuerte en el epitelio bronquial y en macrófagos. La actividad de macrófagos y neutrófilos tiene repercusiones importantes en la NH, los macrófagos juegan un papel importante en promover la progresión de la inflamación pulmonar, las citocinas asociadas a células TH2 como IL-4 y IL-13 se ha documentado que inhiben la autofagia al impedir maduración del fagosoma, lo que ocasiona la supervivencia de micobacterias dentro de los macrófagos, estas citocinas están involucradas en la progresión de la enfermedad, esto puede sugerir que la autofagia en los macrófagos tienen un papel relevante en la patogénesis de la NH (Harris et al., 2007; Su, et al., 2015). La estimulación con *S. reactivus*, activa a los macrófagos y estos secretan citocinas como MIP-1 α , MCP-1, IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL5 y G-CSF, las cuales se encargan del reclutamiento de neutrófilos y linfocitos al pulmón, los macrófagos también son impulsores clave de la fibrogénesis, pues están involucrados en la respuesta sesgada por Th2 que participa en la remodelación fibrótica en la NH así como en la activación de fibroblastos al secretar citocinas profibróticas (Sxhulet et al., 2003; Vasakova, et al., 2019, Su, et al., 2015).

La posible participación de autofagia en macrófagos y neutrófilos, que observamos en el pulmón de ratones con NH, podría estar asociada a la xenofagia, que es un tipo de autofagia selectiva no canónica, la cual se encarga de detectar y eliminar patógenos intracelulares que escapan de los compartimentos endocíticos de la fagocitosis, sin embargo, la autofagia también puede participar de forma independiente de la fagocitosis por medio de la fagocitosis asociada a LC3 conocida como LAP (del inglés *LC3-associated phagocytosis*), en donde las bacterias en el fagosoma inducen la translocación de LC3, lo que ayuda a la maduración del fagosoma de una sola membrana así como su fusión con el lisosoma. Se ha documentado que la autofagia puede desempeñar un papel en la actividad bactericida mediada por macrófagos y neutrófilos contra bacterias multirresistentes, también se ha demostrado su papel en la infección neumocócica, donde, si se reduce la autofagia, la tasa de fagocitosis también baja (Itoh, et al., 2015; Ullah, et al., 2017).

La autofagia en macrófagos también puede cambiar sus patrones de secreción de citocinas, por ejemplo, controla negativamente la activación del inflamasoma en respuesta a estímulos inflamatorios al degradar sus componentes, lo que conduce a una activación reducida de la caspasa-1, bloqueando la conversión de precursores de citocinas como pro-IL-1 β y pro-IL-8 en sus formas activas, que de otra forma, se liberaría para realizar funciones proinflamatorias, por lo contrario, en ausencia de autofagia, hay una acumulación de mitocondrias disfuncionales lo que conduce a un aumento en los niveles intracelulares de ROS, como consecuencia se acelera la activación del inflamasoma y la caspasa-1, lo que resulta en una mayor secreción de estas citocinas (Harris, et al., 2011; Germic, et al., 2019). También la autofagia regula la secreción de IL-1 β en neutrófilos, cuando es inhibida por bafilomicina A1 o en el KO de ATG5, donde la liberación de IL-1 β fue inhibida en neutrófilos (Lula, et al., 2018).

La autofagia también afecta a la degranulación y producción de ROS por la NOX, pues los ratones deficientes de ATG5 y ATG7 muestran una degranulación deteriorada principalmente en gránulos primarios y secundarios con la excepción de la mieloperoxidasa (Bhattacharya, et al., 2015).

Nuestros resultados pueden sugerir, que la señal positiva para LC3B y p62 en macrófagos y neutrófilos, podría estar asociado a macroautofagia y a LAP, sin embargo también podría estar asociada a procesos independientes de autofagia. También será necesario confirmar los tipos celulares que sugerimos en esta tesis, haciendo colocalizaciones utilizando marcadores específicos de neutrófilos y macrófagos. En estudios futuros podría ser interesante poder inducir el modelo de NH en ratones deficientes de alguna proteína esencial de la autofagia, como el ratón deficiente de

LC3B o de p62, y poder monitorear si existen cambios en el desarrollo de neumonitis, en la infiltración de macrófagos y neutrófilos, o en la secreción de citocinas y quimiocinas, y también poder determinar si una deficiencia en el proceso de autofagia, promueve o previene el desarrollo de NH.

CONCLUSIONES

- 1) No se observó señal positiva en los controles negativos del protocolo de inmunohistoquímica.
- 2) En pulmones de ratones control hay identificación de señal positiva tenue para LC3B y p62, observada en epitelio y en algunos macrófagos.
- 3) La exposición de los ratones al antígeno *Saccharopolyspora rectivirgula* por vía intranasal induce la infiltración de células inflamatorias, principalmente neutrófilos y macrófagos en el pulmón, y un aumento en la expresión de LC3B y p62, observado como una tinción positiva intensa en éstas células.
- 4) La exposición de los ratones al antígeno *Saccharopolyspora rectivirgula* por vía intranasal induce un aumento en la expresión de p62 en el epitelio bronquial, observado como una tinción positiva intensa con un patrón granular.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abbas A, Lichtman, A. and Pillai, S. Cellular and molecular immunology. 9th ed. Philadelphia: ELSEVIER. 2018 pp.417-434.

Ando M, Hirayama K, Soda K, Okubo R, Araki S, Sasazuki T. HLA-DQw3 in Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis induced by *Trichosporon cutaneum*. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Oct;140(4):948-50. doi: 10.1164/ajrccm/140.4.948.

Andrews K, Ghosh MC, Schwingshackl A, Rapalo G, Luellen C, Waters CM, Fitzpatrick EA. Chronic hypersensitivity pneumonitis caused by *Saccharopolyspora rectivirgula* is not associated with a switch to a Th2 response. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Mar 1;310(5):L393-402. doi: 10.1152/ajplung.00305.2015.

Aquino-Galvez A, Camarena A, Montaña M, Juárez A, Zamora AC, González-Avila G, Checa M, Sandoval-López G, Vargas-Alarcon G, Granados J, Pardo A, Zúñiga J, Selman M. Transporter associated with antigen processing (TAP) 1 gene polymorphisms in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Exp Mol Pathol*. 2008 Apr;84(2):173-7. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.01.002.

Bernatchez E, Langlois A, Brassard J, Flamand N, Marsolais D, Blanchet MR. Hypersensitivity pneumonitis onset and severity is regulated by CD103 dendritic cell expression. *PLoS One*. 2017 Jun 19;12(6):e0179678. doi: 10.1371/journal.pone.0179678.

Bhan U, Newstead MJ, Zeng X, Podsaid A, Goswami M, Ballinger MN, Kunkel SL, Standiford TJ. TLR9-dependent IL-23/IL-17 is required for the generation of *Stachybotrys chartarum*-induced hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol*. 2013 Jan 1;190(1):349-56. doi: 10.4049/jimmunol.1202225.

Bhattacharya A, Wei Q, Shin JN, Abdel Fattah E, Bonilla DL, Xiang Q, Eissa NT. Autophagy Is Required for Neutrophil-Mediated Inflammation. *Cell Rep*. 2015 Sep 22;12(11):1731-9. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.019.

Blanchet MR, Israël-Assayag E, Cormier Y. Inhibitory effect of nicotine on experimental hypersensitivity pneumonitis in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Apr 15;169(8):903-9. doi: 10.1164/rccm.200210-1154OC.

Bonilla DL, Bhattacharya A, Sha Y, Xu Y, Xiang Q, Kan A, Jagannath C, Komatsu M, Eissa NT. Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity*. 2013 Sep 19;39(3):537-47. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.026.

Burleson SCM, Johnson V.J. Hypersensitivity Reactions in the Respiratory Tract. In: Abbate, M. Abukabda, A.B. Afonso, L. Aihara, E. Aki, T. Akingbasote, J.A. Al-Safi, Z. et al., ed. by. *Comprehensive Toxicology [Internet]*. 3rd ed. Elsevier Science; 2018.

Basil MC, Katzen J, Engler AE, Guo M, Herriges MJ, Kathiriya JJ, Windmueller R, Ysasi AB, Zacharias WJ, Chapman HA, Kotton DN, Rock JR, Snoeck HW, Vunjak-Novakovic G, Whitsett JA, Morrissey EE. The Cellular and Physiological Basis for Lung Repair and Regeneration: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*. 2020 Apr 2;26(4):482-502. doi: 10.1016/j.stem.2020.03.009.

Brune K, Frank J, Schwingshackl A, Finigan J, Sidhaye VK. Pulmonary epithelial barrier function: some new players and mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Apr 15;308(8):L731-45. doi: 10.1152/ajplung.00309.2014.

Cabrera S, Rodríguez-Bobadilla C, Vázquez-Morales D, Gaxiola M, Maciel M, Selman M, Pardo A. Identification of Autophagy-related Proteins in Lungs From Hypersensitivity Pneumonitis Patients. *J Histochem Cytochem*. 2020 Jun;68(6):365-376. doi: 10.1369/0022155420932103.

Camarena A, Aquino-Galvez A, Falfán-Valencia R, Sánchez G, Montaña M, Ramos C, Juárez A, García-de-Alba C, Granados J, Selman M. PSMB8 (LMP7) but not PSMB9 (LMP2) gene polymorphisms are associated to pigeon breeder's hypersensitivity pneumonitis. *Respir Med*. 2010 Jun;104(6):889-94. doi: 10.1016/j.rmed.2010.01.014.

Camarena A, Juárez A, Mejía M, Estrada A, Carrillo G, Falfán R, Zuñiga J, Navarro C, Granados J, Selman M. Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jun;163(7):1528-33. doi: 10.1164/ajrccm.163.7.2004023.

Cao W, Li J, Yang K, Cao D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull Cancer*. 2021 Mar;108(3):304-322. doi: 10.1016/j.bulcan.2020.11.004. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33423775.

Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, Sivridis E, Koffa M, Giatromanolaki A, Boumpas DT, Ritis K, Kambas K. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*. 2014 Jul;233(3):294-307. doi: 10.1002/path.4359.

Costabel U, Miyazaki Y, Pardo A, Koschel D, Bonella F, Spagnolo P, Guzman J, Ryerson CJ, Selman M. Hypersensitivity pneumonitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Aug 6;6(1):65. doi: 10.1038/s41572-020-0191-z. PMID: 32764620.

Coutts AS, La Thangue NB. Regulation of actin nucleation and autophagosome formation. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Sep;73(17):3249-63. doi: 10.1007/s00018-016-2224-z. Epub 2016 May 4. PMID: 27147468; PMCID: PMC4967107.

Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Jun;19(6):349-364. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4. PMID: 29618831.

Ding L, Yang J, Zhang C, Zhang X, Gao P. Neutrophils Modulate Fibrogenesis in Chronic Pulmonary Diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Apr 27;8:616200. doi: 10.3389/fmed.2021.616200.

Dovi JV, He LK, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol*. 2003 Apr;73(4):448-55. doi: 10.1189/jlb.0802406

Fernández Pérez ER, Kong AM, Raimundo K, Koelsch TL, Kulkarni R, Cole AL. Epidemiology of Hypersensitivity Pneumonitis among an Insured Population in the United States: A Claims-based Cohort Analysis. *Ann Am Thorac Soc*. 2018 Apr;15(4):460-469. doi: 10.1513/AnnalsATS.201704-288OC.

Firszt R, Francisco D, Church TD, Thomas JM, Ingram JL, Kraft M. Interleukin-13 induces collagen type-1 expression through matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor- β 1

in airway fibroblasts in asthma. *Eur Respir J.* 2014 Feb;43(2):464-73. doi: 10.1183/09031936.00068712.

Fong DJ, Hogaboam CM, Matsuno Y, Akira S, Uematsu S, Joshi AD. Toll-like receptor 6 drives interleukin-17A expression during experimental hypersensitivity pneumonitis. *Immunology.* 2010 May;130(1):125-36. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03219.x

Furuiye M, Miyake S, Miyazaki Y, Ohtani Y, Inase N, Umino T, Yoshizawa Y. Effect of cigarette smoking on the development of murine chronic pigeon breeder's lung. The difference between a short-term and a long-term exposure. *J Med Dent Sci.* 2007 Mar;54(1):87-95.

Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Dikic I, Eskelinen EL, Fimia GM, Fulda S, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Harper JW, Jäättelä M, Johansen T, Juhasz G, Kimmelman AC, Kraft C, Ktistakis NT, Kumar S, Levine B, Lopez-Otin C, Madeo F, Martens S, Martinez J, Melendez A, Mizushima N, Münz C, Murphy LO, Penninger JM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Santambrogio L, Scorrano L, Simon AK, Simon HU, Simonsen A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Kroemer G. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017 Jul 3;36(13):1811-1836. doi: 10.15252/embj.201796697. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28596378; PMCID: PMC5494474.

Galluzzi L, Green DR. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell.* 2019 Jun 13;177(7):1682-1699. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.026. PMID: 31199916; PMCID: PMC7173070.

García de Alba C, Buendía-Roldán I, Salgado A, Becerril C, Ramírez R, González Y, Checa M, Navarro C, Ruiz V, Pardo A, Selman M. Fibrocytes contribute to inflammation and fibrosis in chronic hypersensitivity pneumonitis through paracrine effects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 Feb 15;191(4):427-36. doi: 10.1164/rccm.201407-1334OC

Gaxiola M, Buendía-Roldán I, Mejía M, Carrillo G, Estrada A, Navarro MC, Rojas-Serrano J, Selman M. Morphologic diversity of chronic pigeon breeder's disease: clinical features and survival. *Respir Med.* 2011 Apr;105(4):608-14. doi: 10.1016/j.rmed.2010.11.026.

Gerald T, N., 2021. El complejo mayor de histocompatibilidad. In: D. Kasper, A. Fauci, S. Hauser, D. Longo, L. Jameson and J. Loscalzo, ed., *Harrison principios de medicina interna*, 19th ed. Mc Graw Hill Castellano.

Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S. et al. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death Differ* 26, 715–727 (2019).

Girard M, Israël-Assayag E, Cormier Y. Impaired function of regulatory T-cells in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J.* 2011 Mar;37(3):632-9. doi: 10.1183/09031936.00055210.

- Glick D**, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010 May;221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697. PMID: 20225336; PMCID: PMC2990190.
- Harris J**, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M, Deretic V. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):505-17. doi: 10.1016/j.immuni.2007.07.022.
- Harris J**, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, Lambe EM, Creagh EM, Golenbock DT, Tschopp J, Kornfeld H, Fitzgerald KA, Lavelle EC. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem*. 2011 Mar 18;286(11):9587-97. doi: 10.1074/jbc.M110.202911.
- Hasan SA**, Eksteen B, Reid D, Paine HV, Alansary A, Johannson K, Gwozd C, Goring KA, Vo T, Proud D, Kelly MM. Role of IL-17A and neutrophils in fibrosis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Jun;131(6):1663-73. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.015
- Higashino-Kameda M**, Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Anzawa K, Mochizuki T, Makimura K, Saijo S, Iwakura Y, Toga H, Nakamura A. A critical role of Dectin-1 in hypersensitivity pneumonitis. *Inflamm Res*. 2016 Mar;65(3):235-44. doi: 10.1007/s00011-015-0910-1.
- Huang Y**, Tan P, Wang X, Yi Y, Hu Y, Wang D, Wang F. Transcriptomic insights into temporal expression pattern of autophagy genes during monocytic and granulocytic differentiation. *Autophagy*. 2018;14(3):558-559. doi: 10.1080/15548627.2018.1425060.
- Hurley JH**, Young LN. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86:225-244. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044820. Epub 2017 Mar 15. PMID: 28301741; PMCID: PMC5604869.
- Inoue Y**, Ishizuka M, Furusawa H, Honda T, Kawahara T, Tateishi T, Miyazaki Y. Acute inflammatory and immunologic responses against antigen in chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis. *Allergol Int*. 2019 Jul;68(3):321-328. doi: 10.1016/j.alit.2018.12.010.
- Ishizuka M**, Miyazaki Y, Masuo M, Suhara K, Tateishi T, Yasui M, Inase N. Interleukin-17A and Neutrophils in a Murine Model of Bird-Related Hypersensitivity Pneumonitis. *PLoS One*. 2015 Sep 14;10(9):e0137978. doi: 10.1371/journal.pone.0137978.
- Itoh H**, Matsuo H, Kitamura N, Yamamoto S, Higuchi T, Takematsu H, Kamikubo Y, Kondo T, Yamashita K, Sasada M, Takaori-Kondo A, Adachi S. Enhancement of neutrophil autophagy by an IVIG preparation against multidrug-resistant bacteria as well as drug-sensitive strains. *J Leukoc Biol*. 2015 Jul;98(1):107-17. doi: 10.1189/jlb.4A0813-422RRR.
- Iula L**, Keitelman IA, Sabbione F, Fuentes F, Guzman M, Galletti JG, Gerber PP, Ostrowski M, Geffner JR, Jancic CC, Trevani AS. Autophagy Mediates Interleukin-1 β Secretion in Human Neutrophils. *Front Immunol*. 2018 Feb 19;9:269. doi: 10.3389/fimmu.2018.00269.
- J.Y. Lee**, H. Koga, Y. Kawaguchi, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy *EMBO J*, 29 (2010), pp. 969-980

Jacquel A, Obba S, Boyer L, Dufies M, Robert G, Gounon P, Lemichez E, Luciano F, Solary E, Auberger P. Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. *Blood*. 2012 May 10;119(19):4527-31. doi: 10.1182/blood-2011-11-392167.

Jeong SJ, Zhang X, Rodriguez-Velez A, Evans TD, Razani B. p62/SQSTM1 and Selective Autophagy in Cardiometabolic Diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2019 Aug 20;31(6):458-471. doi: 10.1089/ars.2018.7649. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30588824; PMCID: PMC6653798.

Jiménez-Alvarez L, Arreola JL, Ramírez-Martínez G, Ortiz-Quintero B, Gaxiola M, Reynoso-Robles R, Avila-Moreno F, Urrea F, Pardo A, Selman M, Zuñiga J. The effect of CTLA-4Ig, a CD28/B7 antagonist, on the lung inflammation and T cell subset profile during murine hypersensitivity pneumonitis. *Exp Mol Pathol*. 2011 Dec;91(3):718-22. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.09.010.

Jimenez-Alvarez L, Ziga J, Gaxiola M, Checa M, Becerril C, Mendoza F, Pardo A, Selman M. Inflammatory response and dynamics of lung T cell subsets in Th1, Th2 biased and Th2 deficient mice during the development of hypersensitivity pneumonitis. *Exp Mol Pathol*. 2010 Jun;88(3):407-15. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.03.002.

Johansson E, Boivin GP, Yadav JS. Early immunopathological events in acute model of mycobacterial hypersensitivity pneumonitis in mice. *J Immunotoxicol*. 2017 Dec;14(1):77-88. doi: 10.1080/1547691X.2016.1273284.

Joshi AD, Fong DJ, Oak SR, Trujillo G, Flaherty KR, Martinez FJ, Hogaboam CM. Interleukin-17-mediated immunopathogenesis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Apr 15;179(8):705-16. doi: 10.1164/rccm.200811-1700OC.

Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, Ktistakis NT. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci*. 2013 Nov 15;126(Pt 22):5224-38. doi: 10.1242/jcs.132415. Epub 2013 Sep 6. PMID: 24013547.

Kim BW, Jin Y, Kim J, Kim JH, Jung J, Kang S, Kim IY, Kim J, Cheong H, Song HK. The C-terminal region of ATG101 bridges ULK1 and PtdIns3K complex in autophagy initiation. *Autophagy*. 2018;14(12):2104-2116. doi: 10.1080/15548627.2018.1504716. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30081750; PMCID: PMC6984762.

Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. *Eur Respir J*. 2011 Aug;38(2):415-24. doi: 10.1183/09031936.00070610.

Leone PM, Richeldi L. Current Diagnosis and Management of Hypersensitivity Pneumonitis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2020 Apr;83(2):122-131. doi: 10.4046/trd.2020.0012. Epub 2020 Mar 10.

- Levine B**, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*. 2019 Jan 10;176(1-2):11-42. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.048. PMID: 30633901; PMCID: PMC6347410.
- Liao SX**, Sun PP, Gu YH, Rao XM, Zhang LY, Ou-Yang Y. Autophagy and pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis*. 2019 Jan-Dec;13:1753466619890538. doi: 10.1177/1753466619890538. PMID: 31771432; PMCID: PMC6887802
- Lima JG**, de Freitas Vinhas C, Gomes IN, Azevedo CM, dos Santos RR, Vannier-Santos MA, Veras PS. Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Feb 25;405(4):604-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.076.
- Lőrincz P**, Juhász G. Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Mol Biol*. 2020 Apr 3;432(8):2462-2482. doi: 10.1016/j.jmb.2019.10.028. Epub 2019 Nov 2. PMID: 31682838.
- Lorzadeh S**, Kohan L, Ghavami S, Azarpira N. Autophagy and the Wnt signaling pathway: A focus on Wnt/ β -catenin signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2021 Mar;1868(3):118926. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118926. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33316295.
- Lopez-Rodriguez E**, Pérez-Gil J. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1568-85. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.028.
- Ma R**, Li T, Cao M, Si Y, Wu X, Zhao L, Yao Z, Zhang Y, Fang S, Deng R, Novakovic VA, Bi Y, Kou J, Yu B, Yang S, Wang J, Zhou J, Shi J. Extracellular DNA traps released by acute promyelocytic leukemia cells through autophagy. *Cell Death Dis*. 2016 Jun 30;7(6):e2283. doi: 10.1038/cddis.2016.186.
- Madigan M**, Martinko J, Bender K, Buckley D, Stahl D. Brock. *Biologia de los microorganismos*. 14th ed. Madrid: Pearson; 2015. p. 535-538.
- Mak**, T. W., Ph., M. S. E., & Jett, B. D. (2014). *Primer to the Immune Response* (2nd ed.). Academic Cell.
- Mizushima N**, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):728-41. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Martin TR**, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(5):403-411. doi:10.1513/pats.200508-090JS.
- Michaeloudes C**, Bhavsar PK, Mumby S, Xu B, Hui CKM, Chung KF, Adcock IM. Role of Metabolic Reprogramming in Pulmonary Innate Immunity and Its Impact on Lung Diseases. *J Innate Immun*. 2020;12(1):31-46. doi: 10.1159/000504344.
- Momtazmanesh S**, Rezaei N. Hypersensitivity, *Encyclopedia of Infection and Immunity*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00032-X>.

Morell F, Villar A, Ojanguren I, Muñoz X, Cruz MJ, Sansano I, Ramon MA, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis and (Idiopathic) Pulmonary Fibrosis Due to Feather Duvets and Pillows. *Arch Bronconeumol*. 2021 Feb;57(2):87-93. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arbres.2019.12.003.

Mundt C, Becker WM, Schlaak M. Farmer's lung: patients' IgG2 antibodies specifically recognize *Saccharopolyspora rectivirgula* proteins and carbohydrate structures. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Aug;98(2):441-50. doi: 10.1016/s0091-6749(96)70169-0.

Nance SC, Yi AK, Re FC, Fitzpatrick EA. MyD88 is necessary for neutrophil recruitment in hypersensitivity pneumonitis. *J Leukoc Biol*. 2008 May;83(5):1207-17. doi: 10.1189/jlb.0607391

Nizri E, Irony-Tur-Sinai M, Lory O, Orr-Urtreger A, Lavi E, Brenner T. Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses. *J Immunol* 2009;183:6681–6688.

Nogueira R, Melo N, Novais E Bastos H, Martins N, Delgado L, Morais A, C Mota P. Hypersensitivity pneumonitis: Antigen diversity and disease implications. *Pulmonology*. 2019 Mar-Apr;25(2):97-108. doi: 10.1016/j.pulmoe.2018.07.003.

Painter JD, Galle-Treger L, Akbari O. Role of Autophagy in Lung Inflammation. *Front Immunol*. 2020 Jul 7;11:1337. doi: 10.3389/fimmu.2020.01337. PMID: 32733448; PMCID: PMC7358431.

Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, Mejía M, Selman M. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May;161(5):1698-704. doi: 10.1164/ajrccm.161.5.9907065.

Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 Feb;18(2):134-147

Pawlina, W. and Ross, M., 2017. *Histologia*. 7th ed. Barcelona: Wolters Kluwer.

Racanelli AC, Kikkers SA, Choi AMK, Cloonan SM. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. *Autophagy*. 2018;14(2):221-232. doi: 10.1080/15548627.2017.1389823. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29130366; PMCID: PMC5902194.

Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, Vandenabeele P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*. 2011 Feb;21(2):290-304. doi: 10.1038/cr.2010.150.

Riches DWH, Martin TR. Overview of Innate Lung Immunity and Inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018;1809:17-30. doi: 10.1007/978-1-4939-8570-8_2.

Riffelmacher T, Clarke A, Richter FC, Stranks A, Pandey S, Danielli S, Hublitz P, Yu Z, Johnson E, Schwerd T, McCullagh J, Uhlig H, Jacobsen SEW, Simon AK. Autophagy-Dependent

Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation. *Immunity*. 2017 Sep 19;47(3):466-480.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.005.

Schäfer J, Kämpfer P, Jäckel U. Detection of *Saccharopolyspora rectivirgula* by quantitative real-time PCR. *Ann Occup Hyg*. 2011 Jul;55(6):612-9. doi: 10.1093/annhyg/mer018.

Schmeisser K, Parker JA. Pleiotropic Effects of mTOR and Autophagy During Development and Aging. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Sep 11;7:192. doi: 10.3389/fcell.2019.00192. PMID: 31572724; PMCID: PMC6749033.

Schuyler M, Gott K, Cherne A. Experimental hypersensitivity pneumonitis: role of MCP-1. *J Lab Clin Med*. 2003 Sep;142(3):187-95. doi: 10.1016/S0022-2143(03)00107-0.

Selman M, Pardo A, King TE Jr. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Aug 15;186(4):314-24. doi: 10.1164/rccm.201203-0513CI. Epub 2012 Jun 7.

Selman M, Terán L, Mendoza A, Camarena A, Martínez-Cordero E, Lezama M, Rubio H. Increase of HLA-DR7 in pigeon breeder's lung in a Mexican population. *Clinical Immunology and Immunopathology [Internet]*. 1987, Oct 7; 44(1):63-70.

Søreng K, Neufeld TP, Simonsen A. Membrane Trafficking in Autophagy. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2018;336:1-92. doi: 10.1016/bs.ircmb.2017.07.001. E.

Su S, Zhao Q, He C, Huang D, Liu J, Chen F, Chen J, Liao JY, Cui X, Zeng Y, Yao H, Su F, Liu Q, Jiang S, Song E. miR-142-5p and miR-130a-3p are regulated by IL-4 and IL-13 and control profibrogenic macrophage program. *Nat Commun*. 2015 Oct 5;6:8523. doi: 10.1038/ncomms9523.

Treuting, P., Dintzis, S. and Montine, K., 2018. *Comparative anatomy and histology*. 2nd ed. Elsevier, pp.147-163.

Ullah I, Ritchie ND, Evans TJ. The interrelationship between phagocytosis, autophagy and formation of neutrophil extracellular traps following infection of human neutrophils by *Streptococcus pneumoniae*. *Innate Immun*. 2017 Jul;23(5):413-423. doi: 10.1177/1753425917704299

Vasakova M, Morell F, Walsh S, Leslie K, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis: Perspectives in Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Sep 15;196(6):680-689. doi: 10.1164/rccm.201611-2201PP.

Vasakova M, Selman M, Morell F, Sterclova M, Molina-Molina M, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis: Current Concepts of Pathogenesis and Potential Targets for Treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Aug 1;200(3):301-308. doi: 10.1164/rccm.201903-0541PP.

Wei Y, Liu M, Li X, Liu J, Li H. Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. *Biomed Res Int*. 2018 Sep 24;2018:1012789. doi: 10.1155/2018/1012789.

Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 2015 Jan;16(1):27-35. doi: 10.1038/ni.3045.

Wu A, Song H. Regulation of alveolar type 2 stem/progenitor cells in lung injury and regeneration. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2020 Jul 10;52(7):716-722. doi: 10.1093/abbs/gmaa052.

Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 2011 Jul 4;208(7):1339-50. doi: 10.1084/jem.20110551

Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*. 2018;14(2):207-215. doi: 10.1080/15548627.2017.1378838.

Yu X, Long YC, Shen HM. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy*. 2015;11(10):1711-28. doi: 10.1080/15548627.2015.1043076.

Zhang Y, Morgan MJ, Chen K, Choksi S, Liu ZG. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood*. 2012 Mar 22;119(12):2895-905. doi: 10.1182/blood-2011-08-372383.

Zhen Y, Spangenberg H, Munson MJ, Brech A, Schink KO, Tan KW, Sørensen V, Wenzel EM, Radulovic M, Engedal N, Simonsen A, Raiborg C, Stenmark H. ESCRT-mediated phagophore sealing during mitophagy. *Autophagy*. 2020 May;16(5):826-841. doi: 10.1080/15548627.2019.1639301.