



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOMEDICINA

**“ANÁLISIS DE BIOMARCADORES DE AUTOFAGIA EN PACIENTES
CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. CAROLINA RODRÍGUEZ BOBADILLA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SANDRA CABRERA BENITEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ CISNEROS LIRA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”, INER

DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”, INER

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AGOSTO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOMEDICINA

**“ANÁLISIS DE BIOMARCADORES DE AUTOFAGIA EN PACIENTES
CON NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. CAROLINA RODRÍGUEZ BOBADILLA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SANDRA CABRERA BENITEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ CISNEROS LIRA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”, INER

DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”, INER

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AGOSTO, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/0236/2022
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **16 de mayo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **RODRÍGUEZ BOBADILLA CAROLINA** con número de cuenta **312112831** con la tesis titulada **"Análisis de biomarcadores de autofagia en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS**
Vocal: **DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO**
Vocal: **DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN**
Vocal: **DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA**
Secretario: **DR. JOSÉ GUADALUPE CISNEROS LIRA**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 14 de junio de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- a) Primeramente, agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo uno de los objetivos académicos en mi plan de vida.

- b) A continuación, agradezco el apoyo económico recibido por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para poder realizar mis estudios e investigación de posgrado, así como al apoyo recibido por parte del programa de investigación UNAM-PAPIIT, con número IN211818 y IN202221, y al Programa de Investigación SEP-CONACYT con el número de proyecto 235891.

- c) Finalmente, agradezco encarecidamente a mi Tutora Principal, la Dra. Sandra Cabrera Benítez, ya que sin su constante apoyo, comprensión y mentoría esta tesis no hubiera sido ni la mitad de lo que es actualmente. Así mismo, agradezco a los distinguidos miembros de mi Comité Tutor, al Dr. José Cisneros Lira y al Dr. Ramcés Falfán Valencia, por la disposición de continuar el proceso en línea y el compromiso con el que orientaron este trabajo con el enfoque interdisciplinario que lo distingue.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Gracias infinitas a mi familia por apoyarme incondicionalmente para seguir estudiando lo que me interesa y dejar que me desarrolle académicamente mientras me brindan un ambiente lleno de amor y comprensión. Fue muy difícil mantener el enfoque en medio de una pandemia, pero a pesar de los tropiezos que tuve no dejaron que me descarrilara. Los amo por siempre.

Nuevamente me gustaría agradecer a mi tutora, la Dra. Sandra Cabrera, porque además de ser un ejemplo de profesionalismo y dedicación, afianzó su lugar como mi segunda mamá y mi amiga durante todo el tiempo que hemos estado conviviendo juntas. Su empuje me permitió no darme por vencida durante mis momentos más difíciles y me demostró una paciencia inmensa.

Gracias a mis amigas, Silvia Quintero Esquivel y Perla Viridiana Pérez Tepoz, por mantenerme cuerda en estos tiempos pandémicos y nunca dejarme sola a pesar de la distancia y todo lo que nos tocó vivir. Es una bendición haberlas conocido.

Gracias a Ricardo Agustín Sánchez Mancera, Guty, por una maravillosa amistad y por el apoyo emocional que siempre está dispuesto a brindarme. Te quiero mil.

En memoria de Javier Bobadilla Herrera. Te amaré por siempre y te extraño.

A mi mamá, Carmen Lilia.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACIONES

LISTA DE ESQUEMAS, FIGURAS Y TABLAS

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 EL SISTEMA RESPIRATORIO.....	3
1.2 ENFERMEDADES PULMONARES INTERSTICIALES.....	6
1.3 NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD (NH).....	8
1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA NH.....	9
1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA NH.....	9
1.6 FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL DESARROLLO DE NH.....	10
1.6.1 FACTORES GENÉTICOS.....	10
1.6.2 TIPO DE ANTÍGENO CAUSAL.....	11
1.6.3 RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS.....	13
1.6.4 PROCESAMIENTO Y EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS.....	14
1.6.5 RESPUESTAS HIPERSENSIBLES DEL SISTEMA INMUNE.....	15
1.6.6 RESPUESTA INFLAMATORIA.....	17
1.6.7 RESPUESTA HUMORAL.....	17
1.6.8 ACUMULACIÓN DE LINFOCITOS Y FORMACIÓN DE GRANULOMAS.....	17
1.7 RESPUESTA FIBROPROLIFERATIVA EN NH.....	18
2. ANTECEDENTES.....	20
2.1 AUTOFAGIA EN EL PULMÓN Y EN ENFERMEDADES PULMONARES.....	20
2.2 AUTOFAGIA.....	22

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	31
4. JUSTIFICACIÓN.....	32
5. HIPÓTESIS.....	33
6. OBJETIVOS.....	34
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	34
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
7.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	35
7.2 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	35
7.3 WESTERN BLOT.....	36
7.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	36
8. RESULTADOS.....	37
8.1 INMUNOLOCALIZACIÓN DE LC3B.....	39
8.2 INMUNOLOCALIZACIÓN DE P62/SQSTM1.....	41
8.3 INMUNOLOCALIZACIÓN DE ATG4B.....	44
8.4 INMUNOLOCALIZACIÓN DE ATG5 Y ATG7.....	46
8.5 WESTERN BLOT.....	51
9. DISCUSIÓN.....	57
10. CONCLUSIONES.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE ABREVIACIONES

ALIS. Agregados proteicos que contienen ubiquitina, por sus siglas en inglés.

ALR. Reformación de lisosomas autofágicos, por sus siglas en inglés.

LAP. Fagocitosis asociada a LC3B, por sus siglas en inglés.

LAMP2A. Glicoproteína 2 de membrana asociada a lisosomas, por sus siglas en inglés.

LC3A. Proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3 alfa, por sus siglas en inglés.

LC3B. Proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3 beta, por sus siglas en inglés.

LC3C. Proteína asociada a microtúbulos 1 de cadena ligera 3 gamma, por sus siglas en inglés

LMNB1. Lámina B1.

MEC. Matriz Extracelular

mTORC1. Complejo 1 del blanco característico de mamíferos de rapamicina, por sus siglas en inglés.

mTOR. Blanco característico de mamíferos de rapamicina por sus siglas en inglés.

NADH. Nicotinamida adenina dinucleótido.

NBR1. Receptor cargo de autofagia NBR1.

NDP52. Proteína 52 del dominio nuclear 10, por sus siglas en inglés.

NF- κ B. Factor nuclear kappa beta.

NH. Neumonitis por hipersensibilidad.

NIX. Proteína 3 similar a la proteína que interactúa con BCL2.

NOD. Dominio de oligomerización de nucleótidos, por sus siglas en inglés.

NOX2. NADPH oxidasa 2.

NRF2. Factor nuclear derivado de eritroides 2, tipo 2, por sus siglas en inglés.

NUAK2. Cinasa 2 similar a SNF1 de la familia NUAK.

PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas, por sus siglas en inglés.

PE. Fosfatidiletanolamina, por sus siglas en inglés.

PIK3C3. Subunidad catalítica de fosfatidilinositol 3-cinasa tipo 3, por sus siglas en inglés.

PIK3R4. Subunidad 4 reguladora de fosfoinosítido 3-cinasa, por sus siglas en inglés.

PINK1. Serina/treonina cinasa mitocondrial.

RAB7. Proteína Rab-7 relacionada con Ras.

RUBCN. Regulador de autofagia Rubicon.

SDF1. Factor 1 derivado de células del estroma, por sus siglas en inglés.

SEC62. Factor homólogo de translocación de proteínas del retículo endoplásmico.

Smurf1. E3 ubiquitina-proteína ligasa SMURF1.

SNARE. Receptor de proteínas solubles de unión al factor sensible a la N-etilmaleimida, por sus siglas en inglés.

SQSTM1. Sequestosome 1.

TEX264. Proteína 264 expresada en testículo.

TGF. Factor de crecimiento transformante, por sus siglas en inglés.

TGF-β1. Factor de crecimiento transformante β1, por sus siglas en inglés.

TLR. Receptores Toll-like, por sus siglas en inglés.

TNF-α. Factor de necrosis tumoral alfa, por sus siglas en inglés.

TRIM16. Miembro 16 de la familia de proteínas de dedos de zinc de caja B con motivos tripartitos.

ULK1. Unc-51 similar a la autofagia que activa la cinasa 1, por sus siglas en inglés.

ULK2. Unc-51 similar a la autofagia que activa la cinasa 2, por sus siglas en inglés.

UVRAG. Proteína asociada a la resistencia a la radiación UV, por sus siglas en inglés.

VCP ATPasa. ATPasa transicional del retículo endoplásmico.

WIPI. Proteína que interactúa con el fosfoinosítido del dominio de repetición WD

WIPI2. Proteína 2 que interactúa con el fosfoinosítido del dominio de repetición WD, por sus siglas en inglés.

WIPI4. Proteína 4 que interactúa con el fosfoinosítido del dominio de repetición WD, por sus siglas en inglés

LISTA DE ESQUEMAS. FIGURAS Y TABLAS

Esquema 1. El sistema respiratorio.

Esquema 2. Clasificación de enfermedades pulmonares intersticiales.

Esquema 3. Neumonitis por hipersensibilidad.

Esquema 4. Macroautofagia.

Esquema 5. Subtipos de macroautofagia selectiva.

Esquema 6. Microautofagia.

Esquema 7. Autofagia mediada por chaperonas (CAM).

Esquema 8. Participación de diferentes proteínas en el proceso central de autofagia.

Figura 1. Microfotografías representativas de los tejidos control negativo (tejidos incubados sin anticuerpo primario y con anticuerpo secundario anti-conejo y estreptavidina).

Figura 2. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de LC3B en el pulmón de sujetos control

Figura 3. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de LC3B en el pulmón de pacientes con NH.

Figura 4. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de p62/SQSTM1 en el pulmón de individuos control

Figura 5. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de p62/SQSTM1 en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH.

Figura 6. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG4B en el pulmón de sujetos control.

Figura 7. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG4B en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH.

Figura 8. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG5 en el pulmón de sujetos control.

Figura 9. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG5 en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH

Figura 10. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG7 en el pulmón de sujetos control.

Figura 11. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG7 en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH.

Figura 12. Resultados de Western blot de los marcadores de autofagia y cuantificación por densitometría.

Figura 13. Microfotografía representativa de los distintos marcadores de autofagia identificados en el mismo campo en el pulmón de un sujeto control.

Figura 14. Microfotografía representativa de los distintos marcadores de autofagia identificados en el mismo campo en el pulmón de un paciente con NH.

Tabla 1. Antígenos asociados con el desarrollo de NH.

Tabla 2. Análisis semicuantitativo de hallazgos inmunohistoquímicos en cortes de tejido pulmonar de pacientes con NH vs sujetos control.

RESUMEN

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad pulmonar causada por la exposición a una amplia gama de partículas orgánicas. En individuos susceptibles, estos antígenos provocan una respuesta inmune exacerbada; sin embargo, no se ha estudiado el papel de la autofagia en la patogénesis de esta enfermedad, aunque este proceso celular juega un papel crítico en la inflamación al regular la homeostasis y supervivencia de las células inflamatorias, así como promover proteínas pro-inflamatorias en otras enfermedades pulmonares.

Esta tesis tuvo como objetivo explorar los tipos celulares que expresan proteínas clave de la autofagia, así como la localización subcelular de éstas (LC3B, p62/SQSTM1, ATG4B, ATG5 y ATG7) en tejidos pulmonares de pacientes con NH e individuos control mediante inmunohistoquímica y analizar los niveles de expresión proteica mediante Western blot.

Los tejidos pulmonares de pacientes con NH mostraron una alta reactividad de los biomarcadores de autofagia LC3B, p62/SQSTM1, ATG5 y ATG7 en contraste con el tejido pulmonar sano; las células positivas fueron esencialmente células epiteliales alveolares y bronquiales, macrófagos y neutrófilos. Además, se observó un citoplasma altamente reactivo para las proteínas LC3B, p62/SQSTM1, ATG5 y ATG7 en células epiteliales alveolares con características metaplásicas adyacentes a focos de fibroblastos y células del epitelio bronquial. En cuanto a los macrófagos, se observó un patrón de coloración punteado para la proteína LC3B, lo que podría indicar una asociación con autofagosomas en el citoplasma de estos macrófagos. Se encontró un patrón similar para el receptor de autofagia p62/SQSTM1 y la enzima ATG4B.

Inesperadamente, también se observó una señal nuclear de p62/SQSTM1 en los macrófagos de los pacientes con NH. Además, se observó una tinción positiva de ATG5 y ATG7 en neutrófilos, células de músculo liso vascular y células endoteliales. Estos hallazgos proporcionan evidencia por primera vez de que las proteínas de la maquinaria de autofagia se expresan en gran medida en los pulmones de los pacientes con NH. Además, indica que la autofagia podría estar participando activamente en las células epiteliales frente al daño y regulación de la homeostasis de los macrófagos.

Palabras clave: ATG4B, ATG5, ATG7, LC3, p62/SQSTM1, fibrosis pulmonar, macrófagos, neumonitis por hipersensibilidad.

ABSTRACT

Hypersensitivity pneumonitis (HP) is a pulmonary disease caused by exposure to a wide variety of organic particles. In susceptible individuals, these antigens provoke an exaggerated immune response; however, the role of autophagy has not been studied in the pathogenesis of this disease even though it plays a critical role in inflammation by regulating the homeostasis and survival of inflammatory cells and promoting pro-inflammatory proteins in other pulmonary diseases.

This thesis aimed to explore the cell types that express essential autophagy proteins and their subcellular localization (LC3B, p62/SQSTM1, ATG4B, ATG5, and ATG7) in lung tissues of HP patients and control individuals by immunohistochemistry and to analyze protein expression levels by Western blot.

The lung tissues of patients with HP showed a high reactivity of the autophagy biomarkers LC3B, p62/SQSTM1, ATG5, and ATG7 compared to healthy lung tissue; positive cells were essentially alveolar and bronchial epithelial cells, macrophages, and neutrophils. In addition, a highly reactive cytoplasm for LC3B, p62/SQSTM1, ATG5, and ATG7 proteins is observed in alveolar epithelial cells with metaplastic characteristics adjacent to fibroblast foci and cells of the bronchial epithelium. Regarding macrophages, a dotted pattern is observed for the LC3B protein, which could indicate that it is associated with autophagosomes in the cytoplasm of these macrophages. A similar pattern was found for the autophagy receptor p62/SQSTM1 and the enzyme ATG4B.

Unexpectedly, a nuclear p62/SQSTM1 signal was also noticed in macrophages from HP lungs. In addition, positive staining of ATG5 and ATG7 was observed in neutrophils, vascular smooth muscle cells, and endothelial cells.

These findings provide first-time evidence that proteins from the autophagy machinery are highly expressed in the lungs of HP patients. Furthermore, it shows that autophagy could be actively participating in the activation of epithelial cells against damage and regulate macrophage homeostasis.

Key Words: ATG4B, ATG5, ATG7, LC3, p62/SQSTM1, lung fibrosis, macrophages, hypersensitivity pneumonitis

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL SISTEMA RESPIRATORIO

El sistema respiratorio se compone por vías respiratorias las cuales se encuentran ramificadas en un sistema de conducción de aire dentro de los pulmones y comprenden una serie de superficies de intercambio gaseoso (Basil M. et al., 2020).

Como se representa en el **esquema 1**, el sistema de conducción de aire está compuesto por la cavidad nasal, los senos paranasales, la nasofaringe, orofaringe y laringe; en estas cavidades ocurre la limpieza, calentamiento y humectación del aire que ingresa por las fosas nasales. La mayoría de las partículas y antígenos que son inhalados del medio ambiente, son atrapados por el moco producido en las vías respiratorias proximales; este moco sirve como primera línea de defensa inmunológica del individuo (Basil M. et al., 2020).

A medida que el aire sigue su camino a través del sistema de conducción hacia zonas más distales, llega a la tráquea; un tubo de cartílago que se divide repetidamente en secciones de menor diámetro hasta ramificarse en muchas secciones dentro de los pulmones (Young B. et al., 2013)

Los pulmones son un par de órganos localizados en la cavidad torácica. El pulmón derecho es más grande en comparación con el pulmón izquierdo debido a la posición anatómica del corazón (Aung H. et al, 2019) y los lóbulos pulmonares varían en tamaño y forma, pero cada lóbulo tiene un solo bronquio primario el cual se ramifica para formar los bronquios secundarios y terciarios (Young B. et al., 2013).

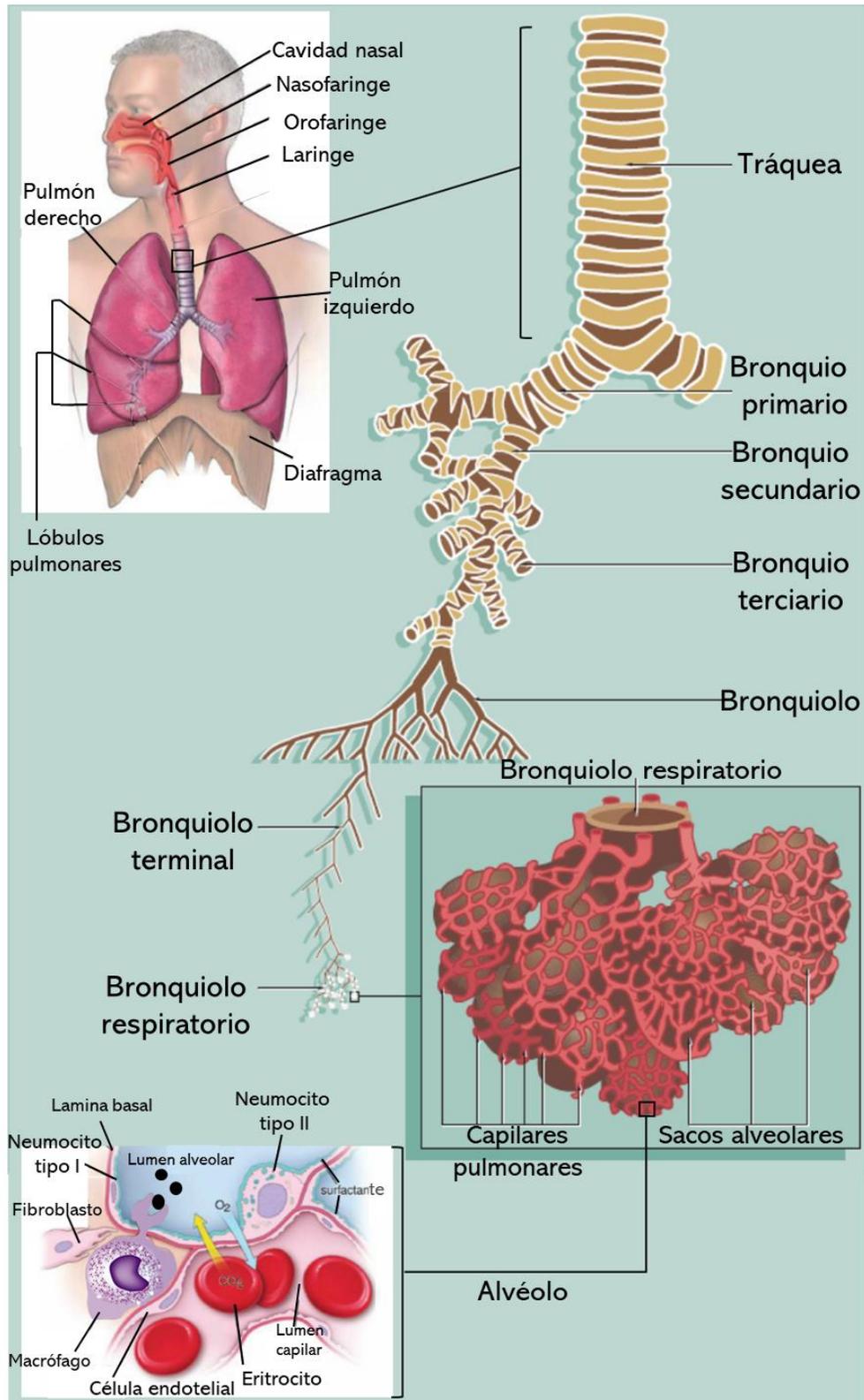
El bronquio primario derecho tiene 3 subdivisiones que llevan aire a los 3 lóbulos del pulmón derecho mientras que el bronquio primario izquierdo se subdivide en 2 bronquios secundarios que llevan aire a los 2 lóbulos del pulmón izquierdo (Aung H. et al., 2019). Tan pronto como los bronquios empiezan a disminuir de diámetro, la estructura cambia progresivamente (Young B. et al., 2013). Los bronquios terciarios, cada uno de los cuales irriga un segmento broncopulmonar, se ramifican en vías respiratorias más pequeñas llamadas bronquiolos, los cuales miden menos de 1mm de diámetro. A partir de los bronquios terciarios, las estructuras cartilaginosas no suelen extenderse a zonas más distales siempre y cuando se mantengan las condiciones fisiológicas del pulmón (Basil M. et al., 2020).

Las últimas y más pequeñas estructuras del árbol respiratorio se denominan bronquiolos terminales. Cada bronquiolo terminal se divide para formar ramas cortas de bronquiolos respiratorios y cada bronquiolo respiratorio se divide en varios conductos alveolares con numerosos sacos alveolares (Basil M. et al., 2020). El músculo liso de los bronquiolos respiratorios y los conductos alveolares tiene un rol funcional crítico al permitir la contracción durante los movimientos del aire dentro de los pulmones. A nivel de los conductos alveolares, se pueden ver haces de músculo liso interrumpidos por aberturas alveolares (Mills S., 2012).

Los alvéolos contienen células epiteliales, endoteliales y mesenquimales, además de macrófagos y células dendríticas (Basil M. et al., 2020). El epitelio alveolar consta de dos tipos de células, los neumocitos tipo I y los neumocitos tipo II. Casi el 95% de la superficie alveolar está cubierta por los neumocitos tipo I mientras que los neumocitos tipo II tienden a ocupar una proporción mucho menor de la superficie alveolar; pero son los responsables de generar surfactante pulmonar para reducir la tensión superficial alveolar y así evitar el colapso alveolar durante cada respiración (Basil M. et al., 2020).

Los macrófagos que se encuentran en el pulmón suelen localizarse tanto en los espacios alveolares como en los septos de los alvéolos. Su función principal es la fagocitosis de material exógeno que llega hasta los espacios alveolares, como partículas inhaladas y bacterias. Después de la fagocitosis, los macrófagos suelen permanecer atrapados en moco y ser expulsados del organismo en forma de esputo; sin embargo, también pueden permanecer en los septos alveolares o acceder al sistema linfático junto con el cargo fagocitado hasta los ganglios linfáticos hiliares (Young B. et al., 2013). El tipo de partículas inhaladas que suele encontrarse más frecuentemente en los pulmones es el carbón; no sólo en pulmones de individuos fumadores sino también en el pulmón de individuos que suelen vivir en ciudades con altos niveles de contaminación, como la Ciudad de México (Brauer M. et al., 2001).

Dado que el mecanismo de intercambio gaseoso ocurre en los alvéolos, las paredes de los sacos alveolares contienen una extensa red de capilares pulmonares. En la mayor parte de la pared alveolar se encuentra la membrana basal del endotelio capilar sobre la membrana basal del epitelio alveolar. En condiciones fisiológicas, ambas membranas basales están fusionadas para proporcionar una interfaz de grosor mínimo entre el aire alveolar y la sangre para que el intercambio gaseoso sea óptimo (Young B. et al., 2013).



Esquema 1. El sistema respiratorio. Se ilustra la ramificación de las vías respiratorias desde las vías superiores hasta las más distales, haciendo énfasis en algunos de los componentes celulares a nivel alveolar donde se realiza el intercambio gaseoso. Imagen modificada de Ross, M. H., & Pawlina, W. (2010) *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology* y Barbara Young, et al. (2013) *Wheater's Functional Histology*.

Sin embargo, cuando se produce una herida en el tejido pulmonar que requiere el remodelado del microambiente pulmonar o alguna enfermedad reduce la cantidad de aire en los alvéolos o provoca el engrosamiento de las paredes alveolares, se produce una oxigenación inadecuada de la sangre y dificultad respiratoria (Young B. et al., 2013).

Por ejemplo, en la fibrosis pulmonar intersticial, los fibroblastos alveolares aumentan su población celular, así como la producción de colágena y elastina. Como resultado, la pared alveolar se engrosa, y la presencia de capas de colágena entre el citoplasma de los neumocitos tipo I y los capilares alveolares impiden un intercambio gaseoso adecuado (Grippi M. et al., 2015).

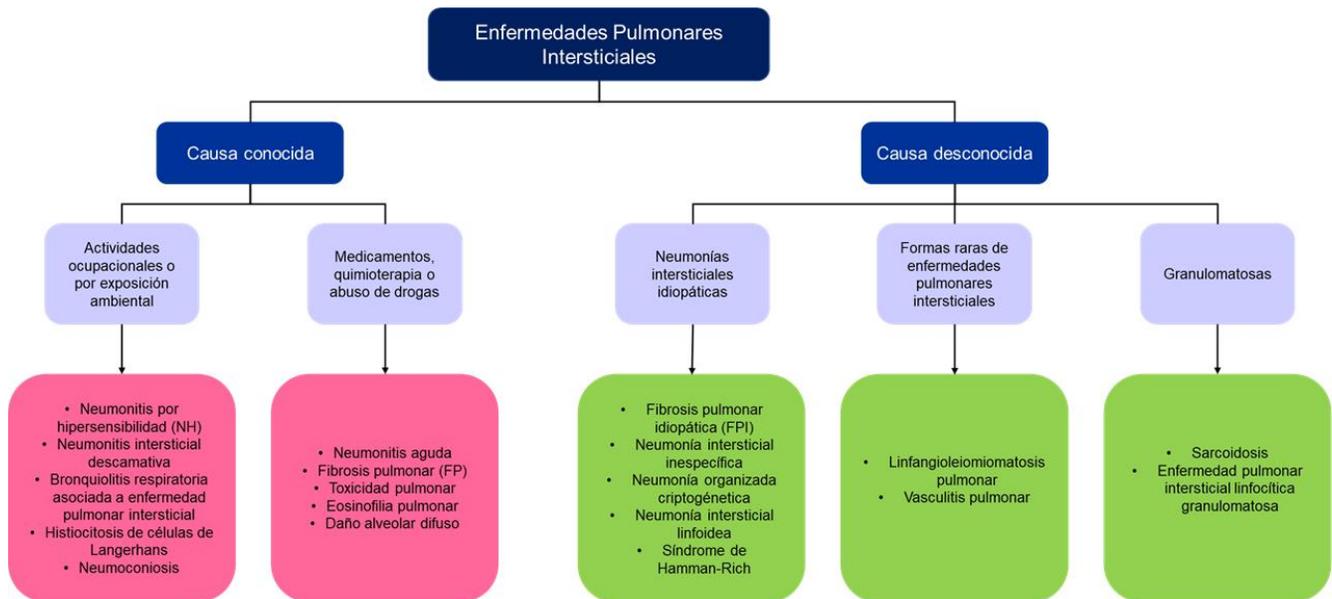
1.2 ENFERMEDADES PULMONARES INTERSTICIALES

Las enfermedades pulmonares intersticiales (EPI) son trastornos pulmonares parenquimatosos difusos, los cuales incluyen enfermedades de causa desconocida, como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (Kolb M. y Vasakova M., 2019; Vasakova M. et al., 2019).

Las EPI están caracterizadas por una acumulación predominantemente de linfocitos y macrófagos, citocinas, moléculas pro-inflamatorias y diversos grados de fibrosis pulmonar (Kalchiem-Dekel O. et al., 2018). Cualquier EPI puede manifestarse ya sea como una enfermedad pulmonar inflamatoria, con pocas o ninguna característica de fibrosis, con diversos grados de inflamación y fibrosis o como una enfermedad fibrótica, en donde la inflamación no tiene un papel relevante (Kalchiem-Dekel O. et al., 2018).

Independientemente de la causa, en las EPI fibrosantes se presentan lesiones vasculares o epiteliales de forma crónica; las cuales promueven que los fibroblastos proliferen, migren al sitio de la lesión y se activen para convertirse en miofibroblastos (Kolb M. y Vasakova M., 2019). Este proceso de reparación no regulado, junto con una reducción de la degradación de la matriz extracelular, provoca una mayor rigidez del tejido y una pérdida de la función del tejido alveolar. Adicionalmente, macrófagos y linfocitos son reclutados en el sitio de la lesión y liberan mediadores pro fibróticos lo cual promueve un bucle de retroalimentación para la formación de fibrosis (Kolb M. y Vasakova M., 2019). Por lo tanto, cuando las EPI progresan se presenta una disminución importante de la función pulmonar y se deteriora la calidad de vida de los pacientes, reflejando una morbilidad y mortalidad importante (Antonou K. M. et al., 2014).

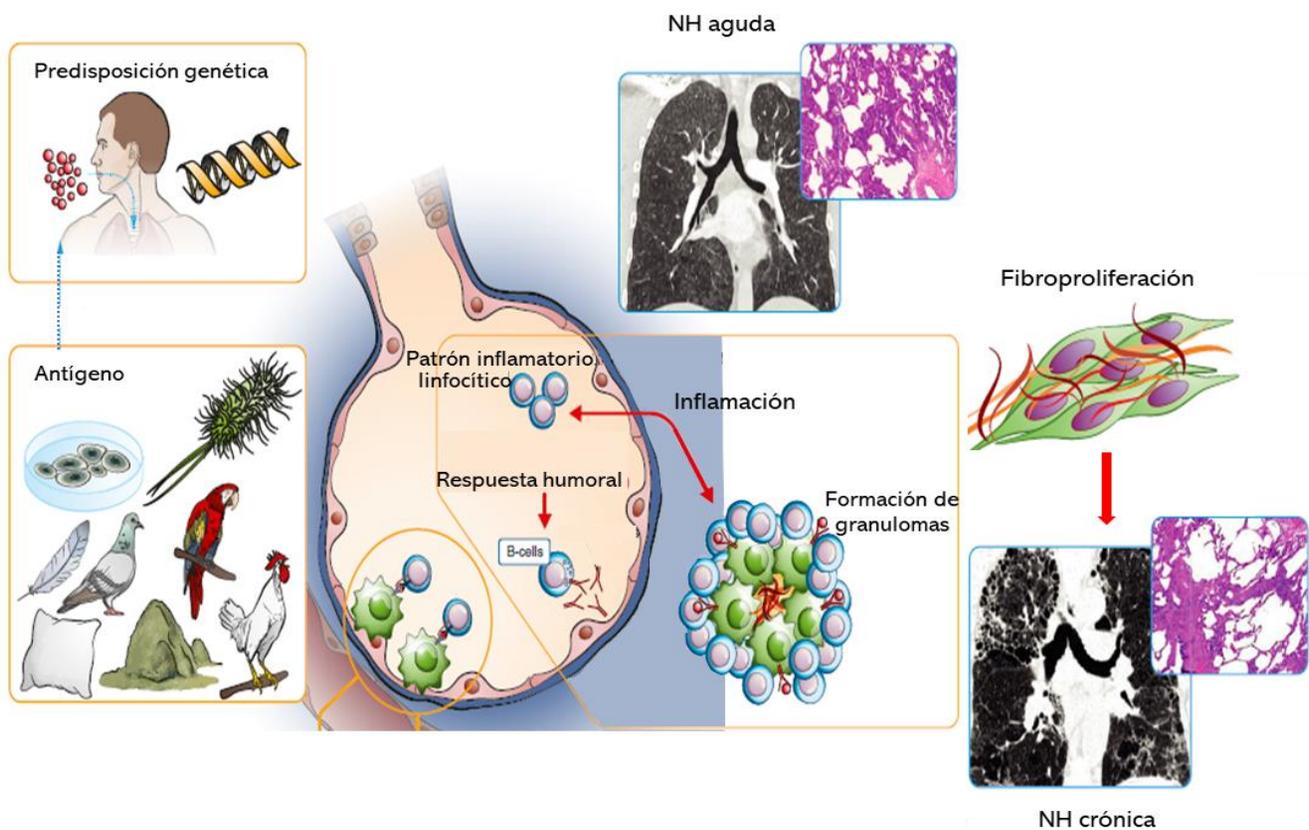
Para clasificar a las EPI se toman en cuenta las características clínicas, radiográficas y patológicas que comparten, así como su etiología (Grippi, M. A. et al., 2015). Como se muestra en el **esquema 2**, podemos identificar a la neumonitis por hipersensibilidad (NH) dentro del grupo de enfermedades pulmonares relacionadas a actividades ocupacionales o por exposición ambiental.



Esquema 2. Clasificación de enfermedades pulmonares intersticiales. Aunque existen numerosas formas de presentar la clasificación de las EPI; en este caso, se toma en cuenta la etiología de la enfermedad y sus posibles agentes causantes. Imagen modificada de Grippi, Michael A., Jay A. Fishman, Jack A. Elias, Robert M. Kotloff, Allan I. Pack, R. M. S. (5th Ed.) (2015). Fishman's Pulmonary Diseases and Disorder. McGraw Hill Education.

1.3 NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD (NH)

La neumonitis por hipersensibilidad (NH), es una enfermedad pulmonar intersticial inflamatoria que ocurre en individuos susceptibles a desarrollar reacciones inmunes exacerbadas y es resultado de la exposición continua a antígenos que pueden ser inhalados, tanto de origen orgánico (hongos, bacterias, protozoos y proteínas de origen animal) como de origen inorgánico (isocianato y anhídridos de ácido), los cuales son capaces de llegar a los espacios alveolares (Holsapple M.P. et al., 2006; Regal J. F. y Selgrade M. K, 2010; Selman M., 2004; Selman M. et al., 2012; Viegas M.S. et al., 2007) como se ilustra en el esquema 2.



Esquema 3. Neumonitis por hipersensibilidad. Se ejemplifica la respuesta de hipersensibilidad por predisposición genética que presentan algunos individuos al estar expuestos a antígenos que pueden ser inhalados, culminando en procesos fibroproliferativos. Imagen modificada de Vasakova et. al. Hypersensitivity Pneumonitis: Current Concepts of Pathogenesis and Potential Targets for Treatment. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2019

Inicialmente se habían clasificado a las etapas de la NH en fase aguda, subaguda y crónica, de acuerdo con las manifestaciones clínicas de los pacientes. Sin embargo, la distinción entre las diferentes etapas a menudo resulta complicada debido a que las diferentes manifestaciones de la enfermedad (sobre todo la fase subaguda y crónica) suelen superponerse entre sí

(Lacasse Y. y Cormier Y., 2006). Además, desde un punto de vista práctico, la diferenciación de la NH de otras enfermedades intersticiales de pulmón es difícil, especialmente la fase crónica de la NH ya que muchos pacientes presentan un proceso fibroproliferativo sin una exposición a antígenos reconocible; así que la NH crónica suele ser confundida con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (Churg A. et al., 2018; Wang L.J. et al., 2019).

Actualmente, se ha propuesto clasificar a la NH en dos categorías principales basadas en una correlación clínico-radiológica-patológica: NH aguda/ inflamatoria y NH crónica/ fibrótica (Vasakova M. et al., 2017).

1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA NH

Determinar la epidemiología de la NH resulta complicado al considerar factores geográficos y sociales, además de que en la literatura se han reportado muy pocos estudios de cohortes al respecto (Leone, P. M., & Richeldi, L., 2020). Se tiene conocimiento de una prevalencia alta en pacientes de entre 50 y 60 años, predominantemente en mujeres en comparación con hombres; pero también puede presentarse en niños y adultos jóvenes. (Dabiri, M., Jehangir, M., Khoshpouri, P., & Chalian, H., 2022).

La incidencia estimada de NH en la población general de Estados Unidos de América es del 2% de todos los casos de EPIs y en Europa, se reporta que la NH representa del 4 al 15% de todos los casos de EPIs (Anwar, J., Kong, W.T. y Balakrishnan, B., 2022; Barber, C. M., Wiggans, R. E., Carder, M., & Agius, R., 2017). Sin embargo, México no cuenta con cifras epidemiológicas de la enfermedad.

1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA NH

Pacientes con NH pueden presentar síntomas distintos dependiendo del curso que haya tomado la enfermedad. No obstante, los síntomas más frecuentes en pacientes con NH fibrótica y no fibrótica incluyen disnea, tos y sibilancias en la mitad de la inspiración. Otros síntomas menos frecuentes, incluyen febrícula, escalofríos, pérdida de peso y fatiga, sensación de opresión en el pecho, así como hallazgos en el examen físico de estertores y cianosis (Anwar, J., Kong, W.T. y Balakrishnan, B., 2022)

El inicio del cuadro clínico puede ser agudo (desarrollarse en días o semanas, ocasionalmente con derrame pleural) o también puede ser crónico (desarrollarse y empeorar durante meses o años); adicionalmente los episodios pueden ser recurrentes. Sin embargo, la duración de los síntomas no ha sido caracterizada rigurosamente con respecto al estado de fibrosis o pronóstico del paciente con NH (Raghu, G., et al., 2020).

1.6 FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL DESARROLLO DE NH.

1.6.1 FACTORES GENÉTICOS

Dado que no todos los individuos expuestos a los antígenos relacionados con el desarrollo de NH manifiestan la enfermedad (Vasakova M. et al., 2019), la predisposición genética juega un papel primordial en el desarrollo de esta patología.

Se ha establecido que la mayoría de los polimorfismos genéticos que pueden contribuir a aumentar la susceptibilidad para desarrollar NH son moléculas involucradas en el procesamiento y la presentación de antígenos externos (Vasakova M. et al., 2019). Especialmente, moléculas pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad HLA de clase II (Falfán Valencia R. et al., 2010), la cual consta de una serie de subregiones, cada una de las cuales contiene genes A y B que codifican cadenas α y β , respectivamente (Choo S. Y., 2007) y parecen ser el locus de susceptibilidad primario en la NH. Los polimorfismos del MHC II reportados en la población mexicana son HLA-DR7 y HLA-DRB1*04; adicionalmente se ha encontrado un incremento del haplotipo DRB1*1305-DQB1*0301 y un decremento del haplotipo DRB1*0802-DQB1*0402 en el MHC II de la población mexicana (Vasakova M. et al., 2019)

Sin embargo, los polimorfismos del MHC II no son los únicos reportados como posibles factores de riesgo para ser susceptible a la NH; polimorfismos en el proteasoma como PSMB8 KQ, polimorfismos en los genes de procesamiento de antígenos asociados al transportador TAP1 637 y TAP1 661 (Vasakova M. et al., 2019), polimorfismos del factor de necrosis tumoral (TNF) y del promotor MUC5B también han sido reportados en pacientes con NH crónica (Newton C. A. et al., 2018). Seguido de polimorfismos de genes potencialmente involucrados en la homeostasis pulmonar, la reparación de heridas y mutaciones genéticas en zonas teloméricas (Newton C. A. et al., 2018; Selman M. et al., 2006; Vasakova M. et al., 2019).

1.6.2 TIPO DE ANTÍGENO CAUSAL

En la actualidad, no se ha descrito un criterio preciso para definir qué tipo de sustancias o compuestos tienen potencial para convertirse en alérgenos. Sin embargo, la mayoría de los antígenos que se conocen contienen más de un componente capaz de desencadenar reacciones de hipersensibilidad; generalmente suelen ser proteínas solas o en combinación con moléculas glucídicas y si el antígeno es de naturaleza no proteica, suele unirse a proteínas transportadoras. (Garrote A., & Bonet R., 2004).

De manera general, cuando un individuo se expone a un nuevo antígeno o agente causal de alergia, se sensibiliza y como consecuencia presenta un aumento local de linfocitos, pero sin relevancia clínica (Garrote A., & Bonet R., 2004). No obstante, esto no sucede en los individuos genéticamente predispuestos a presentar reacciones de hipersensibilidad, donde tanto las características del alérgeno como el nivel, el tiempo y la vía de exposición al antígeno son cruciales.

Actualmente hay más de 200 antígenos reportados como posibles antígenos causales para el desarrollo de NH y generalmente las exposiciones de los individuos suelen estar relacionadas con actividades ocupacionales (Nogueira, R. et al., 2019 y Petnak, T., & Moua T., 2020).

Como se muestra en la **tabla 1**, los antígenos causales de NH se pueden dividir en las siguientes categorías:

- **Exposición a proteína animal**

La exposición a proteínas de aves es la forma más común para desarrollar NH mediante la inhalación repetida de proteínas aviares a través de excrementos o a partir de las plumas de las aves; se le suele conocer como la enfermedad del "criador de aves" o "criador de palomas". (Nogueira, R. et al., 2019 y Petnak, T., & Moua T., 2020). Cabe destacar que, en México, la inhalación de antígenos aviarios es la principal causa de NH. (Falfan-Valencia R. et al., 2010).

- **Exposición a hongos**

La inhalación de esporas de hongos es la segunda causa más común para desarrollar NH.

Particularmente en Japón, se ha reportado a *Trichosporon asahii* como el agente causal más común durante los meses de verano en cuanto al número de casos notificados de NH. Mientras

tanto en Europa y América del Norte se han reportado especies como *Aspergillus* y *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Aureobasidium pullulans*, *Peziza domiciliana* y *Cephalosporium acremonium* como los principales agentes causales de NH (Nogueira, R. et al., 2019 y Petnak, T., & Moua T., 2020).

De manera tradicional, se reporta al ambiente de las granjas como una fuente de exposición a este tipo de antígenos, lo que resulta en el llamado “enfermedad del granjero” o “pulmón del granjero”. Aunque los antígenos se pueden encontrar principalmente en el heno o la paja húmedos, silos de granos, alimento para animales, estiércol y en cultivos de cebolla, papa y maíz contaminados con hongos; también puede ocurrir una exposición al antígeno fúngico a través de artículos domésticos como los humidificadores, purificadores de aire, unidades de calefacción, aire acondicionado y ductos de ventilación. (Nogueira, R. et al., 2019 y Petnak, T., & Moua T., 2020).

- **Exposición a bacterias y micobacterias**

En contraste con los primeros dos tipos de antígenos, la exposición ambiental ante especies bacterianas y micobacterias se da con mayor frecuencia al inhalar polvo de granja o granos que se encuentren contaminados con bacterias termófilas filamentosas y formadoras de esporas como *Thermoactinomyces vulgaris* y *Saccharopolyspora rectivirgula*, entre otras (Nogueira, R. et al., 2019 y Petnak, T., & Moua T., 2020).

- **Exposición a otros antígenos**

Compuestos químicos de índole orgánica e inorgánica también pueden ser antígenos causales de NH incluidos los isocianatos, anhídridos de ácido, cloroetilenos y compuestos de acrilato.

Dentro de estos compuestos, los diisocianatos son la forma más común de exposición a isocianatos mediante la inhalación de polvo de materiales plásticos o espuma durante su fabricación. Las pinturas y barnices comerciales en aerosol que normalmente son utilizadas por los técnicos en talleres de reparación y fabricación de automóviles también contienen diisocianatos (Nogueira, R. et al., 2019 y Petnak, T., & Moua T., 2020).

Tipo de antígeno	Antígeno específico			
Proteína animal	Antígeno aviario			
Hongos	<i>Trichosporon asahii</i> <i>Eurotium amstelodami</i> <i>Cryptococcus spp.</i> <i>Absidia corymbifera</i> <i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Fusarium spp.</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Ulocladium botrytis</i>	<i>Penicillium spp.</i> <i>Lichtheimia corymbifera</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Humicola fuscoatra</i>	<i>Wallemia sebi</i> <i>Cladosporium spp.</i> <i>Chrysonilia sitophila</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Peziza domiciliana</i>
Bacterias	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> <i>Streptomyces spp.</i>	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> <i>Saccharomonospora viridis</i>	<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Stenotrophomonas spp.</i> <i>Paenibacillus spp.</i>
Micobacterias	Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	<i>Mycobacterium immunogenum</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
Otros antígenos	Isocianatos	Anhídridos de ácido	Cloroetilenos	Compuestos de acrilato

Tabla 1. Antígenos asociados con el desarrollo de NH. Aunque existen más de 200 antígenos causales identificados para la NH, en la presente tabla se enlistan algunos de los antígenos más comunes reportados en casos clínicos de América del Norte, Europa y Asia. Imagen modificada de Petnak, T., & Moua, T. (2020). Exposure assessment in hypersensitivity pneumonitis: a comprehensive review and proposed screening questionnaire. *ERJ Open Research*, 6(3), 230–2020.

1.6.3 RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS

La respuesta inmune innata desempeña un papel importante en el reconocimiento de antígenos. Las partes proteicas de los antígenos inhalados se identifican por las células presentadoras de antígeno. La reactividad del sistema inmune al antígeno en la neumonitis por hipersensibilidad es el resultado de la activación de varios receptores de reconocimiento de patógenos, incluidos los receptores Toll-like, NOD y dectinas (Grunes D. y Beasley M. B., 2013; Higashino-Kameda M. et al., 2016). La señalización a través de los receptores de reconocimiento de patógenos conduce no solo a la activación innata de las células inmunes, sino también a la producción de citocinas como la interleucina 4, interferón gamma, interleucina 13 e interleucina 17, que contribuyen a la presentación clínica heterogénea que presentan los pacientes de NH (Galluzzi L. y Green D. R., 2019).

1.6.4 PROCESAMIENTO Y EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS.

La capacidad de las células T y las células B para reconocer y responder a su antígeno específico es fundamental para la inmunidad adaptativa; sin embargo, la unión del antígeno al receptor es insuficiente para que un linfocito responda. Por lo tanto, un paso crítico en la transducción de señales es el reclutamiento de proteínas intracelulares a la membrana plasmática y cambios en la composición de la membrana que rodea al receptor. Muchos receptores de antígenos activan tirosina-quinasas para transmitir señales, a menudo formando grandes complejos multiproteicos (Murphy K. y Weaver C., 2016). En muchos casos, la transducción de señales promueve la activación de factores de transcripción que conducen directa o indirectamente a la proliferación, diferenciación y función efectora de los linfocitos. Otras funciones de la transducción de señales median los cambios en el citoesqueleto que son importantes para las funciones celulares, como la migración. (Murphy K. y Weaver C., 2016)

En cuanto a los antígenos, estos pueden someterse a dos tipos de procesamiento; ya sea en el proteasoma de las células presentadoras de antígeno y se expresan como moléculas de tipo MHC I, o pueden evadir la degradación en el proteasoma y expresarse como moléculas MHC II en la superficie de las células presentadoras de antígeno. Antes de unirse a las moléculas de MHC, los antígenos se editan mediante el transporte de proteínas. En general, las células T CD4+ auxiliares reconocen péptidos a menudo con extensiones C y N-terminales presentadas como moléculas MHC II, mientras que las células T CD8+ citotóxicas reaccionan a péptidos octaméricos o nonaméricos presentados como moléculas MHC I. (Vasakova M. et al., 2019)

La presentación de antígenos es esencial para que los linfocitos B produzcan anticuerpos. Las interacciones entre las células T y los antígenos blanco inician con una adhesión transitoria. Las funciones efectoras de las células T se activan cuando el complejo péptido y MHC, en la superficie de la célula blanco, es reconocido por el receptor en una célula T efectora, este evento de reconocimiento hace que la célula T efectora se adhiera con más afinidad a la célula portadora de antígenos y libere moléculas efectoras directamente en la célula blanco para promover la muerte celular (Murphy K. y Weaver C., 2016).

1.6.5 RESPUESTAS HIPERSENSIBLES DEL SISTEMA INMUNE

Se puede definir a las reacciones de hipersensibilidad como un proceso en el que el sistema inmunológico de un individuo reconoce como extraño un alérgeno o antígeno, el cual en condiciones normales resulta inocuo para la mayoría de las personas, y se detona una respuesta inmune exacerbada (Cardona-Villa R. et al., 2010).

Las respuestas por hipersensibilidad requieren ya sea de una dosis de exposición única o recurrente de un antígeno para inducir una respuesta inmune y la fase efectora que se produce después de repetir la exposición al mismo antígeno ocasiona una respuesta inmune adversa que involucra daño tisular e inflamación (Regal J. F. y Selgrade M. K., 2010).

Las respuestas por hipersensibilidad se clasificaron originalmente en cuatro tipos (I-IV) de acuerdo con el mecanismo inmunológico que detonan (Cardona-Villa R. et al., 2010).

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo I son reacciones de hipersensibilidad inmediata. En este tipo de reacción, la respuesta inflamatoria está mediada por IgE y es dependiente de linfocitos T CD4+ los cuales adquieren un patrón de producción de citocinas tipo Th2. La IgE se une a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de mastocitos y basófilos, los cuales quedan sensibilizados a ese antígeno en particular. Nuevas exposiciones al alérgeno inducirán una mayor y más rápida producción de IgE, lo que aumentará la sensibilización del individuo (Cardona-Villa R. et al., 2010).

Las reacciones de hipersensibilidad de tipo II, son reacciones donde los anticuerpos IgG o IgM se unen a antígenos localizados en la superficie de las células y se encargan de mediar su destrucción ya sea a través de la activación de la vía del complemento o mediante células citotóxicas dependientes de anticuerpos. Ambas formas de degradación actúan como opsoninas para facilitar la fagocitosis de la célula blanco; además, la activación de la vía del complemento activa la respuesta inflamatoria. Es importante destacar que las reacciones de hipersensibilidad de tipo II también están involucradas en la patogénesis de enfermedades autoinmunes. (Cardona-Villa R. et al., 2010).

Las reacciones por hipersensibilidad de tipo III son el resultado interacciones antígeno-anticuerpo las cuales inducen la degranulación local de los mastocitos, lo cual aumenta la permeabilidad vascular y actúa como factores quimiotácticos de neutrófilos y monocitos los cuales liberan enzimas que producen lesiones tisulares. A su vez, se producen sustancias que

inducen la agregación de plaquetas, la disminución del flujo sanguíneo y el aumento de la reacción inflamatoria (Cardona-Villa R. et al., 2010).

Por su parte, las reacciones por hipersensibilidad de tipo IV son reacciones de tipo retardado, se desarrollan entre 48 y 72 horas después de la exposición al antígeno y son mediadas por diferentes poblaciones de células T dentro de las que destacan las células T CD8+ y CD4+ (Murphy K. y Weaver C., 2016; Selman M. et al., 2012). En la respuesta de tipo IV, después de que el antígeno en cuestión ha sido fagocitado, procesado y presentado a los linfocitos CD4+, éstos se activan, proliferan y liberan citocinas que generan vasodilatación directa o indirectamente al hacer que los mastocitos liberen factores quimioatrayentes para monocitos, neutrófilos, basófilos, linfocitos T y B provenientes de la circulación (Murphy K. y Weaver C., 2016). Las citocinas producidas por las células de Th1 inducen la adherencia de los monocitos al endotelio, y su migración desde la sangre hacia los tejidos circundantes. Durante este proceso, los monocitos se diferencian en macrófagos activados, los cuales son las principales células efectoras de la hipersensibilidad de tipo IV (Cardona-Villa R. et al., 2010; Murphy K. y Weaver C., 2016).

En el caso de la NH, la patología que presentan los pacientes involucra respuestas de tipo III y IV simultáneamente (Ismail T. et al., 2006). Además, las citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), y la interleucina 1 e interleucina 8, las cuales son producidas por los macrófagos alveolares, explican los síntomas de fiebre y neutrofilia en pacientes con NH. Por su parte, se sabe que las citocinas reguladoras como la interleucina 10 contrarrestan muchos de los efectos biológicos del interferón gamma, lo que sugiere que esta interleucina participa en la amortiguación del proceso inflamatorio y la formación de granulomas en estos pacientes (Ismail T. et al., 2006).

En la fase aguda de la NH, los linfocitos predominantes son células T CD4+, pero en la fase crónica predominan las células T CD8+ junto con un número variable de células plasmáticas, que normalmente no se encuentran en lavados bronquioalveolares de los pacientes (Ismail T. et al., 2006).

1.6.6 RESPUESTA INFLAMATORIA

El reconocimiento y procesamiento de antígenos por parte del sistema inmunitario innato son seguidos por la activación de las células de la inmunidad innata y adaptativa y la producción de una serie de proteínas, incluidos anticuerpos, quimiocinas y citocinas.

Se cree principalmente que la respuesta inflamatoria en NH es mediada por células T, principalmente por células Th1; sin embargo, la lesión pulmonar mediada por inmunocomplejos con anticuerpos IgG específicos también puede participar.

1.6.7 RESPUESTA HUMORAL

La presentación de los antígenos procesados por las células inmunes innatas a los linfocitos B induce la producción de inmunoglobulinas debido a que los antígenos orgánicos inhalados generalmente contienen antígenos tanto dependientes como independientes de células T (proteínas y polisacáridos, respectivamente) (Mitaka K. et al., 2011). Las inmunoglobulinas y los antígenos forman complejos que tienen funciones inmunorreguladoras las cuales dependen de la interacción del fragmento cristalizante (Fc) del anticuerpo con los receptores Fcγ y su unión preferencial al subtipo IgG (Vasakova M. et al., 2019). El Fc otorga anticuerpos IgG con funciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, citotoxicidad dependiente del complemento, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos e inducción de citocinas y quimiocinas (Chan A.C. y Carter P.J, 2010).

1.6.8 ACUMULACIÓN DE LINFOCITOS Y FORMACIÓN DE GRANULOMAS

En el tracto respiratorio, los linfocitos se encuentran entre el epitelio ciliado de la tráquea y en la lámina de los bronquios (Pabst R. y Tschernig T., 1995). El propósito del reclutamiento de linfocitos en el parénquima pulmonar es la defensa del huésped contra patógenos e involucra interacciones adhesivas entre los linfocitos y una variedad de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales vasculares (Curtis J. L. et al., 2002).

En lavados bronquioalveolares de pacientes con NH, se ha reportado linfocitosis con una baja proporción de linfocitos CD4+/CD8+ y aunque la linfocitosis no es exclusiva de NH, se utiliza para diferenciar a la NH de enfermedades como la sarcoidosis (Miller R. et al., 2018).

Después de interactuar con el antígeno, las células T pueden polarizar a los linfocitos hacia el subtipo de células Th1 gracias a la liberación de IL-12 e IFN- γ , y como consecuencia se da la estimulación de la formación de granulomas (Vasakova M. et al., 2019). Además, ocurre una disminución de la apoptosis en los linfocitos por lo que hay activación y acumulación de células T en el tejido pulmonar. Así mismo, un aumento en la producción de IL-17 por parte de los linfocitos y neutrófilos que se acumulan en el pulmón, actúa como un potente estimulador de la inflamación crónica en la NH; así como la transición de células Th1 a Th2 contribuye al mantenimiento de la inflamación y el desarrollo de fibrosis en la NH crónica. (Vasakova M. et al., 2019)

La patología pulmonar descrita para NH crónica se caracteriza por la formación de granulomas, cuando la activación continua de los macrófagos hace que se adhieran estrechamente entre sí, para formar células gigantes multinucleadas, lo que promueve la progresión de la enfermedad hacia fibrosis pulmonar (Cardona-Villa R. et al., 2010; Selman M. et al., 2012).

1.7 RESPUESTA FIBROPROLIFERATIVA EN NH

La fibrosis pulmonar puede definirse como cicatrices en el compartimento alveolar del pulmón, que es donde se produce el intercambio de gases (Wallace W.A.H. et al., 2007). El desarrollo de fibrosis pulmonar secundario a reacciones inflamatorias se inicia con una fase caracterizada por edema y acumulación de leucocitos polimorfonucleares, seguido por una reparación proliferativa (Zelikoff J.T. y Cohen M.D., 2010).

La fibrogénesis involucra cambios asociados con la reorganización de los componentes del citoesqueleto los cuales facilitan la motilidad de los leucocitos polimorfonucleares y la interacción con las células endoteliales, la activación por retroalimentación de las células inflamatorias en el pulmón y la participación de leucocitos polimorfonucleares los cuales son reclutados por mediadores que conducen a modificaciones de la matriz extracelular (MEC) para proporcionar una superficie óptima para la fijación y propagación de los mismos en el parénquima pulmonar (Burgstaller G. et al., 2017). En consecuencia, los leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos en el intersticio pulmonar muestran una mayor producción de fibronectina, así como liberación de oxidantes y proteinasas que pueden causar modificaciones del tejido pulmonar, y la liberación de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) y el

factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) que promueven la migración y la proliferación de fibroblastos, así como una mayor deposición de colágena (Zelikoff J.T. y Cohen M.D., 2010).

La fibrosis pulmonar se puede presentar en muchas enfermedades y por causas diversas, incluidas las neumonías intersticiales idiopáticas, las enfermedades sistémicas del tejido conectivo, la sarcoidosis, por exposición a la radiación o quimioterapia, y en algunas enfermedades genéticas raras (Luzina I.G. et al., 2008). La lesión tisular a nivel alveolar asociada con inflamación crónica puede ocasionar la pérdida de las células epiteliales alveolares, daño o pérdida de la membrana basal, la pérdida o lesión de células endoteliales y/o un colapso del soporte elástico de los alvéolos (Wallace W.A.H. et al., 2007).

Los pacientes con NH crónica se caracterizan por presentar fibrosis intersticial de grado variable (Selman M., 2004) y pueden desarrollar una fibrosis similar a pacientes con FPI como resultado de la activación de los fibroblastos, una producción anormal de MEC y un desequilibrio de citocinas reguladoras (Vasakova M. et al., 2019). Los fibrocitos son células progenitoras derivadas de la médula ósea, relacionadas en origen con los monocitos, que participan en la patogenia de varias enfermedades inflamatorias crónicas. Los fibrocitos expresan marcadores de superficie para leucocitos y células mesenquimales y son capaces de diferenciarse en fibroblastos y miofibroblastos, y pueden contribuir a la respuesta fibroproliferativa a través de la secreción de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento y pueden participar en la patogenia de la NH crónica, ya sea diferenciándose a fibroblastos y miofibroblastos o amplificando la respuesta inflamatoria y fibrótica por señalización paracrina induciendo la secreción de moléculas pro-inflamatorias y profibróticas (García de Alba C. et al., 2015). Así mismo, la regulación positiva de la endotelina-1 y el reclutamiento de células inflamatorias en los pulmones de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad contribuye al desarrollo de fibrosis pulmonar progresiva (Selman M., 2004).

Pese a todos los estudios que giran en torno a la NH, actualmente no se ha estudiado el papel que juega la autofagia en esta enfermedad, pero sí en otras enfermedades pulmonares intersticiales, como la fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

2. ANTECEDENTES

2.1 AUTOFAGIA EN EL PULMÓN Y EN ENFERMEDADES PULMONARES.

La autofagia se encuentra activa de manera constitutiva en la mayoría de los tipos de células (Glick D. et al., 2010) y defectos en el proceso autofágico han demostrado estar relacionados con diversas patologías (Zhangyuan Y. et al., 2016). En algunos casos de patologías pulmonares, la patogénesis está relacionada con la activación excesiva de la autofagia, mientras que en otros está asociada con la disminución en el flujo autofágico (Maciel-Herrerías M. y Cabrera-Benítez S., 2016). Por ejemplo, se ha reportado que en biopsias de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en distintas etapas de la enfermedad, hay un incremento en los niveles de autofagia comparados con pulmones de individuos sanos. Se ha propuesto además que la autofagia se activa en etapas tempranas de la enfermedad, mientras que la apoptosis sólo ocurre en etapas tardías cuando la enfermedad es más severa (Maciel-Herrerías M. y Cabrera-Benítez S., 2016). Esto sugiere que la activación temprana de la autofagia actúa como un mecanismo de protección para atenuar el daño inducido por la toxicidad del humo de cigarro; sin embargo, en etapas tardías, el incremento en la actividad autofágica podría promover la muerte celular (Maciel-Herrerías M. y Cabrera-Benítez S., 2016).

En el caso específico de la FPI, diversos estudios han mostrado por medio de inmunohistoquímica que en los pulmones de pacientes con esta enfermedad se observó una acumulación de proteínas ubiquitinadas y de la proteína p62/SQSTM1, especialmente en zonas fibróticas. De igual manera en estas regiones, no se detectó la presencia de LC3 y Beclin1 en comparación con zonas sin daño y en zonas equivalentes en pulmones de individuos sanos. En el trabajo de Patel A, et al, sugieren que en la FPI hay acumulación de agregados de proteínas en el pulmón que probablemente no están siendo degradados debido a una disminución en la autofagia, lo cual podría sensibilizar a las células frente a distintos tipos de estrés (Araya J. et al., 2013; Patel A. S. et al., 2012).

La FPI es una enfermedad pulmonar crónica y progresiva que afecta predominantemente a pacientes de edad avanzada (Mizumura K. et al., 2016). Se ha reportado que en la FPI que los efectos profibróticos del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) en los fibroblastos de pulmón son promovidos por la inhibición que produce el TGF- $\beta 1$ en el procesamiento de pro-LC3B a la forma lipídica LC3B-II, LC3B-II se incorpora a la membrana del fagóforo, participa en la elongación, y en el cierre y maduración del autofagosoma, sugiriendo que el

proceso autofágico está disminuido en el pulmón de pacientes con FPI (Patel A. S. et al., 2012); esta deficiencia puede acelerar la senescencia celular en las células epiteliales, potenciar la diferenciación de miofibroblastos (Mizumura K. et al., 2016), promover el depósito de MEC en fibroblastos de pulmón y de esta forma, acelerar la fibroproliferación en pacientes con FPI (Liao S-x et al., 2019).

La autofagia parece estar asociada con algunos receptores Toll-like (TLR), en el reconocimiento innato de patógenos y la modulación de la vía de señalización en pacientes con FPI; los cuales adicionalmente funcionan como biomarcadores de progresión de FPI (Margaritopoulos G.A. et al., 2017). Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria innata temprana a los patógenos invasores mediante la detección de microorganismos y señales endógenas de peligro. Los TLR reconocen motivos estructurales altamente conservados conocidos como PAMPs, que se expresan exclusivamente por patógenos microbianos, que son moléculas endógenas liberadas de células necróticas o células en proceso de muerte. En macrófagos se ha descrito que varios prototipos de ligandos de TLR inducen autofagia. La inducción de la autofagia a través de TLR7 depende de la expresión de MyD88. La estimulación de la autofagia con ligandos de TLR7 promueve la eliminación de microbios intracelulares. Estos hallazgos vinculan dos sistemas de defensa de la inmunidad innata, la señalización de TLR y la autofagia, y proporcionan un mecanismo molecular potencial para la inducción de la autofagia en respuesta a la invasión de patógenos y muestran que la capacidad recientemente reconocida de los ligandos de TLR para estimular la autofagia puede usarse para eliminar patógenos intracelulares (Delgado AM, 2008).

La autofagia es un mecanismo de respuesta ante diversos tipos de estrés y, por tanto, promueve la supervivencia en las células (Maciel-Herrerías M. y Cabrera-Benítez S., 2016). Por otro lado, la autofagia ha sido implicada en la regulación de la respuesta inmune, en la proliferación de linfocitos T, y en la función, polarización y apoptosis de los macrófagos. Adicionalmente, la autofagia está involucrada en la fagocitosis y degradación de patógenos (Galluzzi L. y Green D. R., 2019). Algunos estudios indican que la autofagia podría tener un papel deletéreo en la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y del asma. En otros trastornos como la FPI y la fibrosis quística, la inhibición de la autofagia puede contribuir a la patogénesis (Maciel-Herrerías M. y Cabrera-Benítez S., 2016).

Sin embargo, su papel en la patogénesis de la NH no ha sido estudiado previamente, por ello, constituye uno de los principales objetivos de mi proyecto de maestría.

2.2 AUTOFAGIA

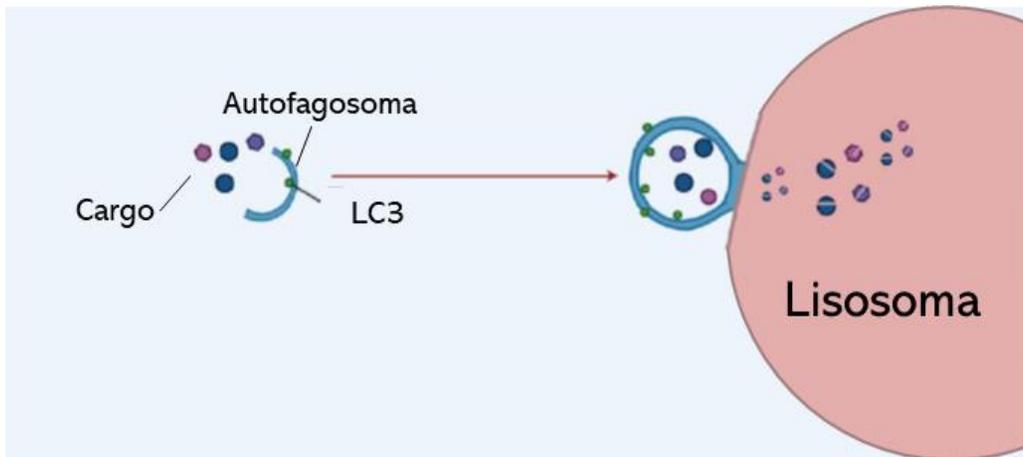
La autofagia es un mecanismo homeostático que promueve la degradación proteolítica de componentes citosólicos, favorece la eficiencia energética a través de la generación de ATP y contribuye en el control de daños mediante la eliminación de proteínas, organelos no funcionales y patógenos (Glick D. et al., 2010).

La autofagia actúa como una respuesta adaptativa a las adversidades ambientales, como la privación de nutrientes; en este escenario, cuando no hay alimentos disponibles, las células comienzan a reciclar macromoléculas para la síntesis de componentes esenciales y como suministro de energía (Zhangyuan Y. et al., 2016). Sin embargo, otros factores como el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico, la hipoxia, el daño mitocondrial, la activación de las células inmunes y patógenos también inducen la autofagia (Margaritopoulos G. A. et al., 2017).

Existen diferentes tipos de autofagia que pueden ser tanto selectivos como no selectivos (Zhangyuan Y. et al., 2016) y pueden dividirse de acuerdo con las diferentes formas en que el sustrato puede ingresar al lisosoma (Aman, Y. et al., 2021; Grootaert M.O.J. et al., 2018; Klionsky, D. J., et al., 2021; Liao S-x et al., 2019; Parzych, K. R. y Klionsky, D. J., 2014; Zhangyuan Y. et al., 2016).

- Macroautofagia:

Como se ilustra en el **esquema 4**, es el proceso en el cual el cargo es envuelto dentro de una vesícula de doble membrana, denominada autofagosoma. La característica morfológica más distintiva de este proceso de tráfico mediado por vesículas intercelulares es que los autofagosomas deben formarse *de novo* por expansión de la membrana en lugar de por gemación (Parzych, K. R. y Klionsky, D. J., 2014).



Esquema 4. Macroautofagia. Se ilustra grosso modo los componentes principales de la macroautofagia, la cual puede o no ser selectiva en cuanto al cargo que se transporta dentro de los autofagosomas. Imagen modificada de Aman, Y. et al. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. Nature Aging.

Dentro de la categoría de macroautofagia selectiva, de aquí en adelante referida únicamente como autofagia, existe otra clasificación de subtipos de autofagia (algunas de las cuales se ilustran en el **esquema 5**):

- Agrefagia:

Degradación enfocada en los agregados proteicos los cuales se encuentran ubiquitinados y pueden unirse con los receptores de autofagia como p62/SQSTM1 o NBR1 (Aman, Y. et al., 2021).

- Glicofagia:

Degradación selectiva del glucógeno a través de procesos autofágicos para el mantenimiento de la homeostasis celular (Aman, Y. et al., 2021).

- Lipofagia:

En respuesta a la falta de nutrientes, los triglicéridos suelen almacenarse en gotitas lipídicas y estas pueden ser degradados por autofagia de forma alternativa a la degradación por lipasas para regular la homeostasis lipídica (Aman, Y. et al., 2021).

- Reticulofagia:

Este proceso ocurre en el retículo endoplásmico donde receptores como FAM134B, ATL3 y TEX264, entre otros, se unen a LC3 para permitir el secuestro del retículo endoplásmico en un autofagosoma para su posterior degradación lisosomal (Aman, Y. et al., 2021).

- Mitofagia:

Degradación selectiva mediada por PINK1 y parkina; en este proceso los receptores de autofagia NDP52, optineurina y p62 reclutan a los elementos necesarios para formar un autofagosoma alrededor de las mitocondrias dañadas o defectuosas. Otra manera en la que la mitofagia actúa de forma basal, es mediante la unión de LC3 a proteínas de la membrana mitocondrial como NIX y AMBRA1, y a lípidos mitocondriales como la cardiolipina para posteriormente formar el autofagosoma (Aman, Y. et al., 2021).

- Lisofagia:

Al permeabilizar la membrana lisosomal, se recluta a Gal-3, TRIM16 y proteínas autofágicas como ULK1 y ATG16L, lo que posteriormente permite la ubiquitinación del lisosoma y da como resultado el reclutamiento de p62, el cual se une a LC3 para facilitar el proceso autofágico. De manera paralela e independiente de la ubiquitina, la Gal-8 puede unirse a los lisosomas dañados y se une directamente al receptor autofágico NDP52 para interactuar con LC3 y continuar con el proceso autofágico (Aman, Y. et al., 2021).

- Nucleofagia:

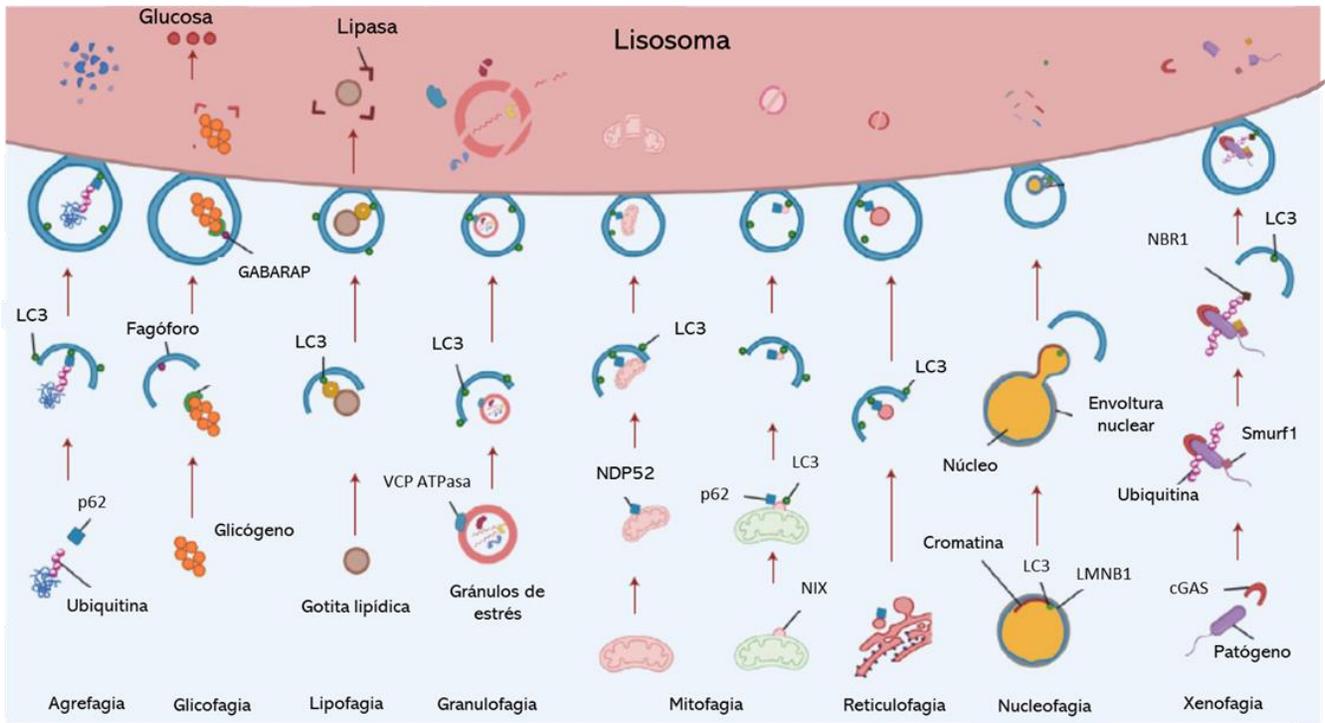
En este proceso, la unión de LC3 con una proteína de la lámina nuclear (LMNB1) permite la formación de una protuberancia donde se produce la degradación por autofagia de parte del núcleo, lo que contribuye al mantenimiento de la integridad genómica (Galluzzi, L., et al., 2017).

- Granulofagia:

Es la degradación selectiva por autofagia de gránulos de estrés, los cuales son un aglomerado de RNA mensajero asociado con algunos factores de iniciación de la traducción y proteínas de unión al RNA; este proceso mediado por la acción de la VCP ATPasa, juega un papel importante durante la regulación de la traducción celular (Buchan, J. R. et al., 2013).

- Xenofagia:

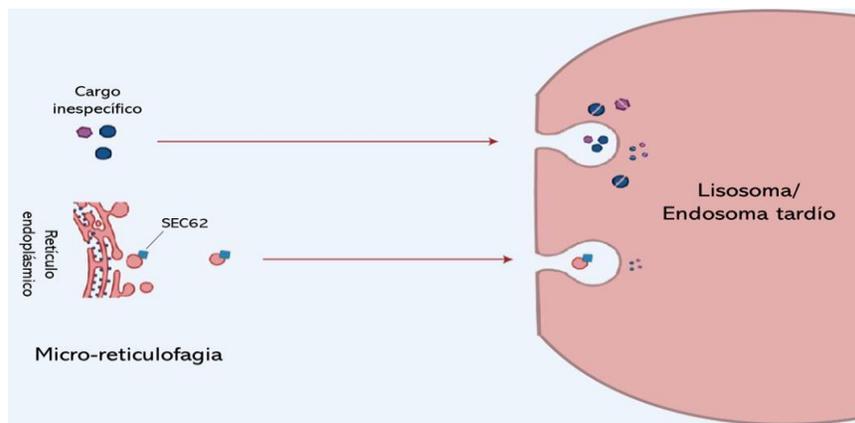
Es la degradación selectiva de patógenos y puede suceder de dos formas. En la primera, el DNA patógeno es detectado por el sensor cGAS, el cual activa la ubiquitinación mediante Smurf1 y recluta al receptor NBR1 y LC3 para continuar con el proceso de formación del fagóforo alrededor de la bacteria. Mientras que, en la segunda forma, el patógeno inflige daño en la membrana del fagosoma, exponiendo glucanos que reclutan a la Gal-8, la cual es reconocida por NDP52 y p62/SQSTM1, los cuales interactúan con la ubiquitina en el patógeno y reclutan a la maquinaria autofágica para continuar con el proceso de degradación (Aman, Y. et al., 2021).



Esquema 5. Subtipos de macroautofagia selectiva. Imagen modificada de Aman, Y. et al. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. Nature Aging.

- **Microautofagia:**

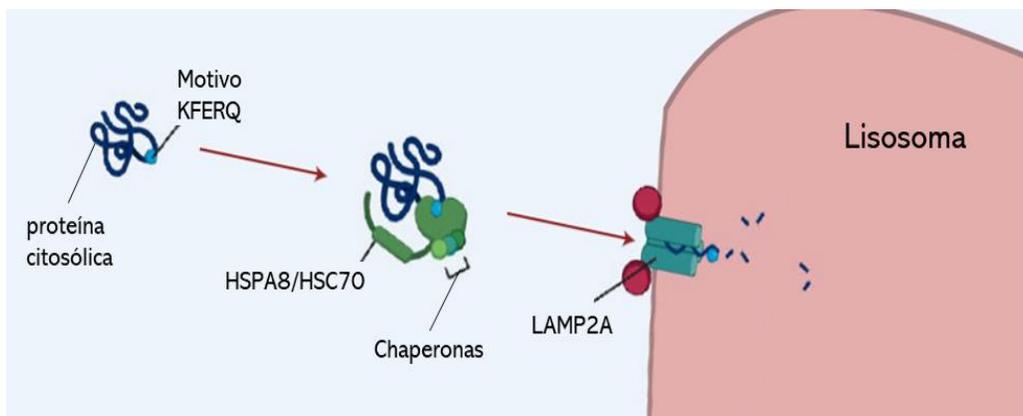
Como se ilustra en el **esquema 6**, el proceso en el cual el cargo es empaquetado a través de invaginaciones membranas a partir de la superficie de lisosomas o endosomas tardíos; este proceso puede ser tanto selectivo como inespecífico (Klionsky, D. J., et al., 2021). Un ejemplo de microautofagia selectiva es la micro-reticulofagia, que utiliza el receptor SEC62 e implica la captura y degradación del retículo endoplásmico por invaginación de la membrana del lisosoma o endosoma tardío (Aman, Y. et al., 2021).



Esquema 6. Microautofagia. Se ilustra grosso modo lo que sucede durante los procesos de microautofagia, la cual puede ser selectiva como en el caso de la micro-reticulofagia o no ser selectiva. Imagen modificada de Aman, Y. et al. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. Nature Aging.

- Autofagia mediada por chaperonas:

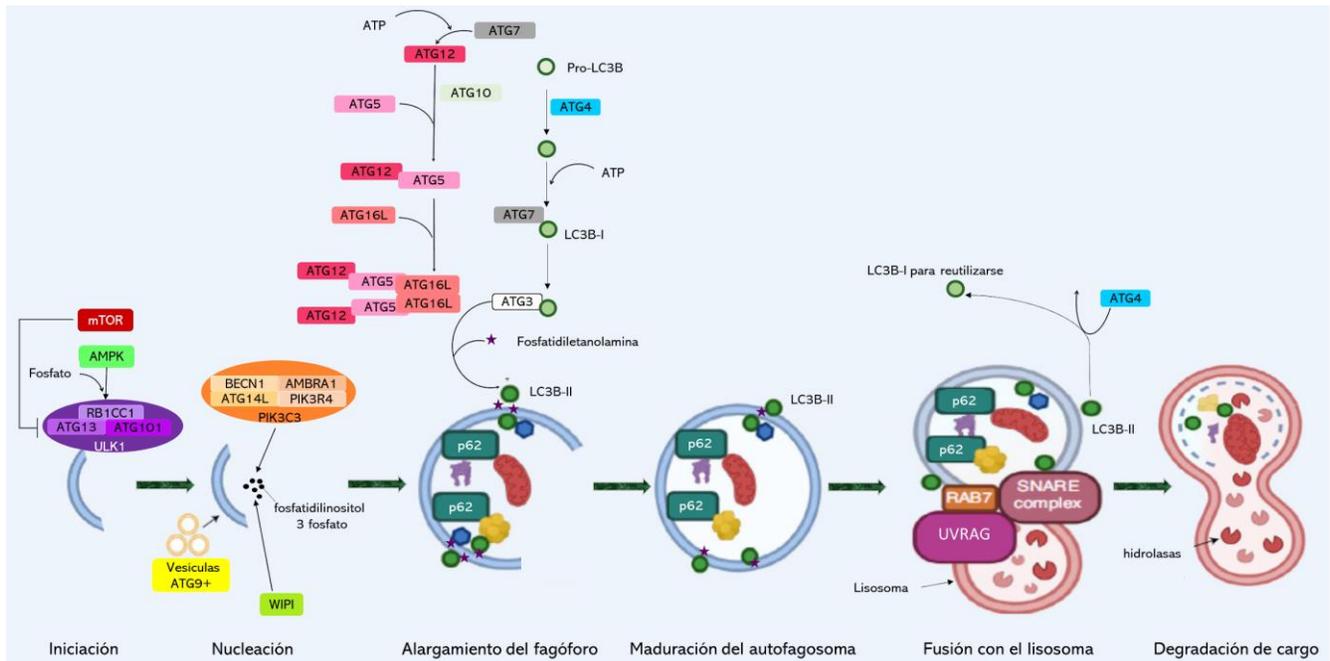
Como se ilustra en el **esquema 6**, la autofagia mediada por chaperonas (CMA) implica la degradación selectiva de proteínas portadoras de motivos similares a KFERQ que son liberadas a los lisosomas a través de la chaperona HSC70 y las co-chaperonas, como la proteína de choque térmico 70 o HSC70 (CHIP), la proteína de choque térmico 40 (HSP40; también conocida como DNABJ1) y la proteína organizadora HSP70–HSP90 (HOP), y su internalización en los lisosomas a través del receptor de proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A (LAMP2A). De todas las proteínas citosólicas, alrededor del 30% cuentan con el motivo “KFERQ” y esto incluye a enzimas glucolíticas, factores de transcripción, proteínas de unión a lípidos y calcio, subunidades del proteosoma y algunas proteínas involucradas en el tráfico vesicular (Klionsky, D. J., et al., 2021).



Esquema 7. Autofagia mediada por chaperonas (CAM). Se ilustra grosso modo lo que sucede durante los procesos altamente selectivos de autofagia que requieren la participación de chaperonas. Imagen modificada de Aman, Y. et al. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. Nature Aging.

El proceso central de la macroautofagia consta de varios pasos: iniciación, nucleación, alargamiento del fagóforo, maduración del autofagosoma, fusión con el lisosoma y degradación del cargo, como se ilustra en el **esquema 8**.

La iniciación ocurre tras la inhibición de mTOR y la activación de AMPK, los cuales son inductores de la autofagia en respuesta al estrés celular. Durante la iniciación, AMPK fosforila al complejo ULK1, el cual está compuesto por RB1CC1, ATG13 y ATG101. ULK1 estimula al complejo PIK3C3, compuesto por BECN1, AMBRA1, ATG14L y PIK3R4, para interactuar con ATG9 y promover la nucleación del autofagosoma (Galluzzi, L., et al., 2017).



Esquema 8. Participación de diferentes proteínas en el proceso central de autofagia. Se ilustran las diferentes proteínas y moléculas que participan en las diferentes etapas de la autofagia, desde la iniciación hasta la degradación del cargo por los autolisosomas. Imagen modificada de Aman, Y. et al. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. Nature Aging.

Durante el proceso de nucleación de la membrana, el complejo PIK3C3 produce una reserva de fosfatidilinositol 3 fosfato, que conduce al reclutamiento de proteínas WIPI; las cuales recuperan vesículas positivas para ATG9 de membranas preexistentes, que pueden provenir del retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática o mitocondria, por ejemplo (Galluzzi, L., et al., 2017).

En el proceso de alargamiento del fagóforo, coexisten dos sistemas de conjugación de proteínas tipo ubiquitina. En el primer sistema, ATG7 activa de manera dependiente de ATP a la proteína Atg12. Después ATG12 se transfiere a ATG10, lo cual potencia el enlace covalente entre ATG12 y ATG5. Seguido de la formación del complejo Atg5-Atg12 y con Atg16L1 para formar un complejo multimérico que funciona como andamio durante el proceso de elongación (Glick D. et al., 2010; Klionsky, D. J. et al., 2021). El segundo sistema, requiere de la participación de ATG3, ATG4 y ATG7 y es el responsable de la escisión de las proteínas que son miembros de la familia ATG8, como LC3 y su conjugación con la fosfatidiletanolamina (Klionsky, D. J. et al., 2021).

El segundo paso durante el alargamiento del fagóforo, es el procesamiento de la proteína pro-LC3B, la cual es escindida proteolíticamente por ATG4 para generar la forma LC3B-I. Después,

la glicina carboxiterminal expuesta por ATG4 se activa de manera dependiente de ATP por ATG7 (Glick D. et al., 2010).

La LC3B-I activada luego se transfiere a ATG3 antes de que la fosfatidiletanolamina se conjugue con la glicina carboxiterminal para generar la forma LC3B-II, la cual ya se encuentra procesada (Glick D. et al., 2010). La fosfatidiletanolamina (PE) es un fosfolípido que se encuentra en todos los organismos vivos. Junto con la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI), la PE representa la columna vertebral de la mayoría de las membranas biológicas. La PE es el segundo fosfolípido más abundante en las membranas de los mamíferos y oscila entre el 20 y el 50 %. La PE puede producirse por descarboxilación de PS, como primera opción a nivel de la membrana mitocondrial a través de la fosfatidilserina descarboxilasa 1 (Psd1) o, como segunda opción, a nivel del aparato de Golgi y vacuolar a través de la fosfatidilserina descarboxilasa 2 (Psd2), una tercera posibilidad es que la PE se puede producir a partir de etanolamina extracelular que se activa con citidina 5'-difosfato y luego se acopla a diacilglicerol para generar PE. El reclutamiento e integración de LC3B-II en el fagóforo depende de la interacción con el complejo E3. Aunque la proteína LC3B es la que más menciona durante la descripción de los procesos autofágicos, en mamíferos existen al menos seis proteínas tipo ATG8 (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL y GATE-16) que son funcionalmente homólogas durante el proceso de autofagia (Galluzzi, L., et al., 2017).

Una vez acoplada en el fagóforo, LC3B-II interactúa con p62/SQSTM1. La molécula p62 es una proteína de 440 aa que contiene tres dominios plegados estructuralmente: un dominio PB1 (1–102), un dominio ZZ (122–167) y un dominio de unión a ubiquitina UBA (389–434). Además, contiene una región larga intrínsecamente desordenada (IDR) (168–388), que proporciona sitios de unión a varias proteínas como LC3, KEAP1 y FIP200 a través de motivos de unión cortos. p62 se relaciona con la formación de inclusiones positivas de ubiquitina y se une a LC3II para facilitar la degradación autofágica. El dominio UBA de p62 es crítico para el reconocimiento de poliubiquitina y carga ubiquitinada (Dikic, I. y Elazar, Z., 2018; Glick D. et al., 2010).

Además de procesar a pro-LC3, ATG4 juega otro papel importante, que es escindir LC3B-PE, lo que se denomina deslipidación o desconjugación. La desconjugación por ATG4B tiene al menos dos funciones: una es reciclar a proteínas tipo ATG8 para la siguiente ronda de la reacción de conjugación, y la otra es promover directamente el paso de elongación de la

membrana del fagóforo. Dado que tanto el procesamiento como las reacciones de delipidación por ATG4 son importantes para la formación de autofagosomas, la inhibición de ATG4 conduce a la inhibición de la autofagia en el paso de la formación de autofagosomas. Entre las proteínas ATG, ATG4B ha sido identificada como la proteasa que funciona en la lipidación/delipidación de la proteína ATG8. En las células de mamíferos, hay cuatro homólogos de ATG4 (ATG4A, ATG4B, ATG4C y ATG4D), que poseen una actividad de procesamiento frente a los homólogos de ATG8 (Dikic, I. y Elazar, Z., 2018).

Cuando se completa la fusión de los extremos del fagóforo en expansión, se denomina a esta vesícula como autofagosoma maduro. El tamaño del autofagosoma está controlado por las cinasas NUAK2 y BRSK2 a través de la interacción con ATG2 y WIPI4 (Dikic, I. y Elazar, Z., 2018) y su diámetro generalmente oscila entre 0.5 y 1.5 μm en mamíferos (Parzych, K. R. y Klionsky, D. J., 2014). Una vez que madura el autofagosoma, la membrana externa se fusiona con la membrana lisosomal, dando lugar a la formación de un autolisosoma (Glick D. et al., 2010); o bien, se fusiona con un endosoma tardío para formar un anfisoma (Parzych, K. R. y Klionsky, D. J., 2014). La fusión de los autofagosomas con los lisosomas requiere la participación de UVRAG, que puede activar a la GTPasa RAB7 y a las proteínas SNARE para promover la fusión (Parzych, K. R. y Klionsky, D. J., 2014).

La última etapa del proceso autofágico es la degradación del cargo junto con la membrana interna del autofagosoma en el interior de los lisosomas gracias a la actividad de las hidrolasas (Galluzzi, L., et al., 2017). Tras la fusión de los lisosomas con la membrana externa de un autofagosoma, el contenido lisosomal ingresa al espacio entre las 2 membranas del autofagosoma y la degradación de la membrana interna del autofagosoma ocurre de manera dependiente de LC3. Una vez que la membrana interna se rompe, comienza el proceso de degradación de la carga autofagosomal. Los productos de degradación, incluidos los aminoácidos y los azúcares, se transportan fuera del autolisosoma a través de miembros de una familia de transportadores de lisosomas y, en consecuencia, se reduce el volumen del autolisosoma. Los autolisosomas no son estructuras permanentes y se desintegran una vez que finaliza la autofagia.

El paso de terminación de la autofagia es un proceso denominado reformación de lisosomas autofágicos (ALR). Durante la ALR, las proteínas de la membrana lisosomal se reciclan de los autolisosomas a través de estructuras tubulares denominadas túbulos de reforma. En las

puntas de estos túbulos, los lisosomas nacientes, llamados proto-lisosomas, se forman a través de un proceso de escisión/brotación. Inicialmente, los proto-lisosomas no son ácidos y no contienen proteínas de la luz del lisosoma, pero finalmente maduran hasta convertirse en lisosomas funcionales de una manera dependiente de la síntesis de proteínas (Yu L. et al., 2018).

Dada la relevancia de las proteínas LC3B, ATG4, ATG5, ATG7 y p62/SQSTM1, que participan en la maquinaria de la autofagia desde el la formación y alargamiento del fagóforo hasta maduración del autofagosoma, y p62 como receptor del cargo y adaptador, en este proyecto de maestría decidimos evaluar su localización en el pulmón de pacientes con NH en comparación con sujetos control, además de analizar diferencias en la localización celular y subcelular y el nivel de proteína en extracto total de biopsias.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Existen diferencias en la expresión de proteínas clave de la autofagia en el pulmón de pacientes con NH en comparación con el pulmón de sujetos control?
- ¿Qué células en el pulmón de pacientes con NH y de sujetos control están expresando a los distintos marcadores de autofagia, existe alguna diferencia?
- ¿Hay cambios en la localización subcelular de los distintos marcadores de autofagia en condiciones patológicas (NH) en comparación con condiciones fisiológicas (control)?

4. JUSTIFICACIÓN

La autofagia es un proceso de degradación celular esencial para la homeostasis de los tejidos, y alteraciones en este proceso han sido asociadas con distintas patologías, sin embargo, los marcadores de autofagia aún no se han estudiado en la patogénesis de la NH. Por lo tanto, será relevante analizar el nivel de expresión y la localización celular y subcelular de las proteínas que participan en la autofagia en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH.

5. HIPÓTESIS

La expresión de los marcadores de autofagia estará aumentada en el pulmón de pacientes con NH, en comparación con el pulmón de individuos que no padecen esta enfermedad, los sujetos control.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la localización celular y nivel de expresión de los marcadores de autofagia en tejido pulmonar derivado de biopsias de pacientes diagnosticados con NH y de sujetos control.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el nivel de las proteínas de autofagia LC3, p62/SQSTM1, ATG4B, ATG5 y ATG7 en extracto total de proteína del pulmón de pacientes con NH y de sujetos control.
2. Evaluar los tipos celulares y localización subcelular de las proteínas LC3, p62/SQSTM1, ATG4B, ATG5 y ATG7 en el tejido pulmonar de pacientes con NH y de sujetos control.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Biopsias del pulmón incluidas en parafina, obtenidas como parte del diagnóstico, bajo consentimiento informado, de seis pacientes (4 mujeres y 2 hombres, de edad media 53 ± 6.5 años, 3 exfumadores) diagnosticados con NH, y de 3 individuos sin enfermedad pulmonar (una mujer y dos hombres, de edad media 59 ± 8.5 años, no fumadores) utilizados como controles, monitoreados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México, fueron utilizadas para obtener cortes de 5 micras para inmunohistoquímica.

La NH fue diagnosticada de acuerdo con los criterios de un equipo multidisciplinario con estudios de tomografía computarizada de alta resolución y análisis de lavado bronquioalveolar. En el servicio de Anatomía Patológica se recibieron las muestras biológicas de los pacientes y se obtuvieron sus informes diagnósticos. El tejido pulmonar fue fijado en formol al 4% y embebido en parafina, se le asignó un número clave para el archivo, y forma parte del Biobanco de biopsias del INER. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México.

7.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron cortes de los tejidos embebidos en parafina, seriados, de $5\mu\text{m}$ de grosor, además se solicitó que éstos fueran montados en la misma posición en la laminilla salinizada, para la localización de las mismas regiones en el tejido los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Morfología del INER. Las secciones de tejido se desparafinaron, rehidrataron y permeabilizaron con 3% de H_2O_2 en metanol; seguido del rescate del antígeno en un microondas en buffer de citratos 10 mM, pH 6,0. Las secciones de tejido se trataron con solución de bloqueo universal durante 10 minutos, y luego se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios (dilución 1:100) para autofagia: anti-LC3B (L7543; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), anti-p62 (P0067; Sigma-Aldrich), anti-ATG4B (A2981; Sigma-Aldrich), anti-ATG5 (A0731; Sigma-Aldrich), and anti-ATG7 (A2856; Sigma-Aldrich). Se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (BioGenex, HK330-5K) y 3-amino-9-etil-carbazol (BioGenex, HK092-5K) en buffer de acetatos con 0,05% de H_2O_2 como sustrato. Las preparaciones histológicas se contra tiñeron con hematoxilina. El anticuerpo primario se reemplazó por suero no inmune para

los portaobjetos del control negativo. Las imágenes de los cortes histológicos se fotografiaron y analizaron con un microscopio óptico con objetivos 40X, 100X y el software NIS-Elements (Nikon Instruments., Melville, NY). Se evaluaron un mínimo de cinco campos representativos, no superpuestos de pulmones de los seis sujetos con NH y tres controles. La identificación de poblaciones celulares se realizó bajo la tutela del Dr. Miguel Gaxiola Gaxiola, patólogo y jefe del laboratorio de morfología del INER.

7.3 WESTERN BLOT

El tejido pulmonar se homogeneizó en un buffer de Tris 20 mM, pH 7,4, con NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1% (Sigma-Aldrich, T8787), EDTA 10 mM y un cóctel inhibidor de proteasas UltraCruz (Santa Cruz Biotechnology, sc-29131). Los tejidos y los extractos celulares se centrifugaron a 15,000 xg a 4 ° C y se recuperaron las fracciones del sobrenadante.

La concentración de proteínas se cuantificó mediante la técnica del ácido bicinonínico (kit de ensayo de proteínas BCA, Pierce Biotechnology, 23225). Se cargó un total de 25 µg de proteína en geles de SDS-poliacrilamida al 8% o al 13%. Después de la electroforesis, los geles se transfirieron por electro transferencia a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore, IPV H00010) luego, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-T (Buffer de Tris con Tween 20 al 0,05% [Sigma-Aldrich, P9416]) y se incubaron durante la noche a 4 ° C con los siguientes anticuerpos primarios para autofagia: anti-LC3B, anti-p62, anti-ATG4B, anti-ATG5, anti-ATG7 y GAPDH en una concentración 1:1000. Después de 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente a una dilución de 1: 3000 en leche al 1,5% en TBS-T y finalmente, la reacción se desarrolló con sustrato Immobilon Western Chemiluminescent HRP (Millipore, WBKLS0500). Las membranas se revelaron usando un fotodocumentador (Chemidoc).

7.4 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Todos los datos experimentales se reportan como media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student utilizando Graphpad Prism Software Versión 6.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) y los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron como significativos.

8. RESULTADOS

En este proyecto de maestría se evaluó la localización de distintas proteínas de la maquinaria de autofagia en el pulmón de individuos control y en pacientes diagnosticados con NH. En esta tesis se evaluaron proteínas que pertenecen a los dos sistemas de conjugación de tipo ubiquitina, los cuales son cruciales tanto para la formación como para la maduración de los autofagosomas. En el primer sistema de conjugación de ATG12, ATG12 es activado por ATG7 y se transfiere a ATG10 para posteriormente conjugarse con ATG5, formando el complejo ATG12-ATG5. De este sistema se seleccionaron a las proteínas ATG5 y ATG7 (Tanida I. et al., 2008). Del el segundo sistema, seleccionamos a ATG4B, a LC3B que participa en la elongación del fagóforo, hasta la maduración del autofagosoma, y al receptor p62/SQSTM1, que interactúa directamente con LC3B-II y reconoce a los diferentes sustratos que serán degradados por autofagia (Barth S. et al., 2010).

Para corroborar que la interacción de los anticuerpos primarios era específica contra los distintos epítopes, y descartar que el anticuerpo secundario se pudiera estar uniendo inespecíficamente, incubamos tejidos de pacientes con NH en donde observamos tinción positiva de los marcadores seleccionados, y las laminillas fueron procesadas de la misma forma durante todo el protocolo. Como se muestra en la **Figura 1**, no se identificó señal positiva (en color rojo) en ningún tejido, lo cual indica que no hay interacciones inespecíficas que estén dando falsos positivos.

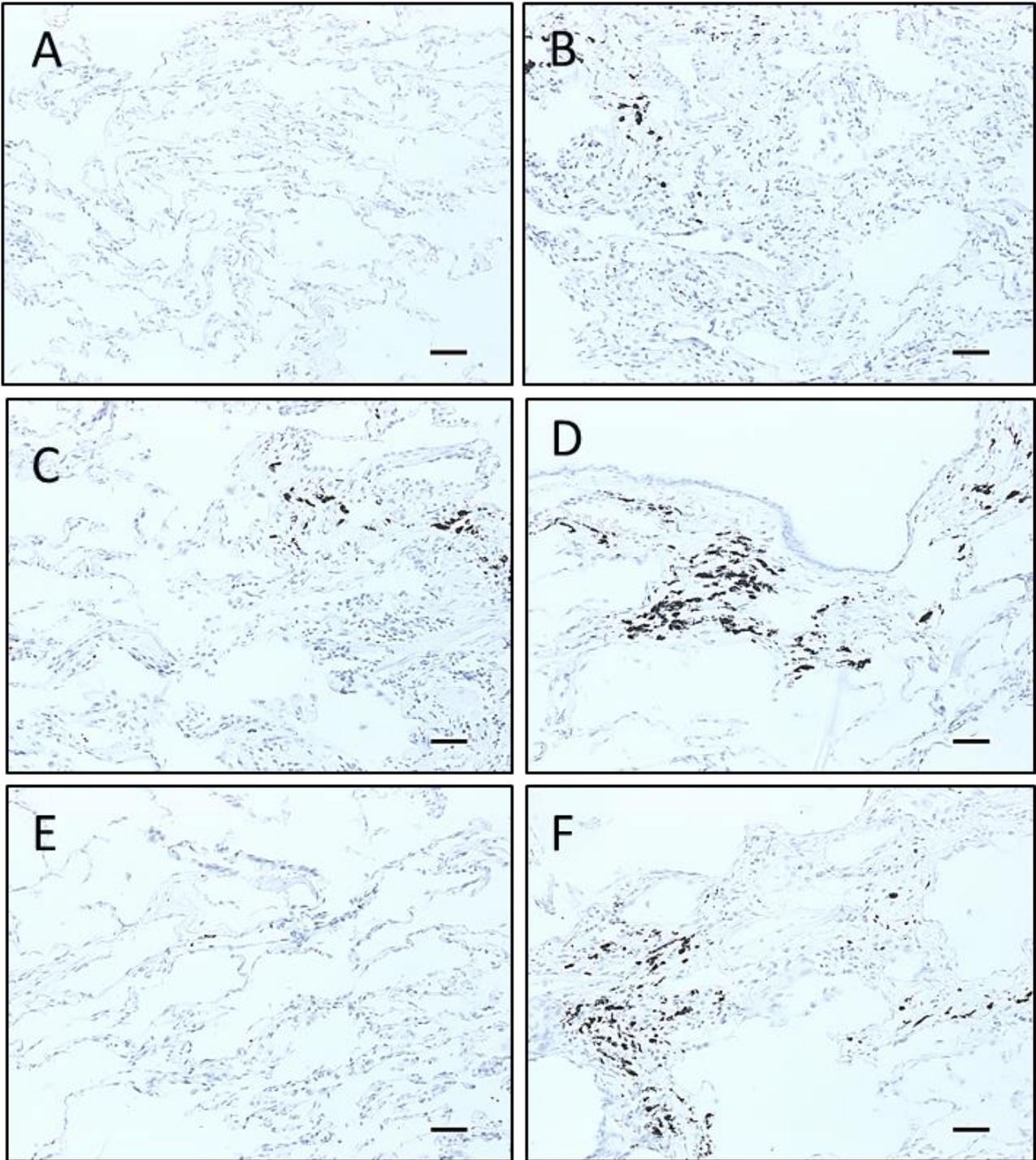


Figura 1. Microfotografías representativas de los tejidos control negativo (tejidos incubados sin anticuerpo primario y con anticuerpo secundario anti-conejo y estreptavidina). Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Barra de escala 50 μ m

8.1 INMUNOLocalIZACIÓN DE LC3B

En el pulmón de individuos control, observamos una señal positiva tenue para la proteína LC3B en el citoplasma de algunos macrófagos alveolares y en algunas células del epitelio bronquial, mientras que en otros tipos de células la señal resultó negativa (**Figura 2A-C**). Por el contrario, en el pulmón de pacientes con NH, LC3B presentó una tinción positiva fuerte en epitelio bronquial (**Figura 3A**), en macrófagos alveolares e intersticiales (**Figura 3B, C**), en el epitelio alveolar (**Figura 3C**) y en menor medida en células de músculo liso y endotelio. Casi todos los macrófagos acumulados dentro de los espacios alveolares fueron positivos para LC3B y mostraron una tinción citoplasmática con un patrón granular en los pulmones de sujetos diagnosticados con NH. Observamos una tinción citoplasmática positiva de mayor intensidad para LC3B en células epiteliales alveolares hipertróficas e hiperplásicas adyacentes a focos de fibrosis y en el epitelio de bronquiolos respiratorios presentes en zonas fibróticas como se muestra en la **Figura 3C**.

Figura 2. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de LC3B en el pulmón de sujetos control. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). Barra de escala a la izquierda 100 μm y 50 μm a la derecha.

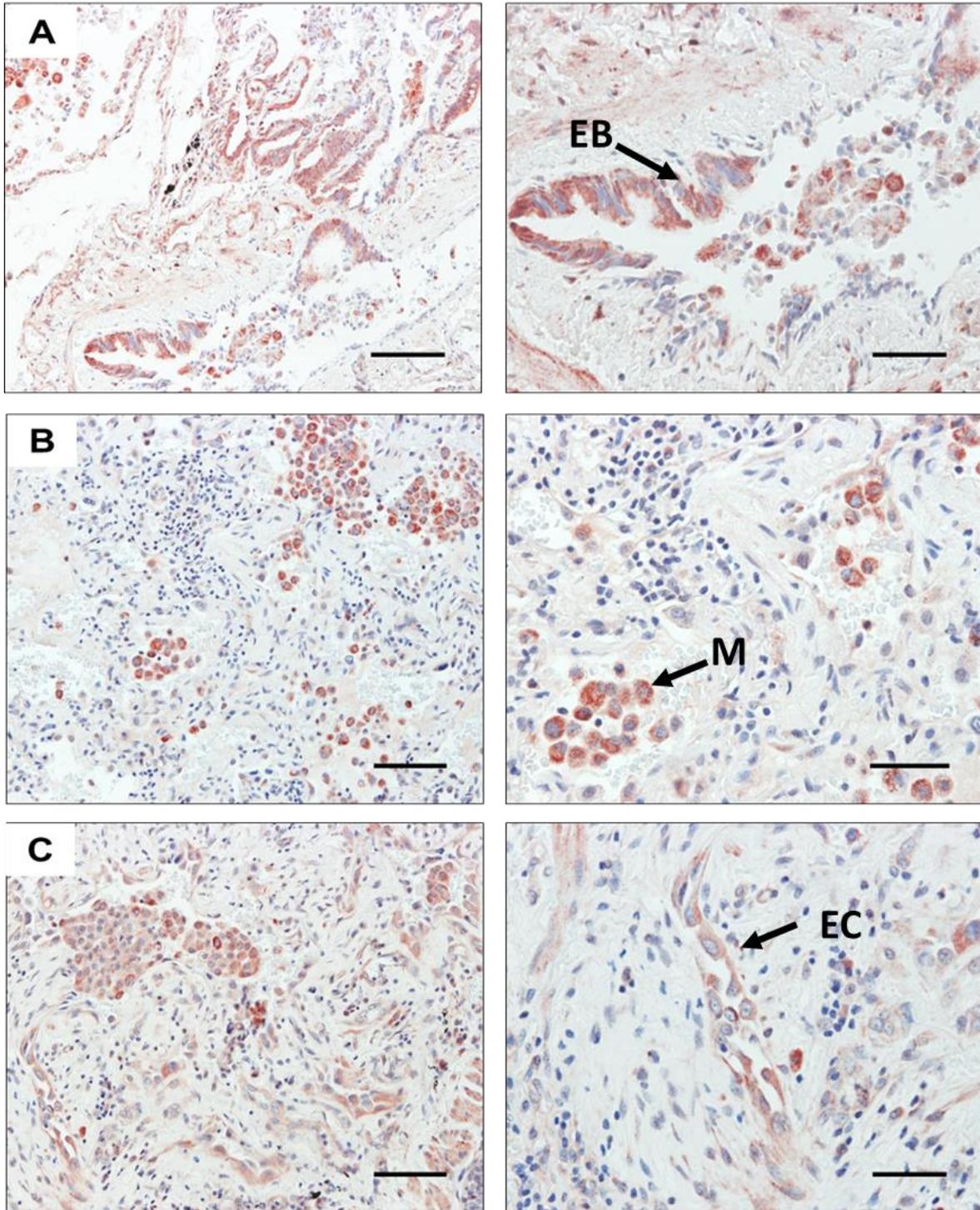


Figura 3. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de LC3B en el pulmón de pacientes con NH. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). EB: Epitelio bronquial, M: macrófagos, EC: epitelio cuboidalizado. Barra de escala a la izquierda 100 µm y 50 µm a la derecha.

8.2 INMUNOLocalización DE P62/SQSTM1.

Dado que p62 se localiza en el autofagosoma a través de la interacción directa con LC3B, también se investigó la localización celular de p62/SQSTM1. En los pulmones de los sujetos control, se observó una tinción tenue para p62/SQSTM1 en algunos macrófagos y células epiteliales bronquiales (**Figura 4A-C**). En los pulmones de sujetos con NH, se observó una tinción positiva intensa bastante similar al patrón granular que presentaba LC3B, en el citoplasma de macrófagos intersticiales y alveolares (**Figura 5A**). El epitelio alveolar y bronquial mostró de igual forma una tinción de patrón granular (**Figura 5A, B**), adicionalmente también se encontró en menor medida tinción positiva de tenue a moderada para algunas células de músculo liso y linfocitos en los pulmones de sujetos con NH. Interesantemente, se observó tinción positiva para p62/SQSTM1 en el núcleo de macrófagos intersticiales en el tejido pulmonar de sujetos con NH (**Figura 5C**), mientras que la tinción nuclear fue bastante inusual en los pulmones de los sujetos control; sin embargo, sí se observaron algunos macrófagos alveolares con tinción nuclear positiva.

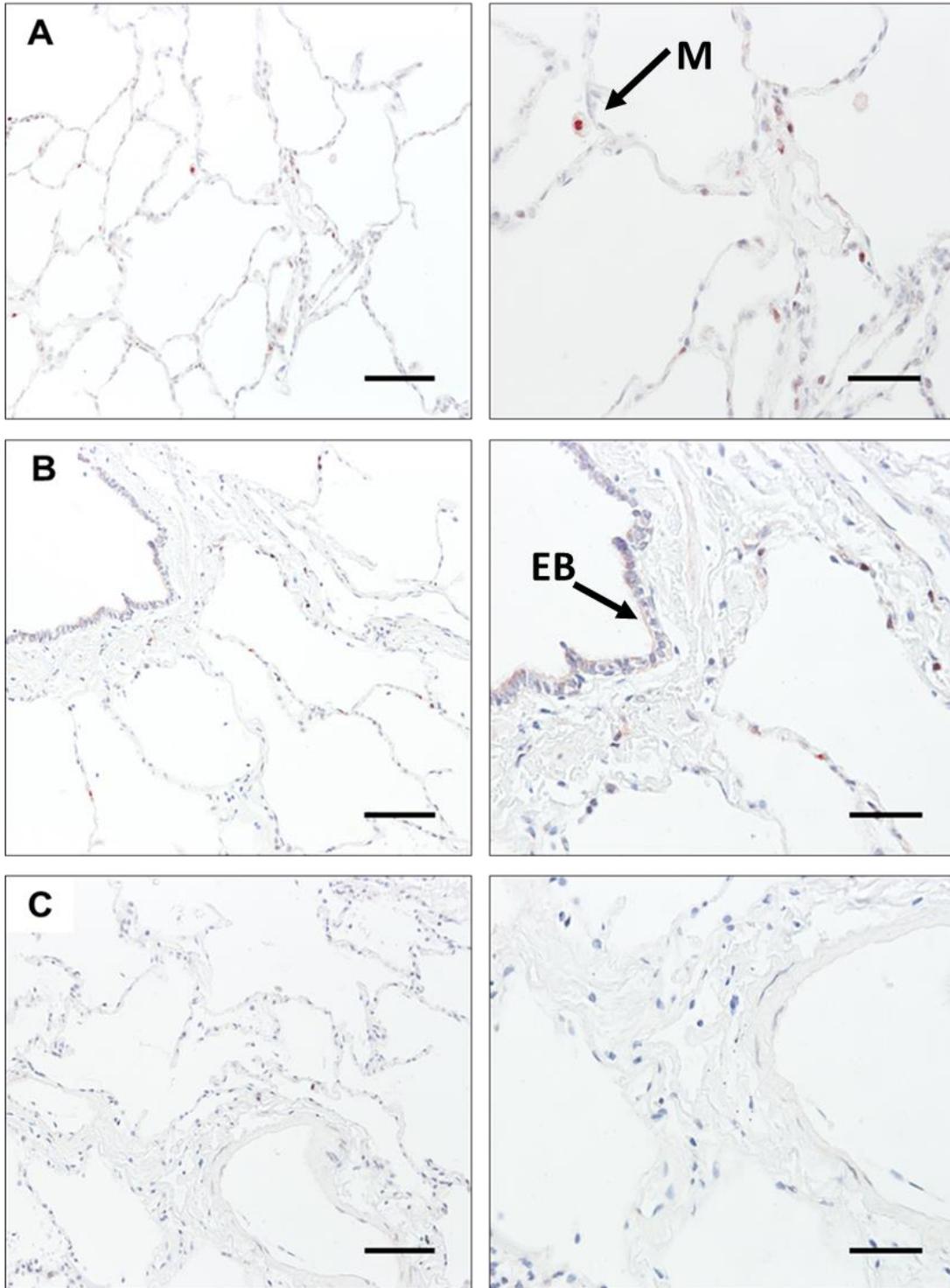


Figura 4. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de p62/SQSTM1 en el pulmón de individuos control. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). EB: Epitelio bronquial y M: macrófagos. Barra de escala a la izquierda 100 μm y 50 μm a la derecha.

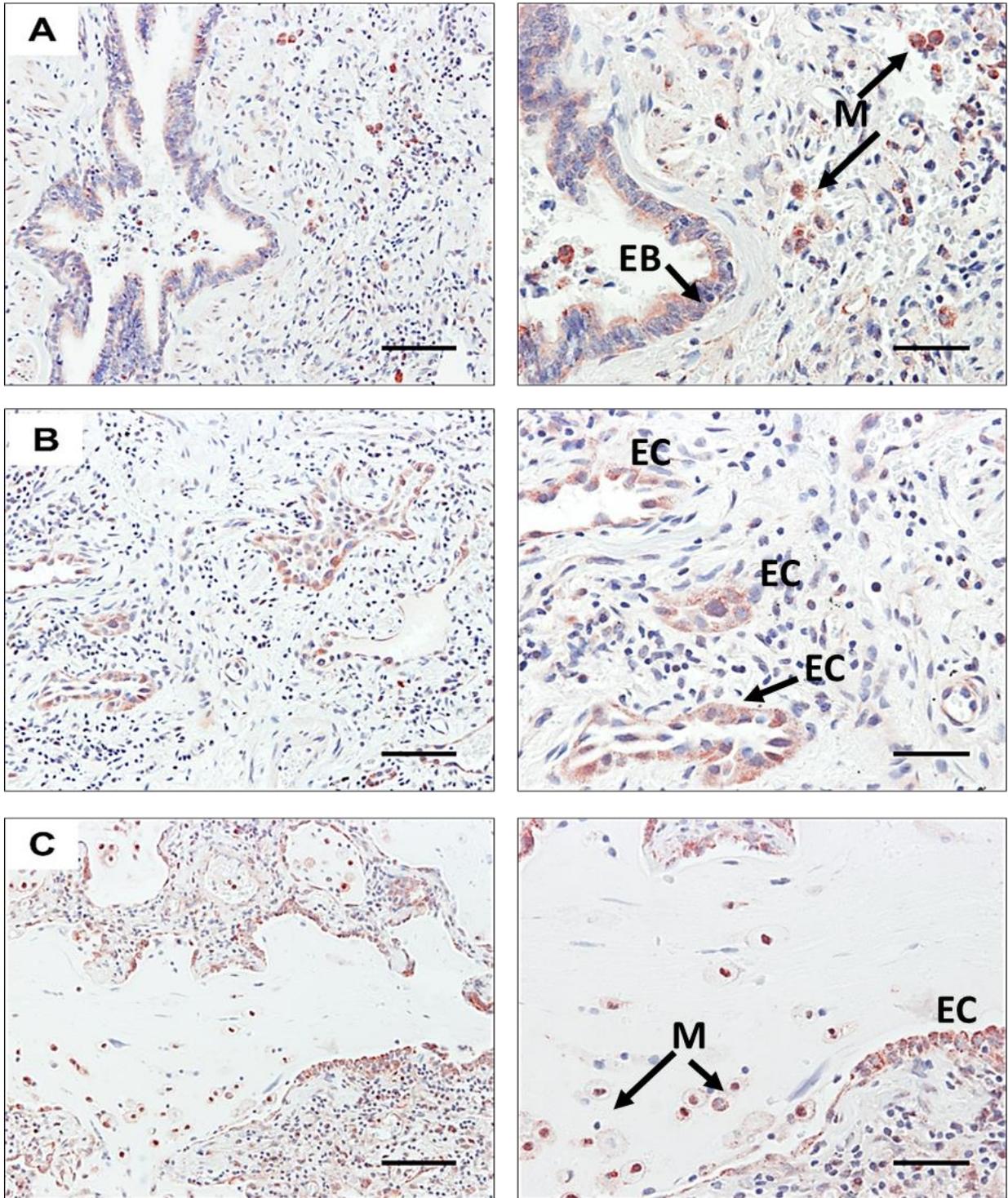


Figura 5. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de p62/SQSTM1 en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). EB: Epitelio bronquial, M: macrófagos, EC: epitelio cuboidalizado. Barra de escala a la izquierda 100 μ m y 50 μ m a la derecha.

8.3 INMUNOLocalIZACIÓN DE ATG4B.

En los pulmones de los sujetos control, la señal para ATG4B se identificó como una tinción positiva débil en macrófagos (**Figura 6A**) mientras que en otras células resultó negativa (**Figura 6A-C**). En el tejido de sujetos con NH, la tinción positiva se identificó principalmente en macrófagos alveolares y en epitelio tanto bronquial como alveolar circundante a las áreas fibróticas, también en células plasmáticas y en algunas células intersticiales (**Figura 7A-C**).

Figura 6. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG4B en el pulmón de sujetos control. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). M: macrófago. Barra de escala a la izquierda 100 μm y 50 μm a la derecha.

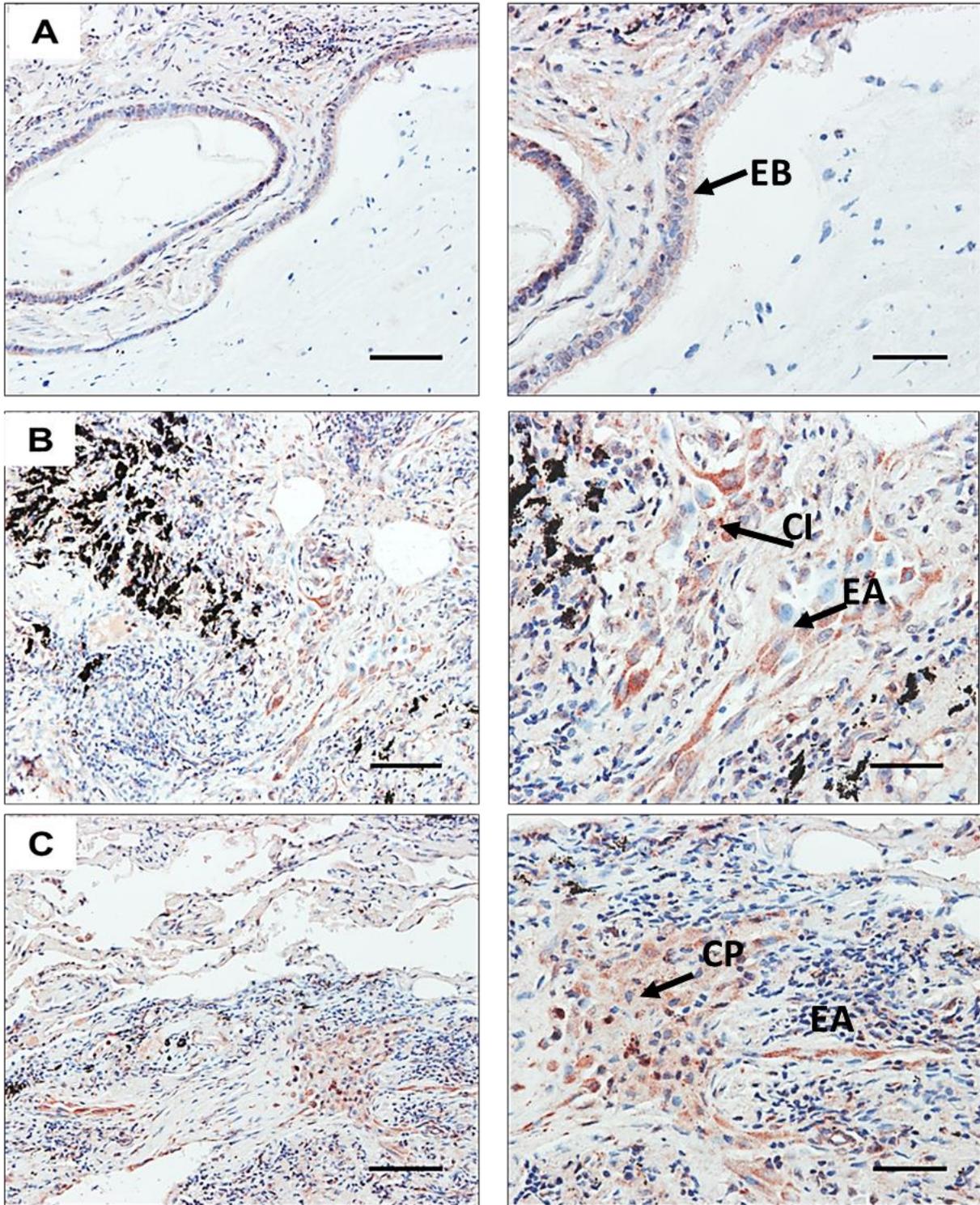


Figura 7. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG4B en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). EB: Epitelio bronquial, M: macrófagos, EA: epitelio alveolar, CI: célula intersticial, CP: célula plasmática. Barra de escala a la izquierda 100 μm y 50 μm a la derecha.

8.4 INMUNOLocalIZACIÓN DE ATG5 Y ATG7.

Observamos señal positiva para la proteína ATG5 tanto en el pulmón de sujetos control como en el pulmón derivado de sujetos con NH en células de músculo liso bronquial y endotelio (**Figura 8A, C, Figura 9B, C**). Sin embargo, en tejido de sujetos con NH se identificó una tinción más intensa en células endoteliales y de músculo liso (**Figura 9B**), en macrófagos alveolares e intersticiales y en algunos neutrófilos presentes en áreas alveolíticas (**Figura 9B**). Resulta particularmente interesante, que encontramos tinción positiva en la periferia de la membrana plasmática en algunos macrófagos y mastocitos (**Figura 9A**).

En cuanto a la localización de ATG7, en el tejido de los sujetos control, se observó una tinción positiva muy tenue únicamente en algunas células de músculo liso y endotelio (**Figura 10A-C**). Sin embargo, en tejido derivado de sujetos con NH, se observó una tinción positiva más intensa en macrófagos, en células epiteliales y en algunos neutrófilos (**Figura 11A-C**).

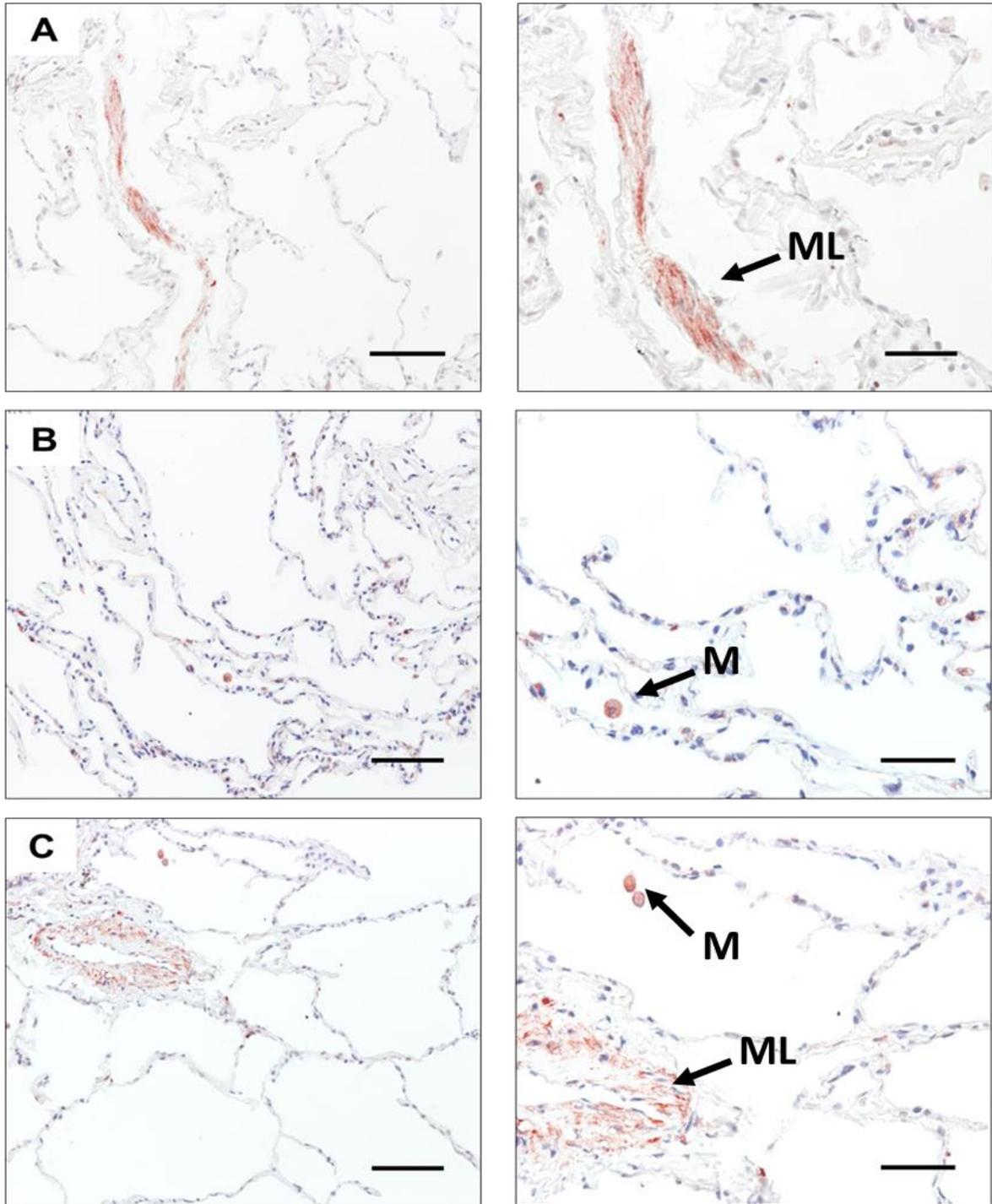


Figura 8. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG5 en el pulmón de sujetos control. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). ML: músculo liso, M: macrófagos. Barra de escala a la izquierda 100 μm y 50 μm a la derecha.

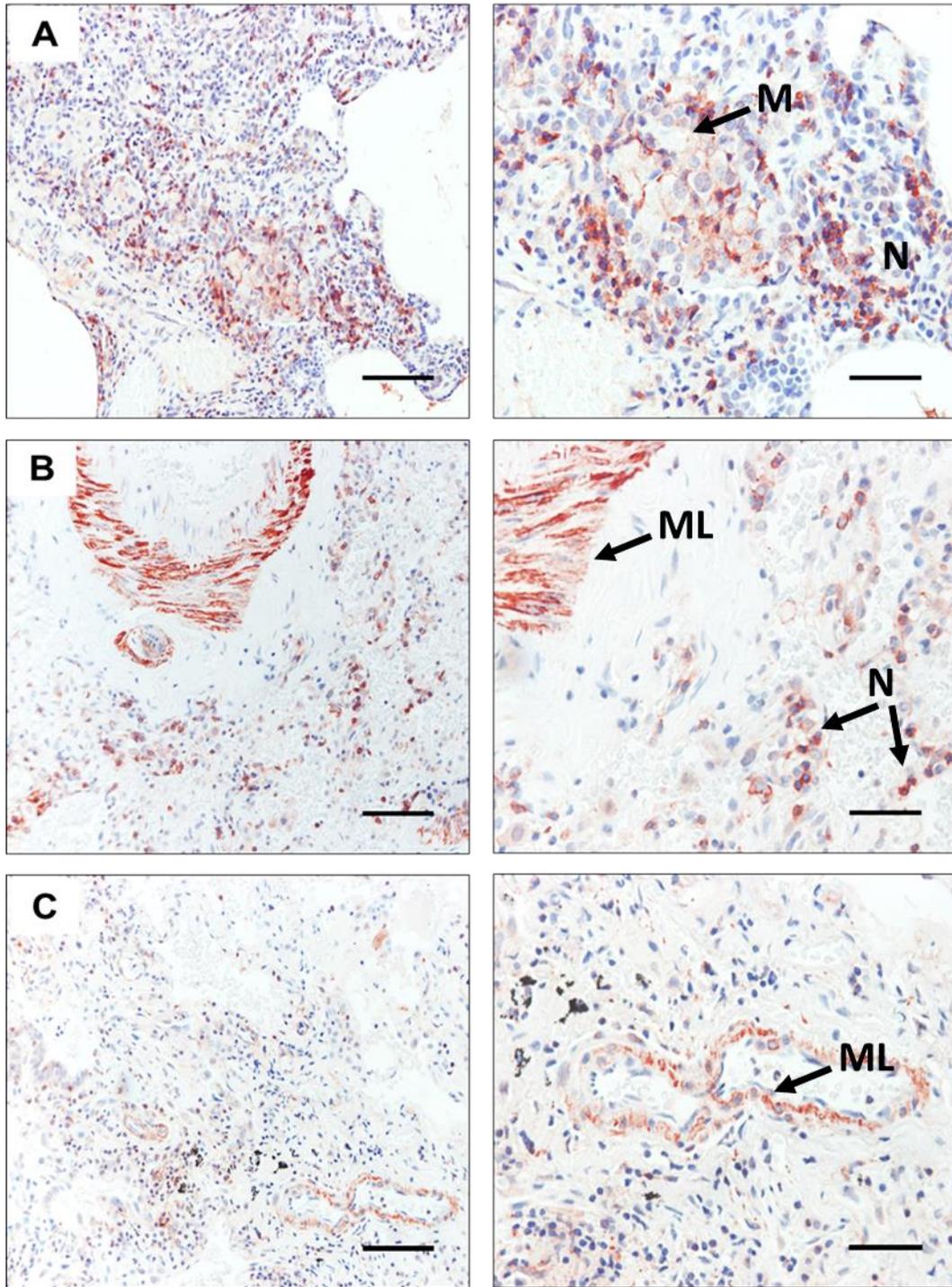


Figura 9. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG5 en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). ML: músculo liso, M: macrófagos, N: neutrófilos. Barra de escala a la izquierda 100 µm y 50 µm a la derecha.

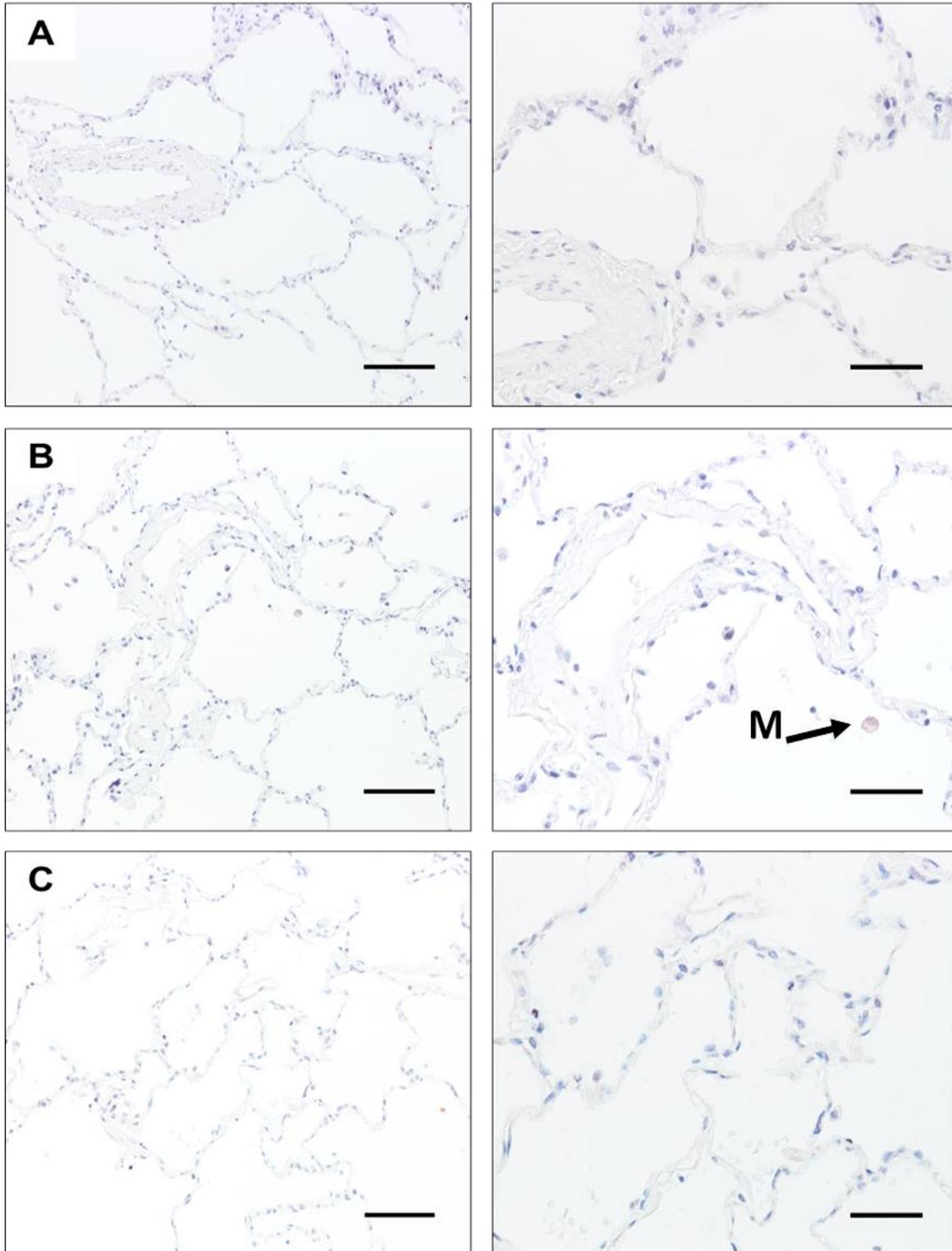


Figura 10. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG7 en el pulmón de sujetos control. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). M: macrófago. Barra de escala a la izquierda 100 μ m y 50 μ m a la derecha.

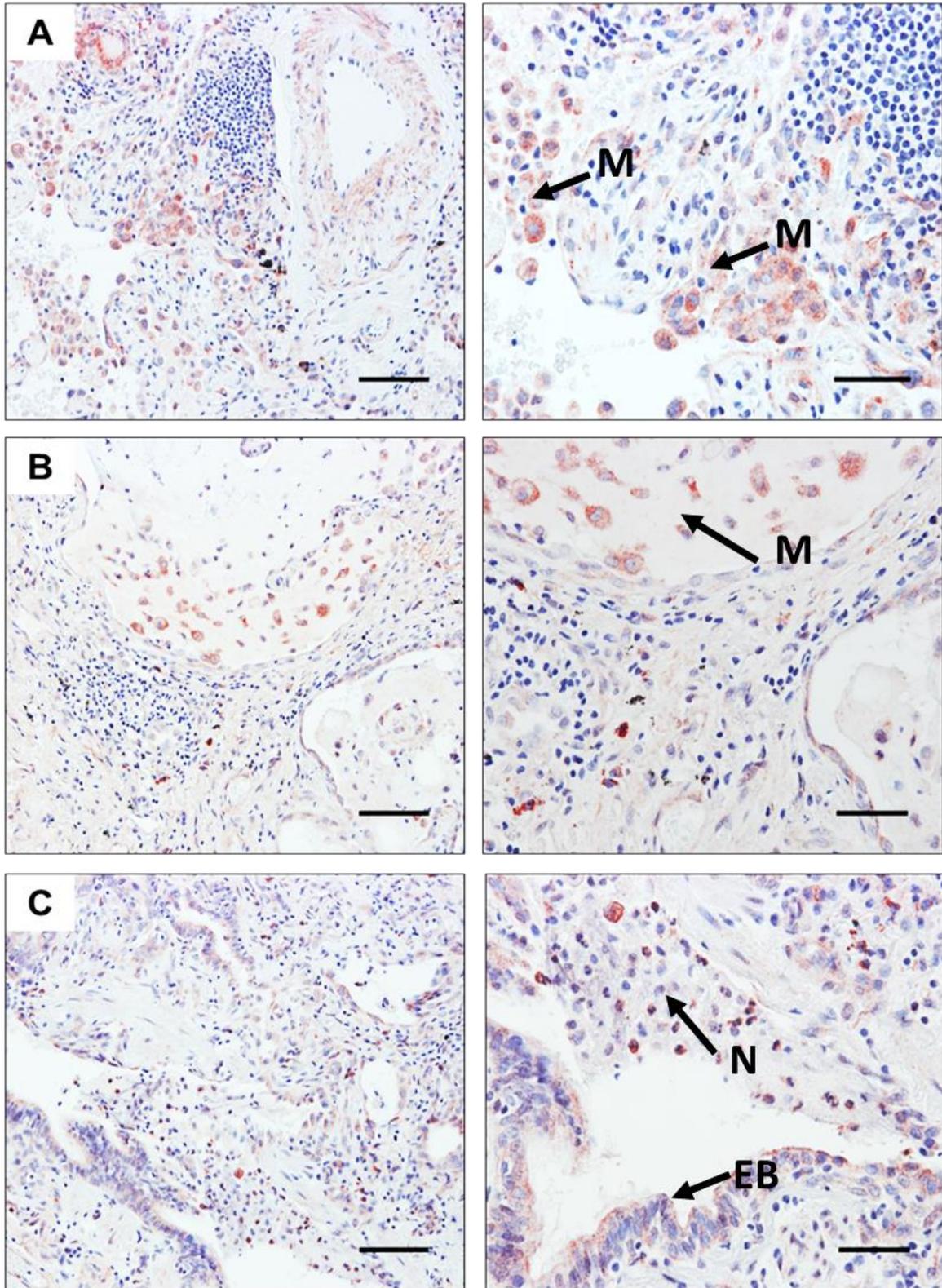


Figura 11. Microfotografías representativas de la inmunolocalización de ATG7 en el pulmón de pacientes diagnosticados con NH. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). EB: Epitelio bronquial, M: macrófagos, N: neutrófilo. Barra de escala a la izquierda 100 µm y 50 µm a la derecha.

8.5 WESTERN BLOT

Mediante Western blot, se observó un incremento a nivel proteico tanto de LC3B-I como de LC3B-II y de p62/SQSTM1 en extractos de tejido pulmonar de sujetos con NH en comparación con extractos de tejidos control, estos hallazgos refuerzan lo observado por inmunohistoquímica. En cuanto a ATG4B y ATG5, también se observó un incremento significativo a nivel proteico; a diferencia de ATG7 el cual no presentó un incremento significativo comparado con el extracto de tejido pulmonar de los sujetos control (**Figura 12**).

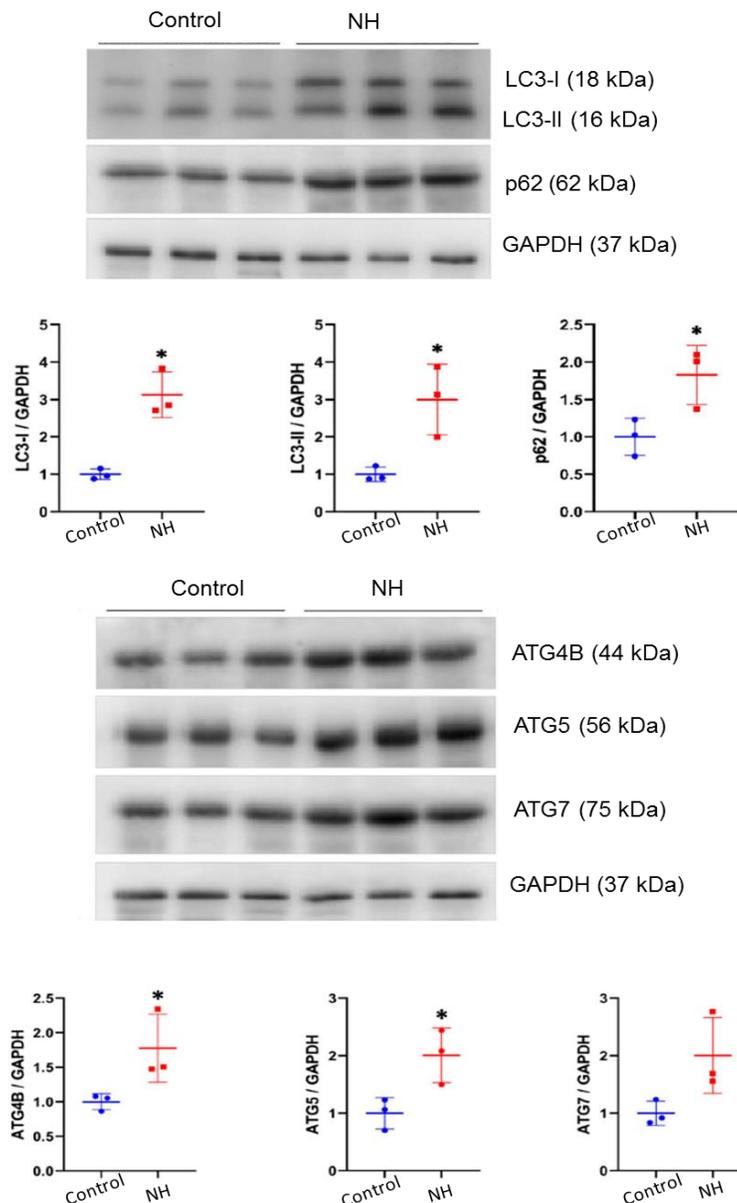


Figura 12. Resultados de Western blot de los marcadores de autofagia y cuantificación por densitometría. Se muestra la diferencia entre los niveles proteicos de los distintos marcadores de autofagia tanto en sujetos control como en sujetos con

NH. Los resultados se muestran como media \pm SD. La diferencia estadística se determinó mediante la prueba t de Student (* $p < 0,05$).

De manera general, la expresión de los diferentes marcadores de autofagia evaluados en este trabajo varía en cuanto a su localización en las diferentes poblaciones celulares que existen en el pulmón. Sin embargo, los resultados de tinción por inmunohistoquímica demuestran que todos los marcadores de autofagia seleccionados para este estudio se localizan principalmente en macrófagos tanto de sujetos con NH como de los sujetos controles, aunque con una tinción de mayor intensidad en sujetos con NH.

Adicionalmente, dado que no se puede colocalizar más de una proteína mediante ensayos de inmunohistoquímica, se determinó la localización basal de todos los marcadores de autofagia en tejidos de sujetos control, utilizando cortes seriados y usando el mismo campo para la captura de imágenes. Se visualizan estructuras alveolares y un bronquio en **A**, se identifica la tinción positiva para LC3B únicamente en algunos macrófagos alveolares; en **B**, se identifica tinción positiva para p62 en algunas células del epitelio bronquial; en **C**, se identifica tinción positiva para ATG4B en células bronquiales, alveolares y macrófagos; en **D**, se identifica tinción positiva para ATG5 en músculo liso bronquial y en **E**, no se identifica tinción positiva para ATG7 (**Figura 13**).

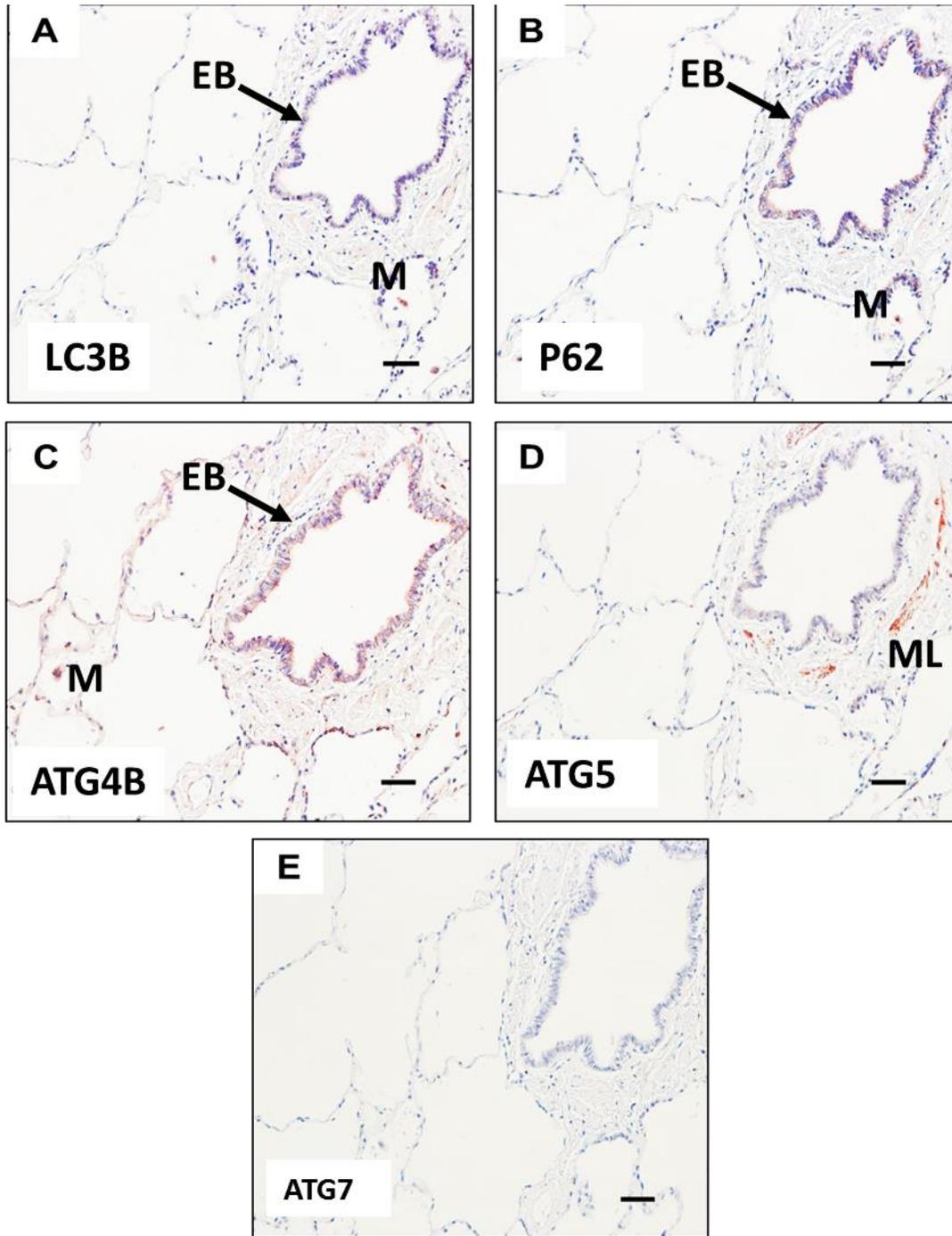


Figura 13. Microfotografía representativa de los distintos marcadores de autofagia identificados en el mismo campo en el pulmón de un sujeto control. La señal positiva se observa en rojo. Los núcleos de las células fueron teñidos con hematoxilina (azul). EB: Epitelio bronquial, M: macrófago, ML: músculo liso. Barra de escala representa 50 µm.

De igual manera, se realizó una comparación de la localización celular de todos los marcadores de autofagia en tejido pulmonar de sujetos con NH, utilizando cortes seriados y usando el mismo campo para la captura de imágenes. Además de la inmunohistoquímica para estos cortes seriados de NH, se realizaron adicionalmente tinciones de hematoxilina-eosina y

Masson. En **A**, el tejido fue teñido con hematoxilina y eosina; en **B**, se realizó la tinción de Tricrómica de Masson, para la identificación de fibras de la matriz extracelular en color azul turquesa. **C-G** inmunohistoquímica en el mismo campo, como referencia en la imagen de la misma zona/ región se usa un asterisco (*). Se identificó tinción positiva para LC3B en macrófagos y algunas células epiteliales bronquiales; en **D**, se identifica tinción positiva para p62/SQSTM1 en macrófagos, epitelio bronquial y algunos neutrófilos; en **E**, se identifica tinción positiva para ATG4B en macrófagos, algunas células epiteliales bronquiales y algunos neutrófilos; en **F**, se identifica tinción positiva para ATG5 en macrófagos, músculo liso, neutrófilos y algunas células epiteliales bronquiales; y en **G**, se identifica tinción positiva para ATG7 en macrófagos y músculo liso (**Figura 14**).

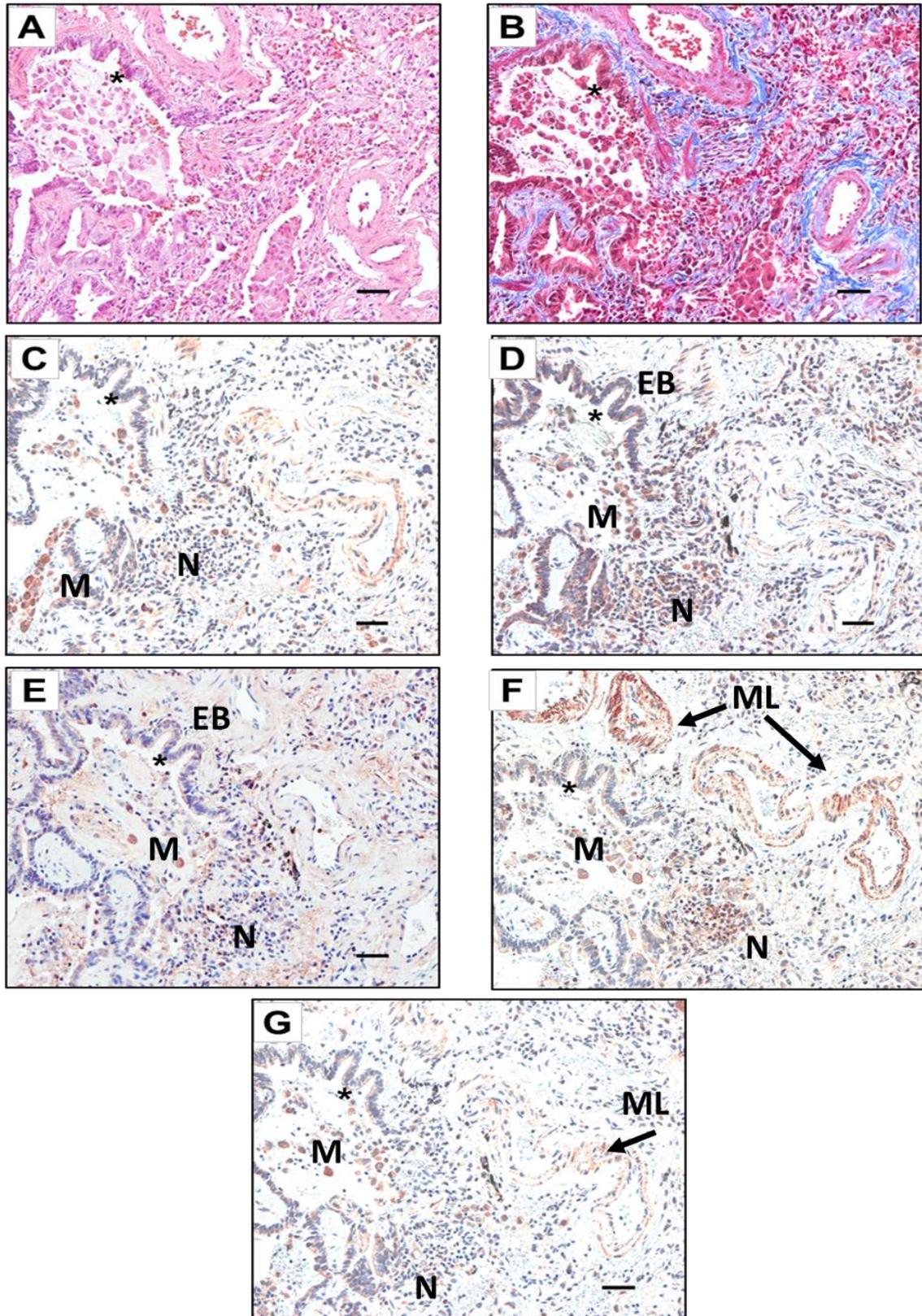


Figura 14. Microfotografía representativa de los distintos marcadores de autofagia identificados en el mismo campo en el pulmón de un paciente con NH. EB: Epitelio bronquial, M: macrófago, ML: músculo liso, N: neutrófilo. Barra de escala representa 50 μ m.

A manera de síntesis, se presenta la Tabla 2 en la que se engloba la intensidad de tinción observada en todos los ensayos de inmunohistoquímica de marcadores de autofagia en tejido de sujetos con NH comparada con el tejido de los sujetos control.

Tabla 2. Análisis semicuantitativo de hallazgos inmunohistoquímicos en cortes de tejido pulmonar de pacientes con NH vs sujetos control

	Control	NH	Control	NH	Control	NH	Control	NH	Control	NH	Control	NH
	Epitelio Bronquial		Epitelio Alveolar		Macrófagos		Linfocitos		Músculo Liso		Endotelio	
LC3B	-	++	-	++	+	+++	-	-	-	+	-	+
P62		+++	-	+++	+	+++	-	++	-	+	-	-
ATG4B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ATG5	-	-	-	-	-	+++	-	++	++	++++	++	++++
ATG7	-	+	-	+	-	++	-	-	+	+++	+	+++

Escala de intensidad en la tinción: Negativo (-) Débil (+), Moderado (++), Intenso (+++), Muy intenso (++++)

Abreviación: NH, Neumonitis por Hipersensibilidad.

La presencia de una tinción de débil a moderada de todos los marcadores de autofagia en el tejido de los sujetos control podría indicar que este proceso celular se encuentra activo de manera basal en condiciones homeostáticas y durante el daño pulmonar al epitelio y la inflamación, observamos un incremento en la intensidad de la señal positiva y en el número de células teñidas, además por western blot se observó un incremento significativo de la mayoría de los marcadores evaluados, lo que podría sugerir que la actividad autofágica está participando y además de que podría estar involucrada en la patogénesis de la NH, sin embargo es difícil sugerir que hay un incremento en el flujo de autofagia, ya que es un proceso dinámico y se requieren estudios complementarios para definir cuál es la posible implicación de la autofagia en el desarrollo de NH.

9. DISCUSIÓN

La vía autofágica es un proceso celular evolutivamente conservado en todos los eucariontes (Tanida I. et al., 2008; Wesselborg S. y Stork B., 2015). Se requiere un nivel basal de autofagia para la homeostasis de los tejidos, pero ésta puede ser activada o inducida en respuesta al estrés celular, al estrés oxidativo, a la hipoxia, al daño mitocondrial, o por la activación de las células inmunes y las infecciones ocasionadas por agentes patógenos (Maciel-Herrerías M. y Cabrera-Benítez S., 2016). En este trabajo, se evaluó la expresión de diferentes componentes esenciales de la vía autofágica, los cuales se encontraron incrementados en los tejidos provenientes de sujetos con NH en comparación con el pulmón de los sujetos control, sugiriendo que este proceso puede estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad; sin embargo, con este trabajo descriptivo, no podemos definir si se está activando autofagia, y además si esto tiene un efecto benéfico o deletéreo, sin embargo a continuación se discuten distintos escenarios en los que la autofagia podría estar implicada durante distintos procesos celulares (daño al epitelio, respuesta inmune, reconocimiento de patógenos).

En primera instancia, en los tejidos de los sujetos control se obtuvo una tinción débil para p62/SQSTM1 en células epiteliales bronquiales y el resto de los marcadores de autofagia no lograron ser detectados por inmunohistoquímica. Debido a que existe un nivel basal de autofagia en todos los tipos celulares, probablemente la tinción por inmunohistoquímica no es un método suficientemente sensible para detectar a los marcadores de autofagia en el epitelio pulmonar y otros tejidos bajo condiciones no patológicas.

En contraste, por inmunohistoquímica, en los tejidos de los sujetos con NH, se obtuvo una tinción positiva intensa para las proteínas LC3B, p62/SQSTM1 y ATG5, en células epiteliales bronquiales, alveolares y macrófagos; además, ATG5 presentó una tinción moderada en linfocitos y una tinción intensa en células de músculo liso y endotelio. Se obtuvo una tinción débil para ATG4B en epitelio bronquial, alveolar y macrófagos. Para la proteína ATG7 se obtuvo una tinción que va desde débil hasta intensa en células de epitelio bronquial, alveolar, macrófagos, y también observamos señal positiva en células de músculo liso y endotelio, respectivamente.

La detección de proteínas relacionadas con la autofagia por inmunohistoquímica ofrece un enfoque valioso para estudiar la autofagia *in situ*, sin embargo, para tener conclusiones

certeras es necesario combinar resultados, junto con otras metodologías como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y el western blot de lisados de tejidos.

En cuanto a la pregunta de *por qué si son marcadores de una misma vía, la distribución celular y subcelular es distinta*, actualmente se ha reportado que algunas de estas proteínas participan en mecanismos diferentes a la autofagia. En el caso de la proteína LC3, una tinción celular difusa representa la expresión de la proteína, pero no necesariamente la formación de autofagosomas. Es importante destacar que el patrón granular observado por inmunohistoquímica podría indicar tanto un incremento del flujo autofágico como la inhibición de la degradación de los autofagosomas por los lisosomas y, por lo tanto, podríamos apreciar la acumulación éstos en forma de gránulos en el citoplasma de los macrófagos (Rosenfeldt M.T. et al., 2012). Recientemente se ha descubierto que los componentes de la vía de autofagia podrían tener otras funciones que no son propiamente autofágicas y de degradación. LC3B, por ejemplo, puede ser incorporado durante una forma especializada de fagocitosis llamada LAP, fagocitosis asociada a LC3B, por sus siglas en inglés (Galluzzi L. y Green D. R., 2019; Heckmann B. L. y Green D. R., 2019). El proceso de LAP se distingue por la ausencia de la vesícula de doble membrana, el autofagosoma, y su dependencia de NOX2 y RUBCN, una proteína que recluta a PIK3C3 (Keller M.D. et al, 2020). El material que es fagocitado a través de LAP induce la expresión de citocinas y sirve como fuente de antígenos para presentarlos ante las células T. De manera general, se dice que mientras la macroautofagia se encarga de degradar el material citosólico, LAP puede ser más relevante al momento de degradar material extracelular (Galluzzi L. y Green D. R., 2019; Keller M.D. et al, 2020). Además, el proceso de LAP se encuentra asociado con la eliminación de células apoptóticas mediante macrófagos en un proceso llamado eferocitosis (Glick D. et al., 2010). La tinción granular de LC3 a veces se interpreta erróneamente como formación de autofagosoma, pero puede deberse a la incorporación de LC3 en lipofuscina u otros cuerpos residuales lisosomales (Klionsky D.J. 2016). Dado que en los ensayos de inmunohistoquímica de este trabajo se observaron macrófagos fuertemente teñidos para LC3B, es posible que la eliminación de células muertas ocurra de manera activa mediante LAP en los pulmones de sujetos con NH, sin embargo, se necesita implementar *estudios in vitro* o modelos animales *in vivo* para poner a prueba esta hipótesis.

Por otro lado, sería de esperarse que p62/SQSTM1 (que es una proteína adaptadora entre LC3B y el cargo a degradar) tuviera una distribución en el pulmón equivalente a la de LC3B.

Efectivamente encontramos que ambas proteínas se localizan en macrófagos, células epiteliales y neutrófilos, sin embargo, también encontramos que p62/SQSTM1 se expresa en linfocitos, mientras que no identificamos a LC3 en éstas células inflamatorias, además de que observamos tinción nuclear para p62/SQSTM1 en algunos tipos celulares como células epiteliales y macrófagos. La localización diferencial de LC3B, respecto a p62/SQSTM1 podría deberse a que p62/SQSTM1 también está involucrada en una variedad de vías celulares independientes de la autofagia. En consecuencia, se ha reportado que los niveles de expresión de p62/SQSTM1 están regulados por una serie de factores, como el factor derivado de la próstata Ets (PDEF), el oncogén Ras, p38 MAP cinasa y los factores de transcripción Nrf2 y TFEB. De acuerdo con estos hallazgos, la regulación positiva de p62/SQSTM1 se observa durante condiciones de estrés celular, incluida la inflamación y el estrés del RE, de manera independiente a la activación de la vía autofágica (Thompson H.G., 2003; Duran A., 2008).

El receptor p62 p62/SQSTM1 también controla la muerte celular programada independientemente de la degradación de la carga autofágica al reclutar RIPK1, un componente del complejo de necroptosis, p62 controla un cambio de apoptosis a necroptosis en un modelo de cáncer de próstata (Goodall et al., 2016). Debido a su capacidad de ser una proteína de andamiaje, p62 p62/SQSTM1 participa en varias cascadas de transducción de señales al reunir distintos componentes de la vía (Bitto et al., 2014), por ejemplo, facilita la señalización de TNF-R e IL-1 β R, activando la vía NF- κ B (Sanz et al., 1999; Wooten et al., 2005), permite la respuesta al estrés oxidativo al unirse a Keap1 que permite la liberación de Nrf2 para inducir la respuesta antioxidante (Ichimura et al., 2013) y estimula la apoptosis al actuar río abajo a través de la regulación de la caspasa-8 por parte del cullin-3 (Jin et al., 2009). En esta tesis se ha descrito por primera vez la localización nuclear de p62 p62/SQSTM1 en macrófagos y en células epiteliales bronquiales, tanto en individuos control como en pacientes con NH, sin embargo son necesarios otros experimentos que permitan determinar cuáles son los mecanismos que contribuyen a estos cambios en la distribución núcleo/citoplasma, y actualmente mi tutora, en conjunto con una estudiante de maestría están haciendo experimentos para poder bajo qué estímulos ocurre translocación nuclear de p62.

Por lo general, se ha considerado que p62/ SQSTM1 es una proteína citosólica y se ha prestado poca atención a las posibles funciones nucleares de esta proteína. Los compartimentos nuclear y citosólico en las células eucariotas en interfase están separados por dos capas de membrana de la envoltura nuclear. Debido al tamaño relativamente pequeño de

los poros nucleares (~50 nm) y la función similar a un tamiz del complejo del poro nuclear, que limita el diámetro funcional de la apertura a 9 nm, solo las moléculas pequeñas solubles en agua, como las sales o las proteínas pequeñas, pueden difundirse pasivamente a través de ellas. Las proteínas mayores de ~40 kDa tienen que ser transportadas activamente entre ambos compartimentos por los receptores de transporte nuclear-citosólico carioferinas. La importación nuclear generalmente está mediada por la unión de importina- α a una señal de localización nuclear (NLS) en la proteína de carga. La exportación nuclear se ve facilitada por la unión de exportin-1/CRM1 a una señal de exportación nuclear (NES) formada por un tramo de cuatro aminoácidos hidrofóbicos espaciados regularmente. Tanto las importinas como las exportinas interactúan con las proteínas del complejo del poro nuclear (nucleoporinas) para transferir sus proteínas de carga dentro y fuera del núcleo. En p62/SQSTM1 se han identificado NLS ubicadas en el amino terminal y el carboxilo terminal, y se ha sugerido que permiten el desplazamiento nuclear-citoplásmico de p62/SQSTM1. Teniendo en cuenta que el desplazamiento nuclear-citoplásmico de p62 está modulado por fosforilaciones cerca del NLS C-terminal de p62, los mecanismos dependientes de la fosforilación pueden estar relacionados con la translocación nuclear dependiente del estrés oxidativo (Noguchi T, 2018).

El estrés oxidativo promueve la formación y acumulación en el núcleo celular de agregados proteicos que contienen ubiquitina, denominados ALIS, por sus siglas en inglés. Los ALIS funcionan como compartimentos de almacenamiento de proteínas mal plegadas, que son generadas por condiciones de estrés celular, como la inanición, la infección por virus, el estrés del retículo endoplásmico, lipopolisacáridos o el estrés oxidativo (Noguchi T. et al., 2018). La inhibición de los sistemas de degradación celular ya sea el proteosoma o la autofagia, interfiere con la eliminación de los ALIS y promueve su acumulación en el núcleo. La proteína p62/SQSTM1 es un componente clave de en la formación de estos agregados proteicos al poseer Cisteínas sensibles a la oxidación (Cys105 y Cys113) las cuales pueden funcionar como un regulador potencial de la señalización redox al formar oligómeros mediados por enlaces disulfuro los cuales permiten la formación de estos agregados proteicos. Además, p62/SQSTM1 participa en la estabilización y activación de NRF2 (Factor nuclear derivado de eritroides 2, tipo 2, por sus siglas en inglés) un factor de transcripción que resulta clave para la homeostasis redox (Noguchi T. et al., 2018).

La proteína p62/SQSTM1 contiene dos señales de localización nuclear y una señal de exportación nuclear, localizada entre los aminoácidos 303 y 320. La importación nuclear de

p62/SQSTM1 está impulsada por la fosforilación; particularmente, la fosforilación de residuos de Treonina 269 y Serina 272, localizados muy cerca de la señal de localización nuclear 2, la cual promueve la actividad de importación nuclear (Pankiv S. et al., 2010). No obstante, se requieren más experimentos para confirmar el hallazgo de la localización nuclear de p62/SQSTM1 y determinar la causa de la translocación de p62/SQSTM1 hacia el núcleo en los macrófagos de sujetos con NH.

Por otro lado, la tinción por inmunohistoquímica para las proteínas ATG5 y ATG7 se observó mayoritariamente en células de músculo liso vascular y bronquial del tejido pulmonar de sujetos con NH. Existe evidencia de que la eliminación genética de Atg7 en las células de músculo liso vascular de ratón no induce la apoptosis celular, sino que desencadena una senescencia prematura inducida por el estrés. Además, las células de músculo liso vascular desarrollan hipertrofia celular y nuclear, presentan un mayor contenido de colágena, un potencial de migración aumentado y una expresión elevada de proteínas como TGF β y el factor 1 derivado de células del estroma (SDF1) (Glick D. et al., 2010). Por otro lado, se ha reportado que en aortas de ratones deficientes de ATG5 en células endoteliales, se promueve tanto la apoptosis como la senescencia celular. Además, se ha demostrado que la delección específica de ATG7 en las células de músculo liso vascular acelera el desarrollo de la placa aterosclerótica en ratones y promueve la formación de neointima después de una lesión, sugiriendo que la expresión de estas proteínas ATG es crítica para la integridad de las células vasculares (Glick D. et al., 2010; Grootaert M.O.J. et al., 2018). Por lo tanto, podríamos sugerir que la expresión de ATG5 y ATG7 en músculo liso y endotelio es constitutiva y podría regular la homeostasis específicamente en estos tipos celulares.

En cuanto al nivel proteico de cada marcador, se observó por Western blot, un incremento en extractos de tejido pulmonar de sujetos con NH en comparación con extractos de tejidos control, tanto de LC3B-I como de LC3B-II y de p62/SQSTM1. Respecto a ATG4B y ATG5, también se observó un incremento significativo; a diferencia de ATG7 el cual no presentó un incremento significativo.

Estos resultados sugieren que el aumento en la expresión de las proteínas de autofagia en el pulmón de sujetos con NH podría involucrar a este mecanismo en la patogénesis o es un mecanismo activado para mantener homeostasis celular en el pulmón (Keller M.D. et al., 2020; Li Z. Y. et al., 2017; Wang K. et al., 2019). Por ejemplo, se ha reportado que la autofagia juega un papel clave en la eliminación de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*,

Mycobacterium tuberculosis y *Klebsiella pneumoniae* mediante la formación de autofagosomas y su subsecuente degradación autolisosomal por macrófagos alveolares (Keller M.D. et al., 2020; Ye Y. et al., 2014; Yuan K. et al., 2012). Esta forma selectiva de autofagia donde el objetivo es eliminar patógenos después de la invasión celular del hospedero, se le conoce como xenofagia (Aman, Y. et al., 2021; Bauckman K. A. et al., 2015). Sin embargo, también hay evidencia que demuestra que la autofagia no sólo funciona como una línea de defensa del hospedero sino como un proceso dañino que puede estar involucrado en la patogénesis de enfermedades como COPD, asma y fibrosis quística (Li Z.Y. et al., 2017).

Dado que la NH es producto de la exposición continua a una amplia gama de antígenos tanto de origen orgánico como inorgánico los cuales pueden ser inhalados (como hongos, bacterias, proteínas de origen animal, protozoos, isocianato, anhídridos de ácido, entre otros) (Higashino-Kameda M. et al., 2016; Regal J. F. y Selgrade M. K., 2010; Selman M., 2004; Selman M. et al., 2012; Vasakova M. et al., 2017); es posible que la xenofagia se encuentre activa en los macrófagos alveolares e intersticiales de los sujetos con NH funcionando como un mecanismo de defensa y eliminación de partículas exógenas.

Utilizando ensayos de inmunohistoquímica se muestra que la diversidad de tipos de celulares teñidos en el pulmón de pacientes con NH es mayor a comparación con el pulmón de individuos control, en donde la tinción de casi todos los marcadores es débil. Sin embargo, es importante mencionar como parte de la discusión que este método tiene limitaciones importantes: por ejemplo, no pudimos colocalizar a los marcadores de autofagia con otros marcadores célula-específicos, por ejemplo, SPC para epitelio, F4/80 para macrófagos, etc., en el pulmón, ya que utilizamos tejidos embebidos en parafina. Será interesante en un futuro colocalizar a las diferentes proteínas de la maquinaria de autofagia utilizando anticuerpos conjugados con fluorocromos en tejidos congelados, debido a su capacidad de emitir luz en diferentes longitudes de onda únicas. En la práctica, hemos observado una mayor autofluorescencia en tejidos fijados en formaldehído y embebidos en parafina. Por otro lado, la visualización de marcadores fluorescentes en cortes de tejido se ve obstaculizada con frecuencia debido a la autofluorescencia del pulmón. La fluorescencia constitutiva presente en los tejidos se debe principalmente a flavinas endógenas, NADH, flavinas, lipofuscinas, colágeno, fibronectina y elastina. El grado de fluorescencia suele relacionarse con el tipo de tejido; sin embargo, los fijadores que se utilizan para la preservación de los detalles morfológicos de los tejidos pueden incrementar la fluorescencia de fondo (Constantinou P. et al., 2009; Niki H. et al., 2004; Viegas

M.S. et al., 2007). La formalina, por ejemplo, forma enlaces covalentes entre grupos que contienen aminos adyacentes a través de reacciones ácido-base. A consecuencia de esta interacción, se forman productos fluorescentes, dando como resultado un fondo fluorescente intenso (Viegas M.S. et al., 2007). Si bien el método de inmunofluorescencia ofrece un contraste claro y es altamente cuantificable; su eficacia puede disminuir especialmente para las secciones de pulmón, dado que uno de los componentes principales de la matriz extracelular pulmonar es la colágena y ésta produce una autofluorescencia primaria intensa (Bataille F. et al., 2006; Niki H. et al., 2004). Para evitar que la autofluorescencia fuera una variable que pudiera enmascarar la detección de las proteínas blanco de autofagia, no se utilizaron ensayos de inmunofluorescencia en el desarrollo de esta tesis. Por otro lado, para compensar la falta de colocalización de los marcadores de autofagia en el tejido pulmonar, se realizaron cortes seriados del tejido tanto de los sujetos control como de los sujetos con NH para localizar cada uno de los marcadores de autofagia en el mismo campo visual.

En nuestro estudio, la expresión de los distintos antígenos se visualizó mediante detección cromogénica, lo cual hace difícil la colocalización con cromógenos como diaminobencidina (DAB) y 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) que tiñen en color marrón y rojo. Otro problema que hemos encontrado con la colocalización cromogénica, es la detección de antígenos escasos vs abundantes en el mismo tejido, dado que los antígenos abundantes pueden conducir a una señal rápida e intensa que podría enmascarar una señal tenue de otro antígeno.

A pesar de que era de esperarse encontrar el mismo patrón de expresión de todos los marcadores de autofagia en los mismos tipos celulares, se encontró que algunas proteínas de la vía de autofagia se encuentran de manera más abundantemente en cierto tipo de células, probablemente debido a diferencias en las diferentes funciones autofágicas y no autofágicas que llevan a cabo dichas proteínas estudiadas en cada tipo celular. Por lo tanto, será necesario explorar a cada marcador de autofagia en modelos *in vivo* e *in vitro* que permitan controlar tiempos de exposición, tipo de antígeno, etc., y estudios de colocalización por inmunofluorescencia, para definir con precisión los tipos celulares.

Así mismo, cabe aclarar que este proyecto es descriptivo, y reconocemos que el número de muestras es limitado, pero por cuestiones de bioética, no podemos incluir a más pacientes en el mismo. Sin embargo, resulta relevante pues es el primer estudio que ha explorado los marcadores de autofagia en la patogénesis de la NH.

De los resultados obtenidos podremos realizar en un futuro otros experimentos en muestras más accesibles como, por ejemplo, sangre. Por otro lado, sería necesario complementar nuestra investigación con modelos *in vivo* e *in vitro* para determinar si existe una correlación con la expresión de estos marcadores de autofagia y la progresión hacia fibrosis que se presenta en la forma crónica de la NH.

10. CONCLUSIONES

En resumen, este trabajo describe por primera vez la localización celular y subcelular específica para las proteínas involucradas en la autofagia LC3B, p62/SQSTM1, ATG4B, ATG5 y ATG7 en pulmones de sujetos con NH comparados con los sujetos control.

- 1) En los pulmones de individuos control, observamos una tinción citoplásmica difusa tenue de LC3B solo en algunos macrófagos, mientras que otros tipos de células fueron negativos
- 2) Se observó una tinción positiva intensa para LC3B en macrófagos alveolares e intersticiales y en algunos neutrófilos en los pulmones de pacientes con NH.
- 3) Todos los macrófagos acumulados dentro de los espacios alveolares fueron positivos para LC3B y mostraron un patrón citoplasmático granular en los pulmones NH.
- 4) En los pulmones de individuos control, se observó una tinción baja de p62/SQSTM1 en algunos macrófagos y células epiteliales bronquiales.
- 5) En los pulmones de pacientes con NH, se observó una fuerte tinción p62/SQSTM1 positiva en macrófagos intersticiales y alveolares y también en neutrófilos.
- 6) El epitelio bronquial y alveolar mostró una tinción citoplasmática granular para p62/SQSTM1 en el pulmón de pacientes con NH.
- 7) Localizamos tinción nuclear positiva de p62/SQSTM1 en macrófagos alveolares en pulmones de pacientes con NH, mientras que la tinción nuclear en macrófagos de pulmones de control fue poco común.

- 8) Existe un aumento significativo del nivel de proteína LC3B y p62/SQSTM1 en extractos de tejido pulmonar de pacientes con NH en comparación con los tejidos de individuos control, lo que confirma los hallazgos obtenidos por inmunohistoquímica.
- 9) Los pulmones de individuos control exhibieron un bajo nivel de tinción de ATG4B en macrófagos, mientras que otros tipos de células fueron negativos.
- 10) En el pulmón de pacientes con NH, ATG4B se identificó principalmente en macrófagos alveolares y en células epiteliales bronquiales y alveolares que recubren áreas de fibrosis.
- 11) La expresión de ATG5 se encontró principalmente en las células del músculo liso bronquial y vascular en los pulmones de individuos control.
- 12) En el pulmón de pacientes con NH, ATG5 además se observó en células endoteliales, macrófagos y algunos neutrófilos en áreas de alveolitis.
- 13) Los pulmones de individuos control exhibieron un bajo nivel de tinción para ATG7 en algunos macrófagos y otros tipos de células fueron negativos.
- 14) Se observó una fuerte señal positiva de LC3B, p62/ SQSTM1, ATG4B y ATG7 en macrófagos y células epiteliales bronquiales en los pulmones de NH.
- 15) Hay un aumento significativo de ATG4B y ATG5 en los pulmones de NH en comparación con los tejidos de los individuos control.
- 16) No se encontraron diferencias significativas en el nivel de ATG7 por Western blot.

Adicionalmente, se encontró un aumento en la expresión a nivel proteico de LC3B, p62/SQSTM1, ATG4B y ATG5 comparado con los sujetos control, indicando que la autofagia podría tener un papel importante durante la patogénesis de la NH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aman, Y.**, Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, R. I., Simon, A. K., Bjedov, I., Palikaras, K., Simonsen, A., Johansen, T., Tavernarakis, N., Rubinsztein, D. C., Partridge, L., Kroemer, G., Labbadia, J., & Fang, E. F. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. *Nature Aging*, 1(8), 634–650. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00098-4>
2. **Antoniou KM**, Margaritopoulos GA, Tomassetti S, Bonella F, Costabel U, Poletti V. Interstitial lung disease. *European Respiratory Review*. 2014; 23(131):40-54. doi: 10.1183/09059180.00009113.
3. **Anwar, J.**, Kong, W.T. & Balakrishnan, B. Updates in Hypersensitivity Pneumonitis: A Narrative Review. *Curr Pulmonol Rep* 11, 106–115 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13665-022-00294-6>
4. **Araya J**, Kojima J, Takasaka N, Ito S, Fujii S, Hara H, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(1): L56-69. doi: 10.1152/ajplung.00213.2012.
5. **Aung, H. H.**, Sivakumar, A., Gholami, S. K., Venkateswaran, S. P., Gorain, B., & Shadab. (2019). Chapter 1 - An Overview of the Anatomy and Physiology of the Lung (P. B. T.-N.-B. T. D. D. S. for L. C. Kesharwani (ed.); pp. 1–20). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815720-6.00001-0>
6. **Barber, C. M.**, Wiggans, R. E., Carder, M., & Agius, R. (2017). Epidemiology of occupational hypersensitivity pneumonitis; reports from the SWORD scheme in the UK from 1996 to 2015. *Occupational and Environmental Medicine*, 74(7), 528 LP – 530. <https://doi.org/10.1136/oemed-2016-103838>
7. **Barth S**, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *The Journal of pathology*. 2010; 221(2):117-24. doi: 10.1002/path.2694.
8. **Basil, M. C.**, Katzen, J., Engler, A. E., Guo, M., Herriges, M. J., Kathiriya, J. J., Windmueller, R., Ysasi, A. B., Zacharias, W. J., Chapman, H. A., Kotton, D. N., Rock, J. R., Snoeck, H. W., Vunjak-Novakovic, G., Whitsett, J. A., & Morrissey, E. E. (2020). The

Cellular and Physiological Basis for Lung Repair and Regeneration: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*, 26(4), 482–502. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2020.03.009>

9. **Bataille F**, Troppmann S, Klebl F, Rogler G, Stoelcker B, Hofstadter F, et al. Multiparameter immunofluorescence on paraffin-embedded tissue sections. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM*. 2006;14(2):225-8. doi: 10.1097/01.pai.0000162009.31931.10.
10. **Bauckman KA**, Owusu-Boaitey N, Mysorekar IU. Selective autophagy: xenophagy. *Methods*. 2015; 75:120-7. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.12.005.
11. **Bitto A.**, Lerner, C. A., Nacarelli, T., Crowe, E., Torres, C., & Sell, C. (2014). P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 36(3), 9626. doi: 10.1007/s11357-014-9626-3
12. **Brauer, M.**, Avila-Casado, C., Fortoul, T. I., Vedal, S., Stevens, B., & Churg, A. (2001). Air pollution and retained particles in the lung. *Environmental Health Perspectives*, 109(10), 1039–1043. <https://doi.org/10.1289/EHP.011091039>
13. **Buchan, J. R.**, Kolaitis, R.-M., Taylor, J. P., & Parker, R. (2013). Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. *Cell*, 153(7), 1461–1474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.037>
14. **Burgstaller G**, Oehrle B, Gerckens M, White ES, Schiller HB, Eickelberg O. The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *European Respiratory Journal*. 2017;50(1):1601805. doi: 10.1183/13993003.01805-2016.
15. **Cardona-Villa R.**, Yepes-Núñez J., Salgado-Vélez H., Julio-Montoya C. Aspectos básicos de las reacciones de hipersensibilidad y la alergia en Alergia. Abordaje clínico, diagnóstico y tratamiento, 2010. Editorial Médica Panamericana
16. **Chan AC**, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2010; 10(5):301-16. doi: 10.1038/nri2761.
17. **Choo SY**. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*. 2007; 48(1):11-23. doi: 10.3349/ymj.2007.48.1.11.

18. **Churg A**, Bilawich A, Wright JL. Pathology of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis What Is It? What Are the Diagnostic Criteria? Why Do We Care? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2018; 142(1):109-19. doi: 10.5858/arpa.2017-0173-RA.
19. **Constantinou P**, Dacosta RS, Wilson BC. Extending immunofluorescence detection limits in whole paraffin-embedded formalin fixed tissues using hyperspectral confocal fluorescence imaging. *J Microsc.* 2009;234(2):137-46. doi: 10.1111/j.1365-2818.2009.03155. x.
20. **Curtis JL**, Sonstein J, Craig RA, Todt JC, Knibbs RN, Polak T, et al. Subset-Specific Reductions in Lung Lymphocyte Accumulation Following Intratracheal Antigen Challenge in Endothelial Selectin-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*. 2002; 169(5):2570-9. doi: 10.4049/jimmunol.169.5.2570.
21. **Dabiri, M.**, Jehangir, M., Khoshpouri, P., & Chalian, H. (2022). Hypersensitivity Pneumonitis: A Pictorial Review Based on the New ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline for Radiologists and Pulmonologists. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(11), 2874. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12112874>
22. **Delgado, M. A.**, Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., & Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *The EMBO journal*, 27(7), 1110–1121. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.31>
23. **Dikic, I.**, & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
24. **Duran, A.**, Linares, J. F., Galvez, A. S., Wikenheiser, K., Flores, J. M., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2008). The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell*, 13(4), 343–354. doi: 10.1016/j.ccr.2008.02.001
25. **Falfan-Valencia R**, Camarena A, Pineda CL, Montano M, Juarez A, Buendia-Roldan I, et al. Genetic susceptibility to multicase hypersensitivity pneumonitis is associated with the TNF-238 GG genotype of the promoter region and HLA-DRB1*04 bearing HLA haplotypes. *Respiratory medicine*. 2014; 108(1):211-7. doi: 10.1016/j.rmed.2013.11.004.

26. **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; 130(1):125-36. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03219. x.
27. **Galluzzi L**, Green DR. Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery. *Cell*. 2019; 177(7):1682-99. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.026.
28. **Galluzzi, L.**, Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E.-L., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., ... Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/embj.201796697>
29. **García de Alba C**, Buendía-Roldan I, Salgado A, Becerril C, Ramírez R, González Y, et al. Fibrocytes contribute to inflammation and fibrosis in chronic hypersensitivity pneumonitis through paracrine effects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191(4):427-36. doi: 10.1164/rccm.201407-1334OC.
30. **Garrote, A.**, & Bonet, R. (2004). Alergias y antialérgicos. Causas, tipos y tratamiento. *Offarm*, 23(3), 82–92. <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-alergias-antialergicos-causas-tipos-tratamiento-13059410>
31. **Gartner, L. P.**, Hiatt, J. L., & Strum, J. M. (2011). Chapter 15. Respiratory system; pp. 228-240 in *Cell biology and histology*. In Board review series.
32. **Glick D**, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*. 2010; 221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697.
33. **Goodall, M. L.**, Fitzwalter, B. E., Zahedi, S., Wu, M., Rodriguez, D., Mulcahy-Levy, J. M., Green, D. R., Morgan, M., Cramer, S. D., & Thorburn, A. (2016). The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Developmental cell*, 37(4), 337–349. doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.018
34. **Grippi, M.A.**, Jay A. Fishman, Jack A. Elias, Robert M. Kotloff, Allan I. Pack, R. M. S. (5th Ed.). (2015). *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. McGraw Hill Education.

35. **Grootaert MOJ**, Roth L, Schrijvers DM, De Meyer GRY, Martinet W. Defective Autophagy in Atherosclerosis: To Die or to Senesce? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; 2018:7687083. doi: 10.1155/2018/7687083.
36. **Grunes D**, Beasley MB. Hypersensitivity pneumonitis: a review and update of histologic findings. *Journal of clinical pathology*. 2013; 66(10):888-95. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201337.
37. **Heckmann BL**, Green DR. LC3-associated phagocytosis at a glance. *Journal of cell science*. 2019;132(5). doi: 10.1242/jcs.222984.
38. **Higashino-Kameda M**, Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Anzawa K, Mochizuki T, et al. A critical role of Dectin-1 in hypersensitivity pneumonitis. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2016; 65(3):235-44. doi: 10.1007/s00011-015-0910-1.
39. **Holsapple MP**, Jones D, Kawabata TT, Kimber I, Sarlo K, Selgrade MK, et al. Assessing the potential to induce respiratory hypersensitivity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2006; 91(1):4-13. doi: 10.1093/toxsci/kfj074.
40. **Ismail T**, McSharry C, Boyd G. Extrinsic allergic alveolitis. *Respirology*. 2006; 11(3):262-8. doi: 10.1111/j.1440-1843.2006.00839. x.
41. **Kalchier-Dekel O**, Galvin JR, Burke AP, Atamas SP, Todd NW. Interstitial Lung Disease and Pulmonary Fibrosis: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History. *Journal of clinical medicine*. 2018; 7(12):476. doi: 10.3390/jcm7120476.
42. **Katsuragi Y**, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *The FEBS journal*. 2015;282(24):4672-8. doi: 10.1111/febs.13540.
43. **Keller MD**, Torres VJ, Cadwell K. Autophagy and microbial pathogenesis. *Cell Death & Differentiation*. 2020;27(3):872-86. doi: 10.1038/s41418-019-0481-8.

44. **Klionsky DJ**, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.
45. **Klionsky, DJ**, Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cadwell, K., Cecconi, F., Choi, A. M. K., Choi, M. E., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Deretic, V., Dikic, I., Elazar, Z., Eskelinen, E.-L., ... Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal*, 40(19), e108863. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/emboj.2021108863>
46. **Kolb M**, Vasakova M. The natural history of progressive fibrosing interstitial lung diseases. *Respiratory Research*. 2019; 20(1):57. doi: 10.1186/s12931-019-1022-1.
47. **Koukourakis MI**, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois CE, Sivridis E, Pouliliou S, et al. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PloS one*. 2015;10(9): e0137675-e. doi: 10.1371/journal.pone.0137675.
48. **Lacasse Y**, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Orphanet journal of rare diseases*. 2006; 1:25. doi: 10.1186/1750-1172-1-25.
49. **Leone, P. M.**, & Richeldi, L. (2020). Current Diagnosis and Management of Hypersensitivity Pneumonitis. *Tuberculosis and respiratory diseases*, 83(2), 122–131. <https://doi.org/10.4046/trd.2020.0012>
50. **Li ZY**, Wu YF, Xu XC, Zhou JS, Wang Y, Shen HH, Chen ZH. Autophagy as a double-edged sword in pulmonary epithelial injury: a review and perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(2): L207–17
51. **Liao S-x**, Sun P-p, Gu Y-h, Rao X-m, Zhang L-y, Ou-Yang Y. Autophagy and pulmonary disease. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2019; 13:1753466619890538. doi: 10.1177/1753466619890538.

52. **Luo M**, Zhao X, Song Y, Cheng H, Zhou R. Nuclear autophagy: An evolutionarily conserved mechanism of nuclear degradation in the cytoplasm. *Autophagy*. 2016;12(11):1973-83. doi: 10.1080/15548627.2016.1217381.
53. **Luzina IG**, Todd NW, Iacono AT, Atamas SP. Roles of T lymphocytes in pulmonary fibrosis. *Journal of leukocyte biology*. 2008; 83(2):237-44. doi: 10.1189/jlb.0707504.
54. **Maciel-Herrerías M**, Cabrera-Benítez S. El papel de la autofagia en enfermedades pulmonares. *Neumología y cirugía de tórax*. 2016; 75:227-36.
55. **Margaritopoulos GA**, Lasithiotaki I, Antoniou KM. Toll-like receptors and autophagy in interstitial lung diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2017; 808:28-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.09.032>.
56. **Miller R**, Allen TC, Barrios RJ, Beasley MB, Burke L, Cagle PT, et al. Hypersensitivity Pneumonitis A Perspective from Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med*. 2018; 142(1):120-6. doi: 10.5858/arpa.2017-0138-SA.
57. **Mills, S. E.** (2012). *Histology for Pathologists: Fourth Edition*. In *Histology for Pathologists: Fourth Edition*.
58. **Mitaka K**, Miyazaki Y, Yasui M, Furuie M, Miyake S, Inase N, et al. Th2-biased immune responses are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *International archives of allergy and immunology*. 2011; 154(3):264-74. doi: 10.1159/000321114.
59. **Mizumura K**, Cloonan S, Choi ME, Hashimoto S, Nakahira K, Ryter SW, et al. Autophagy: Friend or Foe in Lung Disease? *Ann Am Thorac Soc*. 2016; 13 Suppl 1(Suppl 1): S40-S7. doi: 10.1513/AnnalsATS.201507-450MG.
60. **Murphy K**, Weaver C. *Allergy and Allergic Diseases in Janeway's Immunobiology 9th edition*. 2016. CRC Press.
61. **Newton CA**, Molyneaux PL, Oldham JM. Clinical Genetics in Interstitial Lung Disease. *Frontiers in Medicine*. 2018; 5(116). doi: 10.3389/fmed.2018.00116.

62. **Niki H**, Hosokawa S, Nagaike K, Tagawa T. A new immunofluorostaining method using red fluorescence of PerCP on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Immunol Methods*. 2004;293(1-2):143-51. doi: 10.1016/j.jim.2004.07.009.
63. **Noguchi T**, Suzuki M, Mutoh N, Hirata Y, Tsuchida M, Miyagawa S, et al. Nuclear-accumulated SQSTM1/p62-based ALIS act as microdomains sensing cellular stresses and triggering oxidative stress-induced parthanatos. *Cell Death & Disease*. 2018;9(12):1193. doi: 10.1038/s41419-018-1245-y.
64. **Nogueira, R.**, Melo, N., Novais e Bastos, H., Martins, N., Delgado, L., Morais, A., & C. Mota, P. (2019). Hypersensitivity pneumonitis: Antigen diversity and disease implications. *Pulmonology*, 25(2), 97–108. doi: 10.1016/J.PULMOE.2018.07.003
65. **Pabst R**, Tschernig T. Lymphocytes in the lung: an often-neglected cell. *Anatomy and Embryology*. 1995; 192(4):293-9. doi: 10.1007/BF00710098.
66. **Pankiv S**, Lamark T, Bruun J-A, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(8):5941-53. doi: 10.1074/jbc.M109.039925.
67. **Parzych, K. R.**, & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
68. **Patel AS**, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS one*. 2012; 7(7): e41394-e. doi: 10.1371/journal.pone.0041394.
69. **Petnak, T.**, & Moua, T. (2020). Exposure assessment in hypersensitivity pneumonitis: a comprehensive review and proposed screening questionnaire. *ERJ Open Research*, 6(3), 230–2020. <https://doi.org/10.1183/23120541.00230-2020>
70. **Racanelli AC**, Kikers SA, Choi AMK, Cloonan SM. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. *Autophagy*. 2018; 14(2):221-32. doi: 10.1080/15548627.2017.1389823.

71. **Raghu, G.**, Remy-Jardin, M., Ryerson, C. J., Myers, J. L., Kreuter, M., Vasakova, M., Bargagli, E., Chung, J. H., Collins, B. F., Bendstrup, E., Chami, H. A., Chua, A. T., Corte, T. J., Dalphin, J. C., Danoff, S. K., Diaz-Mendoza, J., Duggal, A., Egashira, R., Ewing, T., Gulati, M., ... Wilson, K. C. (2020). Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 202(3), e36–e69. <https://doi.org/10.1164/rccm.202005-2032ST>
72. **Regal, J. F.**, & Selgrade, M. K. Hypersensitivity Reactions in the Respiratory Tract. en *Immune System Toxicology Vol. 5* Elsevier Inc. 2010. doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.00622-9
73. **Robertson D**, Savage K, Reis-Filho JS, Isacke CM. Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol.* 2008; 9:13-. doi: 10.1186/1471-2121-9-13.
74. **Rosenfeldt MT**, Nixon C, Liu E, Mah LY, Ryan KM. Analysis of macroautophagy by immunohistochemistry. *Autophagy.* 2012;8(6):963-9. doi: 10.4161/auto.20186.
75. **Ross, M. H.**, & Pawlina, W. (2010). *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology* (6th ed.). Philadelphia: Lip pincott Williams & Wilkins.
76. **Sanz, L.**, Sanchez, P., Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *The EMBO journal*, 18(11), 3044–3053. doi: 10.1093/emboj/18.11.3044
77. **Selman M**, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, et al. (2006) Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*; 173(2):188-98. doi: 10.1164/rccm.200504-644OC.
78. **Selman M**, Pardo A, King TE, Jr. (2012) Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *Am J Respir Crit Care Med.*; 186(4):314-24. doi: 10.1164/rccm.201203-0513CI.

79. **Selman M.** (2004) Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clinics in Chest Medicine*. Sep; 25(3):531-47, vi. DOI: 10.1016/j.ccm.2004.04.001.
80. **Tanida I**, Ueno T, Kominami E. (2008) LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ); 445:77-88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
81. **Tanida I**, Yamasaki M, Komatsu M, Ueno T. (2012) The FAP motif within human ATG7, an autophagy-related E1-like enzyme, is essential for the E2-substrate reaction of LC3 lipidation. *Autophagy*. 8(1):88-97. doi: 10.4161/auto.8.1.18339.
82. **Thompson, H. G.**, Harris, J. W., Wold, B. J., Lin, F., & Brody, J. P. (2003). p62 overexpression in breast tumors and regulation by prostate derived Ets factor in breast cancer cells. *Oncogene*, 22(15), 2322–2333. doi: 10.1038/sj.onc.1206325
83. **Vasakova M**, Morell F, Walsh S, Leslie K, Raghu G. (2017) Hypersensitivity Pneumonitis: Perspectives in Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*; 196(6):680-9. doi: 10.1164/rccm.201611-2201PP.
84. **Vasakova M**, Selman M, Morell F, Sterclova M, Molina-Molina M, Raghu G. (2019) Hypersensitivity Pneumonitis: Current Concepts of Pathogenesis and Potential Targets for Treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 200(3):301-8. doi: 10.1164/rccm.201903-0541PP
85. **Viegas MS**, Martins TC, Seco F, do Carmo A. An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *European journal of histochemistry: EJH*. 2007;51(1):59-66.
86. **Wallace WAH**, Fitch PM, Simpson AJ, Howie SEM. Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point. *Int J Exp Pathol*. 2007; 88(2):103-10. doi: 10.1111/j.1365-2613.2006.00515. x.
87. **Wang J**, Yoon TW, Read R, Yi A-K, Williams RW, Fitzpatrick EA. Genetic variability of T cell responses in hypersensitivity pneumonitis identified using the BXD genetic reference panel. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2020; 318(4): L631-L43. doi: 10.1152/ajplung.00120.2019.

88. **Wang K**, Chen Y, Zhang P, Lin P, Xie N, Wu M. Protective Features of Autophagy in Pulmonary Infection and Inflammatory Diseases. *Cells*. 2019;8(2):123.
89. **Wang L.J**, Cai H-R, Xiao Y-L, Wang Y, Cao M-S. Clinical characteristics and outcomes of hypersensitivity pneumonitis: a population-based study in China. *Chin Med J (Engl)*. 2019; 132(11):1283-92. doi: 10.1097/CM9.0000000000000256.
90. **Wesselborg S**, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(24):4721-57. doi: 10.1007/s00018-015-2034-8.
91. **Ye Y**, Li X, Wang W, Ouedraogo KC, Li Y, Gan C, et al. Atg7 deficiency impairs host defense against *Klebsiella pneumoniae* by impacting bacterial clearance, survival and inflammatory responses in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2014;307(5): L355-L63. doi: 10.1152/ajplung.00046.2014.
92. **Young B**, O'Dowd G, Woodford P (2013). Chapter 12 – Respiratory system; pp. 224-238 in Wheater's Functional Histology 6th Edition. In Postgraduate Medical Journal.
93. **Yu, L.**, Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14(2), 207–215. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>
94. **Yuan K**, Huang C, Fox J, Latus D, Carlson E, Zhang B, et al. Autophagy plays an essential role in the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 2):507-15. doi: 10.1242/jcs.094573.
95. **Zelikoff JT**, Cohen MD. 5.09 - Pulmonary Immunology*. en McQueen CA, editor. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier; 2010. p. 191-202.
96. **Zhangyuan Y**, Clarence Pascual and Daniel J. Klionsky. Autophagy: machinery and regulation. *Microbial Cell* 2016: 3(12): 588-596. doi: 10.15698/mic2016.12.546