



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

**Evaluación de la función de la proteína p62/SQSTM1 en células epiteliales de pulmón
en respuesta al estrés citotóxico**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Pamela Esperanza Gutiérrez Chávez

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. María Sandra Cabrera Benítez
Laboratorio de Biopatología Pulmonar, Facultad de Ciencias, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky
Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM
Dra. Gisela Ceballos Cancino
Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, INMEGEN

Ciudad de Universitaria, CDMX

Marzo, 2024



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

**Evaluación de la función de la proteína p62/SQSTM1 en células epiteliales de pulmón
en respuesta al estrés citotóxico**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Pamela Esperanza Gutiérrez Chávez

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. María Sandra Cabrera Benítez
Laboratorio de Biopatología Pulmonar, Facultad de Ciencias, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky
Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias, UNAM
Dra. Gisela Ceballos Cancino
Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, INMEGEN

Ciudad de Universitaria, CDMX

Marzo, 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
OFICIO: CGEP/CPCB/FC/0077/2024

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **16 de octubre de 2023** 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 **GUTIÉRREZ CHÁVEZ PAMELA ESPERANZA** con número de cuenta **314101387** con la tesis titulada **“Evaluación de la función de la proteína p62/SQSTM1 en células epiteliales de pulmón en respuesta al estrés citotóxico”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENITEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. ANNIE PARDO CEMO**
Vocal: **DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA**
Vocal: **DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ**
Vocal: **DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS**
Secretario: **DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY**

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 19 de enero de 2024

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/AAC/GEMF/EARR/ipp



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de un posgrado de excelencia y permitirme alcanzar uno de los objetivos de mi formación académica.

Agradezco el apoyo económico recibido por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-DGAPA UNAM, proyecto **PAPIIT-IN224323** *Evaluación del papel de la autofagia en un modelo de neumonitis por hipersensibilidad desarrollado en ratón*, del cual es responsable mi Tutora, Dra. Sandra Cabrera Benítez, que ha permitido el desarrollo de los experimentos realizados en este proyecto de investigación. Así como al apoyo económico del CONAHCYT recibido por parte del Programa Nacional de Becas para poder realizar mis estudios de posgrado y obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas CVU 1147975.

Agradezco a mi Tutora Principal, la Dra. Sandra Cabrera Benítez, y a las Dras. Claudia Andrea Segal Kischinevzky y Gisela Ceballos Cancino, integrantes de mi comité tutorial, por su orientación en el desarrollo de esta tesis de maestría.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A un lado de cada logro, está el apoyo de las personas que me quieren y me han ayudado en este camino.

Gracias, Isalia, sin tu valentía, yo no estaría aquí.

Gracias, a la familia que elegí, gracias, Ger, hemos crecido mucho juntos y me has acompañado en cada momento, por más grande o pequeño.

Gracias, Eduardo y Karla, su cariño y honestidad me mantienen en los momentos difíciles.

Gracias, Lupita y Marina, de ustedes aprendí los frutos del trabajo duro.

Gracias, Sandra Cabrera, por darme la oportunidad de trabajar en tu laboratorio, por la confianza y la paciencia.

Gracias, Ángeles García, por la paciencia al enseñarme todas las técnicas de laboratorio que conoces y por inspirarme con tu ética profesional.

Gracias, Andrea, por el apoyo dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco al Laboratorio de Biopatología Pulmonar y Enfermedades Fibrosantes Ciencias- INER, Facultad de Ciencias, UNAM, en donde se desarrolló la parte experimental de esta tesis.

Agradezco a la Dra. Iliana Herrera Fuentes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, por su colaboración en la ejecución de los experimentos con células epiteliales. Agradezco a LANSBIODYT-UNICUA-UNAM (CONAHCYT) y al Dr. Edgar Jiménez-Díaz por el apoyo técnico.

He meant that I was searching for answers, for things that were not yet known. He meant I was searching for truth, or as much of it as one human can find in a lifetime. He was saying that for me, the search itself was the point. He wasn't wrong. In basic research, which is what I have spent most of my life doing, you are, by definition, doing something that's never been done before. There's no model to follow. This means that most of the time you don't know what exactly you are searching for or how you're going to find it, or even whether you will find it, or how it may someday be applied. Still, you search.

-Karikó K. Breaking through: My life in science. Crown; 2023. pp. 104-105.

ÍNDICE

RESUMEN_____	1
ABSTRACT _____	3
INTRODUCCIÓN _____	5
1. Función y arquitectura pulmonar_____	5
1.1 Epitelio pulmonar_____	6
1.2 El papel del epitelio pulmonar en la respuesta inmune innata_____	9
1.3 Estrés citotóxico y daño al epitelio pulmonar_____	11
1.3.1 Antígenos orgánicos_____	11
1.3.2 Antígenos inorgánicos_____	12
2. Daño epitelial y el desarrollo de las Enfermedades Pulmonares Intersticiales	
Difusas (EPID) _____	13
2.1 Daño epitelial por exposición a antígenos y Neumonitis por Hipersensibilidad____	15
2.1.1 Histología de la NH_____	16
2.2 Daño epitelial de causa desconocida y el desarrollo de Fibrosis Pulmonar	
Idiopática (FPI) _____	19
3. Alteraciones en los sistemas de degradación celular en el epitelio pulmonar y su	
papel en la patogénesis de las enfermedades fibrosantes_____	20
3.1 Sistema ubiquitina proteosoma_____	21
3.2 Autofagia_____	22
3.2.1 Etapas de la autofagia_____	23
3.2.1.1 Inicio o nucleación_____	23
3.2.1.2 Elongación y maduración del autofagosoma_____	23
3.2.1.3 Fusión con el lisosoma y formación del autolisosoma_____	24
3.2.1.4 Degradación del cargo y reciclaje de productos degradados_____	24
4. La proteína p62 y su papel en las vías de degradación celular_____	25
ANTECEDENTES_____	29
1. p62 y los efectos asociados a su localización nuclear_____	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA_____	34
HIPÓTESIS_____	34

OBJETIVO GENERAL_____	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS_____	35
MATERIALES Y MÉTODOS_____	36
RESULTADOS_____	43
DISCUSIÓN_____	80
CONCLUSIONES _____	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS_____	88

RESUMEN

La proteína adaptadora p62, también conocida como sequestosoma 1 (SQSTM1), tiene un papel fundamental en los procesos de degradación celular como son la autofagia y el sistema ubiquitina proteosoma, gracias a su capacidad de reconocer a diversos sustratos a degradar a través del reconocimiento de marcas de ubiquitina. Debido a su estructura multidominio, participa en una gran cantidad de vías celulares, esto de manera independiente a la vía de autofagia o del proteosoma. Aunque se encuentra principalmente en el citoplasma celular, se ha descrito que se puede translocar al núcleo a través de sus dominios con secuencia de localización y exportación nuclear. Estudios previos reportaron a p62 tanto en el citoplasma como en el núcleo en macrófagos y células epiteliales de pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, sin embargo, no se cuantificó si existía un incremento en la proporción de p62 nuclear en comparación con el pulmón control o sano. En este trabajo se evaluó la localización de p62 en tejidos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y neumonitis por hipersensibilidad (NH). Se encontró que los pacientes con FPI y NH presentan una mayor cantidad de células epiteliales con localización nuclear de p62 y esta diferencia es significativa con respecto al control. Algunas células que presentan localización nuclear de p62 en el pulmón de pacientes con fibrosis fueron también positivas para SPC, lo que sugiere que son neumocitos tipo II. De manera similar a los resultados en humano, también se encontraron diferencias significativas en el número de células epiteliales con localización nuclear de p62 en el epitelio bronquial de ratones del modelo de fibrosis inducida por bleomicina con respecto al modelo de NH y al grupo control. Adicionalmente, se realizaron experimentos *in vitro* para evaluar la localización subcelular de p62 en células epiteliales de pulmón en respuesta al estrés citotóxico provocado por peróxido de hidrógeno, bleomicina, o irradiación con luz ultravioleta (UV). Las células de epitelio bronquial HBEC solo fueron estimuladas con bleomicina y no se identificó translocación de p62. En las células de epitelio alveolar A459 tratadas con bleomicina y peróxido de hidrógeno se observó translocación nuclear en escasas células, que además presentaron un soma reducido y refringencia de la membrana plasmática, sugiriendo que eran células apoptóticas. Las células A549 irradiadas no mostraron cambios en la translocación de p62, ni señales morfológicas de apoptosis. Finalmente, las células de pulmón de ratón MLE12 resultaron más sensibles al tratamiento con bleomicina y peróxido de hidrógeno que las células A549 y se observó

translocación nuclear de p62 en aquellas células con características de apoptosis. Las células MLE12 irradiadas con luz UV después de 6, 12 y 30 minutos más 1 h de recuperación, mostraron translocación de p62, colocalización con la marca de daño al DNA γ H2AX, y también mostraron características morfológicas de apoptosis, en comparación con las células control. El tratamiento de células MLE12 con estaurosporina, un inductor de la vía intrínseca de la apoptosis, no promovió la translocación nuclear de p62. Estos datos en su conjunto indican que la translocación de p62 es inducida en respuesta al daño al DNA, y no con otros inductores que promueven la apoptosis. Sin embargo, aún falta definir qué podría estar induciendo la translocación de p62 en células epiteliales en el pulmón de los pacientes con NH y FPI. También será importante en un futuro verificar que las células con p62 son apoptóticas, colocalizando con caspasa 3 o con ensayo de TUNEL.

ABSTRACT

The adaptor protein p62, also known as sequestosome 1 (SQSTM1), plays a fundamental role in cellular degradation processes such as autophagy and the ubiquitin-proteasome system, thanks to its ability to recognize various substrates to be degraded through the recognition of ubiquitin tags. Due to its multidomain structure, it participates in many cellular pathways independently of the autophagy or proteasome pathway. Although it is mainly found in the cell cytoplasm, it has been described that it can translocate to the nucleus through its nuclear localization and export signals. Previous studies reported p62 in both the cytoplasm and nucleus in macrophages and epithelial cells from patients with hypersensitivity pneumonitis (HP); however, in that study, it was not evaluated if there was an increase in the proportion of nuclear p62 in cells from HP compared healthy control lungs. In this work, the localization of p62 was evaluated in tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and hypersensitivity pneumonitis (HP). It was found that patients with IPF and NH showed a greater number of epithelial cells with nuclear p62 localization when compared to control lung and these differences were significant. Some cells showing nuclear p62 localization were also positive for SPC, suggesting they are type II pneumocytes. Like the results in humans, significant differences were also found in the number of epithelial cells with nuclear localization of p62 in the bronchial epithelium of mice in the bleomycin-induced fibrosis model compared to the NH model and the control group.

Furthermore, *in vitro* experiments were performed to evaluate the subcellular localization of p62 in lung epithelial cells in response to cytotoxic stress caused by hydrogen peroxide, bleomycin, or ultraviolet (UV) light irradiation. HBEC bronchial epithelial cells were only stimulated with bleomycin and no p62 translocation was identified. In A459 alveolar epithelial cells treated with bleomycin and hydrogen peroxide, nuclear translocation was observed in a few cells presenting a reduced soma and refraction of the plasma membrane, suggesting that they were apoptotic cells. UV irradiated A549 cells showed no changes in p62 translocation nor morphological signs of apoptosis. Finally, MLE12 mouse lung cells were more sensitive to bleomycin and hydrogen peroxide treatment than A549 cells, and nuclear translocation of p62 was observed in those cells with apoptosis signs. MLE12 cells irradiated with UV light after 6, 12, and 30 minutes showed translocation of p62, colocalization with the DNA damage marker γ H2AX, and morphological features of

apoptosis, compared to control cells. Treatment of MLE12 cells with staurosporine (an inducer of the intrinsic apoptosis pathway) did not promote nuclear p62 translocation. Together, these data indicate that p62 translocation is induced in response to DNA damage but not with other inducers that promote apoptosis. However, it remains to be defined in the lungs of patients with NH and IPF, which stimulus could induce p62 translocation in epithelial cells. It will also be important to verify that cells with nuclear p62 are also apoptotic, colocalizing p62 with caspase 3 or using TUNEL assay.

INTRODUCCIÓN

1. Función y arquitectura pulmonar

El pulmón es el órgano responsable del intercambio gaseoso entre el torrente sanguíneo y la atmósfera. La sangre venosa que entra a los pulmones pasa a través de los capilares, que forman una red que rodea a los alvéolos, de esta manera el oxígeno (O_2) y el dióxido de carbono (CO_2) pueden alcanzar el equilibrio en la interfaz sangre-aire, lo que resulta en la eliminación de dióxido de carbono de la sangre y la absorción de oxígeno. Los subproductos de este intercambio resultan en el dióxido de carbono exhalado y la sangre arterial oxigenada que sale del pulmón y recorre el sistema cardiovascular hacia los órganos periféricos. En los tejidos, el oxígeno se difunde según su gradiente de concentración, es decir, de la mayor concentración a la menor concentración y es incorporado en las células (Rhodes *et al.*, 2022). El tracto respiratorio comienza en las narinas y la boca, desde donde el aire es inhalado y llevado hasta los alvéolos terminales, la unidad funcional del pulmón y el lugar donde ocurre el intercambio gaseoso. El tracto respiratorio comienza a ramificarse a partir de la tráquea, lo que lleva a la formación de bronquios, bronquiolos y, finalmente, de alvéolos (fig. 1). La sección que comprende la tráquea, bronquios y bronquiolos se conoce como zona conductora, que dirige y acondiciona el aire que entra a los pulmones, mientras que la sección distal del intercambio gaseoso, los alvéolos, conforman la zona respiratoria. Alrededor de estas estructuras se desarrolla el tejido conectivo, arterias y venas que se extienden a lo largo de la zona respiratoria y proporcionan un soporte tridimensional, desde el hilum a la pleura y, por lo tanto, aseguran estabilidad mecánica y conectiva en todas las partes del órgano. A la altura de los alvéolos, el tejido conectivo se reduce al grado de formar septos delgados entre los sacos alveolares y los capilares (fig. 2) (Chaudhry y Bordoni, 2022).

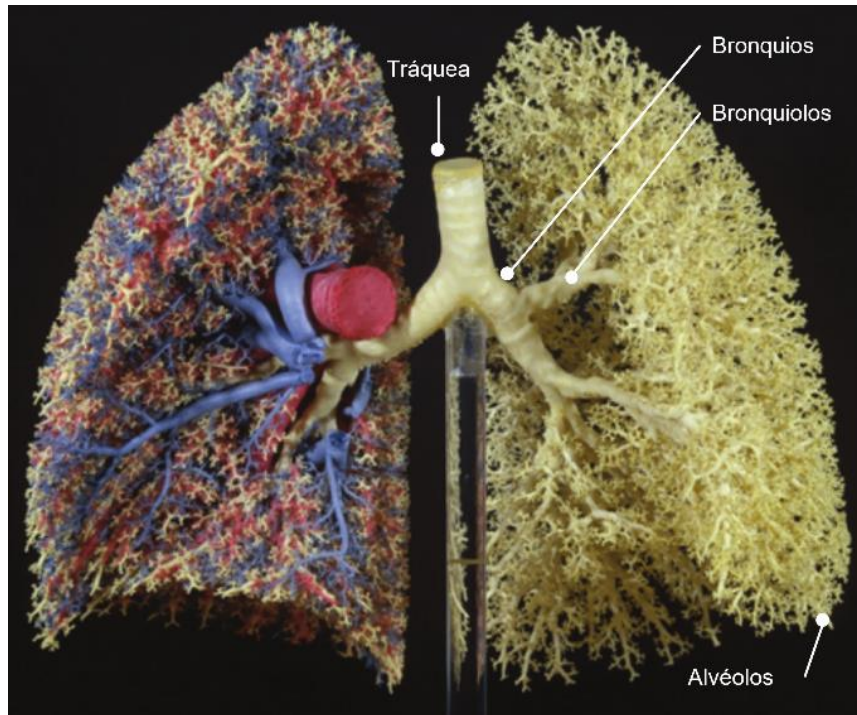


Figura 1. Modelo del sistema respiratorio humano (amarillo/blanco), arterias (rojo) y venas (azul). Tomado y modificado de Jobe *et al.*, 2016.

Hasta el año 2008 (Franks *et al.*), la diversidad celular del tracto respiratorio se estimaba en 40 tipos celulares distintos. Para el 2020, con la publicación del atlas celular del pulmón humano y por medio de técnicas de secuenciación de RNA de célula única, se han descrito 58 poblaciones celulares diferentes (Travaglini *et al.*, 2020).

1.1 Epitelio pulmonar

Durante el desarrollo embrionario, el epitelio pulmonar emerge a partir de una población de células fundadoras en el endodermo (Tata y Rajagopal, 2017). El epitelio respiratorio es un continuo de células con uniones muy estrechas entre ellas, a la altura de las narinas, proporciona una barrera física entre el ambiente y el individuo, de manera similar a la piel. En realidad, el epitelio del vestíbulo nasal es una extensión del epitelio de la piel de la cara. El vestíbulo nasal cuenta con revestimiento de epitelio plano estratificado y glándulas sebáceas, además contiene una cantidad variable de vibrisas que atrapan partículas grandes. Donde termina el vestíbulo nasal, el epitelio plano estratificado se adelgaza y se transforma hasta convertirse en epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado clasificado así por la gran

abundancia (70%) de células cilíndricas alargadas con cilios que se proyectan dentro del moco que cubre la superficie del epitelio. En esta región también coexisten células caliciformes que sintetizan y secretan moco, células en cepillo con microvellosidades romas cortas con propiedades quimiosensoriales y células basales que se ubican inmediatamente sobre la membrana basal, sin contacto con la superficie epitelial y son células pluripotenciales (Ross y Pawlina, 2018).

El epitelio olfatorio, que es por medio del cual percibimos los olores, es cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células bipolares. En esta región se encuentran células del sistema nervioso con receptores olfatorios a las que se les conoce como bipolares porque ocupan todo el espesor del epitelio y llegan hasta el sistema nervioso central. Además, el epitelio se sostiene sobre una lámina propia que, a su vez, se adhiere con firmeza al periostio y al pericondrio del hueso o cartílago contiguo. Otra característica de esta región es la presencia de glándulas olfatorias o glándulas de Bowman, que envían secreciones proteicas hacia la superficie olfatoria a través de conductos, dichas secreciones contienen gránulos de lipofuscina que le confieren a la mucosa su coloración natural pardo amarillenta. A lo largo del tracto respiratorio son diferentes tipos de células encargadas de la secreción de diferentes sustancias al espacio luminal (Ross y Pawlina, 2018).

El epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado se conserva en las vías inferiores que son la tráquea, bronquios y bronquiolos de mayor diámetro. Lo que empieza como un solo conducto en la tráquea, sufre una serie de ramificaciones, siendo uno de los últimos segmentos los bronquiolos terminales; en esta sección, la altura de las células disminuye, así como el grosor de la membrana basal y la lámina propia, hasta que el epitelio se transforma en un epitelio cúbico simple ciliado (fig. 2). Los bronquiolos respiratorios son una zona de transición ya que participan en la conducción y en el intercambio gaseoso. En esta sección hay una gran abundancia de células Clara, que son células no ciliadas de carácter secretor. Los alvéolos pulmonares surgen de las evaginaciones de los bronquiolos terminales (Ross y Pawlina, 2018).

El alvéolo pulmonar es una estructura altamente especializada en el intercambio gaseoso, aquí la diversidad celular disminuye y se encuentran principalmente 2 tipos celulares:

Células epiteliales alveolares tipo I (AEC I, por sus siglas en inglés de Alveolar Epithelial Cells Type I) que son células muy delgadas que revisten la mayor parte de la superficie de

los alvéolos, alrededor del 90%, sin embargo, sólo constituyen el 40% de la población de células en los alvéolos (Ross y Pawlina, 2018).

Células epiteliales alveolares tipo II (AEC II, por sus siglas en inglés Alveolar Epithelial Cells Type II) que son células cúbicas secretoras y se congregan principalmente entre las uniones septales de los alvéolos, constituyen alrededor del 60% de las células del revestimiento alveolar, pero se localizan en un área muy confinada y recubren solo el 5% de la superficie alveolar (Ross y Pawlina, 2018). Estas células también poseen carácter secretor y sintetizan el surfactante pulmonar, una sustancia compuesta por fosfolípidos y proteínas, que posee propiedades físicas como interfaz acuosa que disminuye el estrés mecánico de las células al momento de la compresión y expansión característica de la respiración pulmonar. Adicionalmente, las proteínas que conforman al surfactante son un puente de comunicación con las células del sistema inmune (López-Rodríguez y Pérez-Gil, 2014).

En condiciones fisiológicas, se considera que el epitelio alveolar es una de las poblaciones celulares del pulmón con la menor tasa de proliferación, su recambio puede llevar entre 4 a 6 semanas. Sin embargo, en respuesta al daño, las AEC II se activan y adquieren su característica regenerativa distintiva, ya que tienen la capacidad de activar su ciclo celular y auto renovarse o transdiferenciarse (Chan y Liu, 2022).

Además de las células del epitelio pulmonar, en el tracto respiratorio coexisten otros tipos celulares que en conjunto mantienen la homeostasis del pulmón, como células del sistema inmune, células endoteliales y los fibroblastos. Un componente esencial de los tejidos es la matriz extracelular (MEC), una estructura macromolecular que provee un microambiente físico y bioquímico, con composición y organización específica en cada tejido, que también actúa como reservorio de moléculas de señalización, por ejemplo, factores de crecimiento. Además, regula distintos procesos celulares como la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis, por lo tanto, es crucial para mantener la homeostasis de los tejidos (Whitte, 2015). En el pulmón, además de las células mesenquimales, las células AEC II poseen un papel importante en la secreción de proteínas de la MEC, ya que no solo secretan las proteínas de su propia membrana basal, sino que también juegan un papel preponderante en la remodelación de la MEC durante el desarrollo de enfermedades pulmonares crónicas (Rosmark *et al.*, 2023).

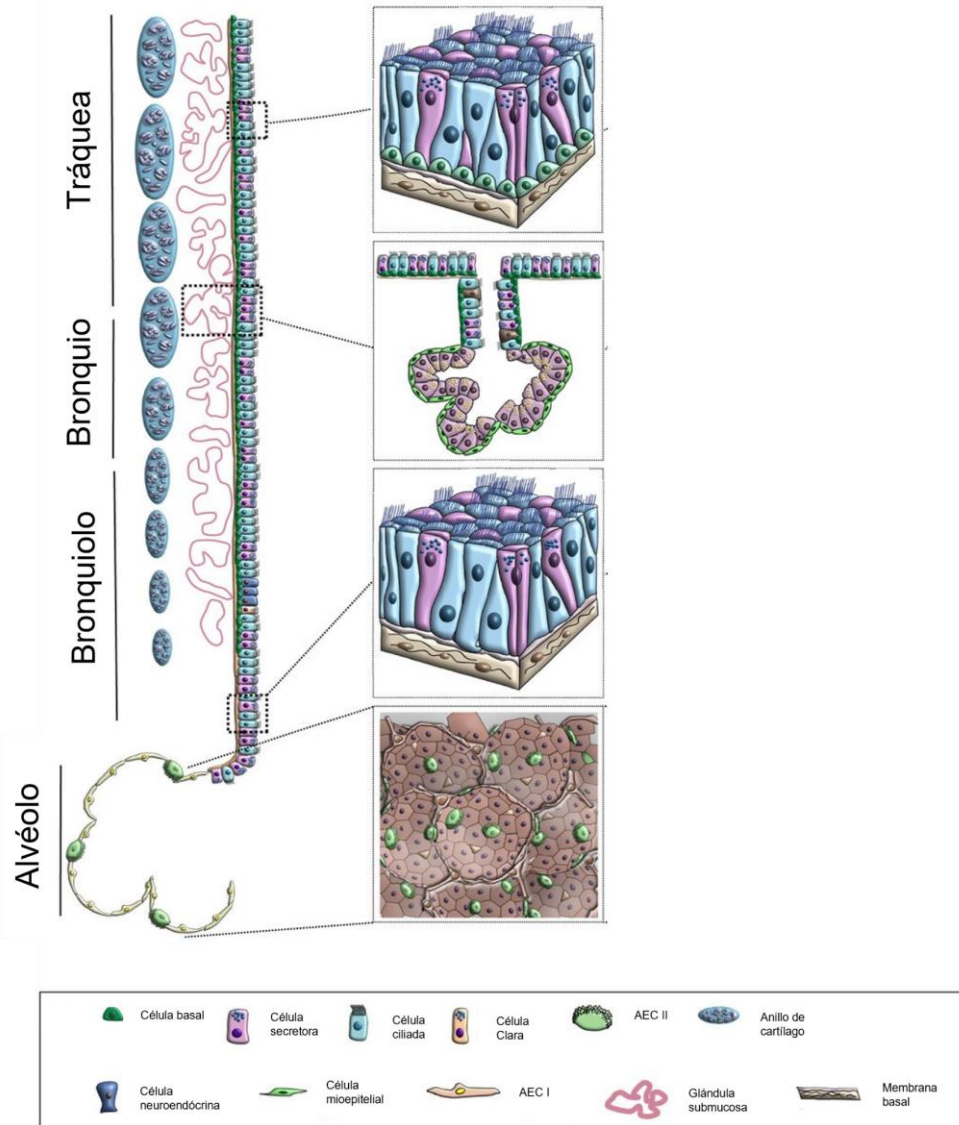


Figura 2. Poblaciones celulares del epitelio respiratorio a lo largo del tracto respiratorio. Las regiones que componen al tracto respiratorio se dividen en tráquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos. Está representado el epitelio cilíndrico pseudoestratificado desde la tráquea hasta cierta región del bronquiolo, posteriormente, se convierte en epitelio cilíndrico plano a la altura del alvéolo. Del lado derecho se aprecia una esquematización con aumento de las distintas regiones representadas. Modificada de Tata y Rajagopal, 2017.

1.2 El papel del epitelio pulmonar y la respuesta inmune innata

El epitelio de las vías respiratorias está en comunicación directa con el ambiente que puede llevar consigo partículas orgánicas como polen, inorgánicas como los productos del humo del cigarro o contaminantes ambientales y microorganismos como bacterias o virus, que

alcanzan regiones tan distales como el alvéolo. Las vías aéreas superiores que comprenden la nariz, faringe e incluso la tráquea, pueden alojar a partículas del tamaño de 10 μm , mientras que al alvéolo pueden llegar partículas de 5 μm o menores (Riches y Martin, 2018). Para defenderse de los agentes de daño, existen diferentes tipos de células efectoras que, en conjunto, conforman la respuesta inmune innata del pulmón.

El epitelio pulmonar forma una barrera física impermeable ante los agentes que se encuentran en el espacio luminal debido a sus uniones intercelulares de tipo estrechas. Adicionalmente, muchas de las células que lo conforman secretan distintos componentes como mucinas o tensoactivos que lubrican y protegen la barrera epitelial, entre las células secretoras están las células Clara y las AEC II. Mientras tanto, las células ciliadas poseen movimientos de barrido que permite mantener la limpieza y la exclusión de partículas sobre la superficie del epitelio pulmonar (Whitsett y Alenghat, 2015).

La protección de la integridad del epitelio también la llevan a cabo células inflamatorias, entre las que se encuentran los neutrófilos, monocitos, macrófagos alveolares y macrófagos residentes de tejido; su función principal es fomentar una respuesta rápida para mantener la homeostasis, así como la reparación, en caso de ser necesaria, y el correcto funcionamiento del tejido. Las células inflamatorias tienen la capacidad de secretar especies reactivas del oxígeno (ERO) para combatir a microorganismos, así como de fagocitar directamente al agente de daño, y también tienen la capacidad de reaccionar ante estímulos de citocinas para reclutar a un mayor número de células inflamatorias y pueden establecer comunicación con células del sistema inmune adaptativo (Riches y Martin, 2018).

La respuesta inmune innata puede llegar a ser tan especializada como la que llevan a cabo los neutrófilos cuando secretan trampas extracelulares compuestas por proteínas, cromatina y MEC, para desintegrar factores de virulencia de bacterias y así poder matarlas, aunque este proceso implique la muerte de los mismos neutrófilos, ya que su membrana celular se rompe para dejar salir estos materiales intracelulares. Este proceso, conocido como formación de NETs (por sus siglas en inglés de Neutrophil Extracellular Traps) ocurre en escenarios de inflamación aguda (Brinkmann *et al.*, 2004).

1.3 Estrés citotóxico y daño al epitelio pulmonar

El estrés citotóxico es un proceso que ocurre cuando una célula se encuentra expuesta a cualquier agente que afecte su funcionamiento y ponga en peligro su viabilidad. Si no se elimina la exposición al agente de daño y la célula no es capaz de restablecer su homeostasis, la célula en cuestión tendrá como destino la muerte. Debido a que el epitelio pulmonar está expuesto a una gran cantidad de partículas del ambiente, las células del epitelio pulmonar se enfrentan a diferentes tipos de daño constantemente (fig. 3).

1.3.1 Antígenos orgánicos

Como mencioné previamente, a pesar de las barreras innatas, tanto partículas orgánicas como inorgánicas pueden alcanzar zonas distales del pulmón, como lo son los alvéolos. Los antígenos orgánicos comprenden un amplio grupo de entidades biológicas capaces de desencadenar una respuesta inmune. Los humanos constantemente somos amenazados por virus, bacterias y hongos o podemos desarrollar alergias ante el polen de plantas, esporas de hongos, pelo de animales o ácaros del polvo, por mencionar los ejemplos más comunes. Un estudio realizado en la Ciudad de México encontró que el polen más abundante en el aire es el de árboles del género *Fraxinus* (fresno), este polen puede llegar a medir entre 10-30 μm , por lo tanto, puede llegar a zonas como la tráquea (Calderón-Ezquerro *et al.*, 2016; Trigo *et al.*, 2008). Sin embargo, organismos más pequeños como *Mycobacterium tuberculosis* que mide 1.5 μm puede llegar hasta el alvéolo pulmonar (Han *et al.*, 2015).

De la misma manera, virus con tamaño en la escala de nanómetros como el SARS-CoV-2 (~100 nm), evidentemente, pueden alcanzar los alvéolos, dañando a las células epiteliales AEC I y AEC II, sin embargo, también interactúan con células del epitelio bronquioalveolar, células del endotelio o del músculo liso, y se sabe que se concentran en las células epiteliales de la región nasofaríngea debido a la proteína de la cápside que recubre al virus conocida como Spike, específicamente, la región RBD (Bar-On *et al.*, 2020).

Las células inflamatorias reconocen biomoléculas específicas de los microorganismos, no a los organismos completos *per se*, en este sentido, los antígenos pueden ser clasificados en cinco categorías: proteínas, glicoproteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Las proteínas son los componentes de los microorganismos que desencadenan respuestas inflamatorias de mayor intensidad (Giese, 2016).

Inicialmente, cualquier respuesta inflamatoria que se genera ante un antígeno orgánico podría entrar en la definición de *alergia*, de ahí que las palabras *alergia* y *alergeno* son utilizadas para referirse a dicho antígeno orgánico (Komlósi *et al.*, 2022). Sin embargo, es el nivel al que ocurre la respuesta ante el antígeno lo que definirá si se desarrolla alergia, asma o neumonitis por hipersensibilidad, por mencionar algunas de las reacciones más conocidas. Otras variables son si la respuesta se da a nivel de bronquios (vías superiores) o en alvéolos (vías inferiores), o el tipo de reacción de hipersensibilidad que desencadena el antígeno en el individuo.

1.3.2 Antígenos inorgánicos

Los contaminantes ambientales son partículas inorgánicas como el ozono, óxido de nitrógeno y material particulado de diferentes tamaños. Estas partículas se clasifican de acuerdo a su tamaño, en las que miden de 0.5 a 2.5 μm de diámetro (PM 2.5) o de 2.5 a 10 μm (PM 10), el humo del cigarro se encuentra en el grupo PM 2.5 (Peden, 2019).

Algunos contaminantes ambientales son ERO, entre ellas el ion superóxido, radicales hidroxilos, peróxidos y el ozono, otras son especies reactivas del nitrógeno (ERN) entre las que se encuentran el nitrato, el peroxinitrito, el monóxido de nitrógeno y el dióxido de nitrógeno. Algunas de estas especies se producen de manera intracelular, sin embargo, es considerable la aportación de factores extrínsecos que no se encuentran de manera natural en el cuerpo y que son, principalmente, subproductos derivados de la actividad humana, entre ellos el ozono o los compuestos aromáticos policíclicos que se generan de manera natural durante la combustión del carbón, petróleo o gasolina (Huff *et al.*, 2019). Las ERO ambientales, a su vez, potencian la producción de ERO intracelulares. En un modelo cinético que toma datos de contaminantes ambientales de distintas regiones, se encontró una correlación positiva entre la concentración de PM 2.5 y la producción de ERO en el fluido adyacente al epitelio. La exposición a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ durante 2 h aumenta la concentración de ERO en el lavado bronquioalveolar de individuos de 100 a 250 nmol/L (Lakey *et al.*, 2016). Asimismo, se ha observado *in vitro* el aumento de enzimas relacionadas con el metabolismo de ERO que se producen después de la exposición de emisiones de diésel. La exposición a éstas y otras partículas inorgánicas del ambiente puede llevar al desarrollo de enfermedades como enfisema y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e

incluso agravar el pronóstico de enfermedades respiratorias previamente diagnosticadas (Zarcone *et al.*, 2018).

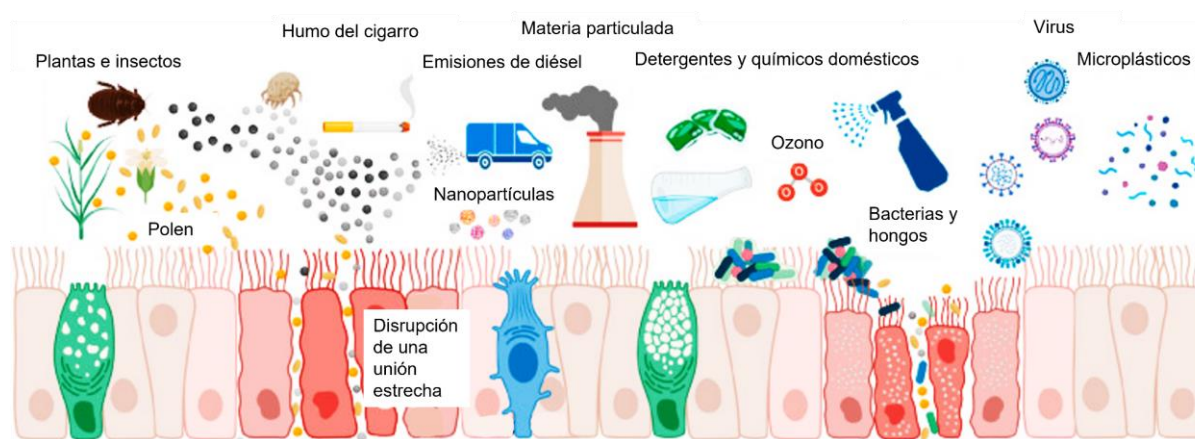


Figura 3. Agentes orgánicos e inorgánicos que desregulan la barrera epitelial. La barrera epitelial provee defensa física e inmunológica ante distintos factores ambientales, entre los que se encuentran antígenos orgánicos y contaminantes inorgánicos, algunos de ellos pueden provocar la disrupción de la barrera y dañar el epitelio. Modificada de Komlósi *et al.*, 2022.

2. Daño epitelial y el desarrollo de las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID)

Como he descrito previamente, la inhalación de antígenos de naturaleza orgánica o inorgánica conducen al daño del epitelio pulmonar y la recuperación del epitelio, después de una lesión, es fundamental para la restauración de la homeostasis pulmonar. Si el daño al epitelio es persistente, puede contribuir al desarrollo de enfermedades pulmonares.

Las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID) involucran el daño a las vías aéreas distales, por lo tanto, a los alvéolos, y comprenden un grupo heterogéneo de desórdenes en el parénquima pulmonar que presentan diferentes manifestaciones clínicas. Las EPID se caracterizan por la inflamación y/o fibrosis que se presenta en el espacio intersticial, cuya consecuencia principal es el impedimento del intercambio gaseoso, lo que se traduce como dificultad para respirar, mayor fatiga durante actividades físicas y un decremento en la calidad de vida. Las EPID pueden tener diferentes desenlaces, en algunas condiciones, puede ocurrir la estabilización o la reversión espontánea de la enfermedad, aunque en otras, específicamente en aquellas que manifiestan una fibrosis progresiva, la falla respiratoria puede llevar a la muerte (Wijsenbeek *et al.*, 2022).

De acuerdo a la clasificación de la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society publicada en 2022, las EPID se dividen en 6 grandes grupos (fig. 4) (Antoniou *et al.*, 2014; Wijsenbeek *et al.*, 2022). El **primer grupo** está constituido por neumonías intersticiales idiopáticas, es decir de causa desconocida. En este grupo la más frecuente es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). En el **segundo grupo** están las EPID relacionadas a enfermedades autoinmunes. En el **tercer grupo** están las de causa conocida o relacionada, las secundarias a fármacos, o las asociadas a la exposición ambiental o laboral a antígenos orgánicos e inorgánicos. El **cuarto grupo** de EPID, involucra cambios asociados con la formación de quistes o infiltración alveolar. La sarcoidosis conforma un **quinto grupo**. Finalmente, se encuentran otras enfermedades como la neumonía eosinofílica, tanto aguda como crónica, y la linfagitis carcinomatosa que no pertenecen a los grupos anteriores.

	Agudas	Subagudas	Crónicas
Idiopáticas	Neumonía intersticial aguda	Neumonía organizada criptogénica	Fibrosis pulmonar idiopática Neumonía intersticial idiopática no específica Neumonía intersticial descamativa
Relacionadas a enfermedades autoinmunes	Enfermedades intersticiales de rápida progresión, ej. Hemorragia alveolar difusa asociada a lupus eritematoso sistémico	Neumonía intersticial no específica Enfermedad pulmonar intersticial por vasculitis asociada al anticuerpo citoplasmático anti neutrófilos	Enfermedades intersticiales asociadas a tejido conectivo, ej. Artritis reumatoide, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren
Por exposición	Daño inducido por fármacos, ej. Quimioterapia, antibióticos, medicamentos cardiovasculares, medicina herbal	Neumonitis por hipersensibilidad Daño pulmonar asociado a radioterapia	Neumoconiosis
Enfermedades pulmonares intersticiales con quistes o infiltración alveolar		Histiocitosis de células de Lagerhans Proteinosis alveolar	
Sarcoidosis		Sarcoidosis	
Otras	Neumonía eosinofílica aguda Linfagitis carcinomatosa		Neumonía eosinofílica crónica

Figura 4. Clasificación de las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID). Tomada y modificada de Wijsenbeek *et al.*, 2022.

Las células epiteliales pulmonares han sido consideradas la primera línea de defensa en el pulmón y son responsables de coordinar la respuesta inmune frente a una lesión y la reparación posterior. En consecuencia, las células epiteliales se comunican con múltiples

tipos de células, incluidas las células endoteliales, células inflamatorias y los fibroblastos, para promover la inflamación aguda y la cicatrización en respuesta al daño (fig. 5). Sin embargo, la muerte celular y una reparación aberrante de las células epiteliales son características de la patogénesis de las EPID. A continuación, se describen las características de los dos tipos de EPID más frecuentes, que son la Neumonitis por Hipersensibilidad y la Fibrosis Pulmonar Idiopática.

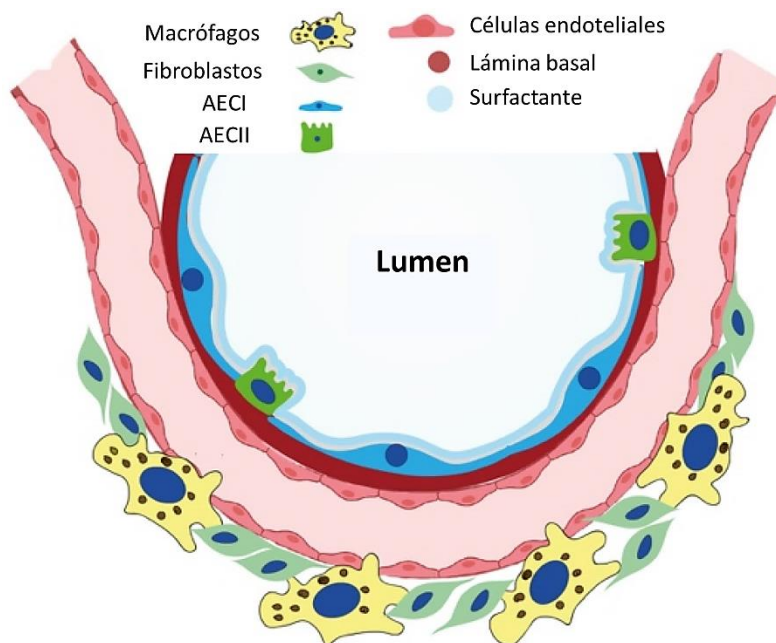


Figura 5. Composición celular del alvéolo sano. El alvéolo está compuesto de células AECI (azul) y células AECII (verde) que secretan el surfactante (azul claro). La lámina basal del epitelio alveolar (rojo) separa las células epiteliales alveolares de las células endoteliales alveolares (rosa). El tejido intersticial pulmonar es un compartimento compuesto principalmente por matriz extracelular, fibroblastos (verde claro) y macrófagos (amarillo). Tomada y modificada de Confalonieri *et al.*, 2022.

2.1 Daño epitelial por exposición a antígenos y Neumonitis por Hipersensibilidad

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es un síndrome complejo causado por la inhalación de una variedad de antígenos en individuos susceptibles y sensibilizados. Estos antígenos se encuentran en el medio ambiente, en su mayoría derivados de proteínas de aves y hongos. La prevalencia e incidencia de la NH varían ampliamente dependiendo de la intensidad de la exposición, el área geográfica y el clima local. La susceptibilidad de los pacientes puede deberse a factores genéticos, concentración del antígeno, frecuencia de exposición y

tolerancia inmune. La NH se clasifica en las formas: aguda, crónica no fibrótica y crónica fibrótica (Cottin *et al.*, 2019, Costabel, 2020).

Los inductores de NH que causan daño pulmonar pueden ser tanto antígenos orgánicos (proteínas animales, bacterias, hongos, etc.), como inorgánicos (asbestos, sílice, metales, etc.).

Los antígenos aviarios constituyen la mayor proporción de casos de NH en México y es probable que sea el subtipo de NH más frecuente en los criadores de palomas. De hecho, según un estudio mundial de 116 casos, la incidencia más alta de NH está asociada con los antígenos aviarios, seguido por los antígenos bacterianos (“*pulmón del granjero*”) y fúngicos (*pulmón de humidificador, o NH de verano*) (Costabel, 2020).

La medida más importante para la recuperación ante esta enfermedad es la identificación del antígeno causal y evitar la exposición al antígeno o antígenos ofensivos, estas medidas se asocian a una mejora clínica en el 40 % de los pacientes, mientras que la exposición persistente al antígeno se asocia a una mayor mortalidad. Por el contrario, si no se identifica el antígeno y si no se evita la exposición se puede desarrollar NH crónica y fibrótica, este desenlace también le puede ocurrir a individuos asintomáticos (Costabel, 2020).

2.1.1 Histología de la NH

La NH no fibrótica típica presenta cuatro características histológicas clave: 1) afectación de las vías respiratorias inferiores, 2) inflamación intersticial celular uniforme que es 3) predominantemente linfocítica, con 4) al menos un granuloma y células gigantes multinucleadas. La inflamación celular uniforme puede manifestarse como bronquiolitis celular o regiones de neumonitis intersticial (Hambling, 2022).

El patrón histológico de la NH fibrótica típica tiene tres características clave: 1) fibrosis centrada en las vías respiratorias inferiores con o sin metaplasia peribronquiolar generalizada, 2) neumonía intersticial fibrosante, y 3) granulomas (figura 6) (Hambling, 2022).

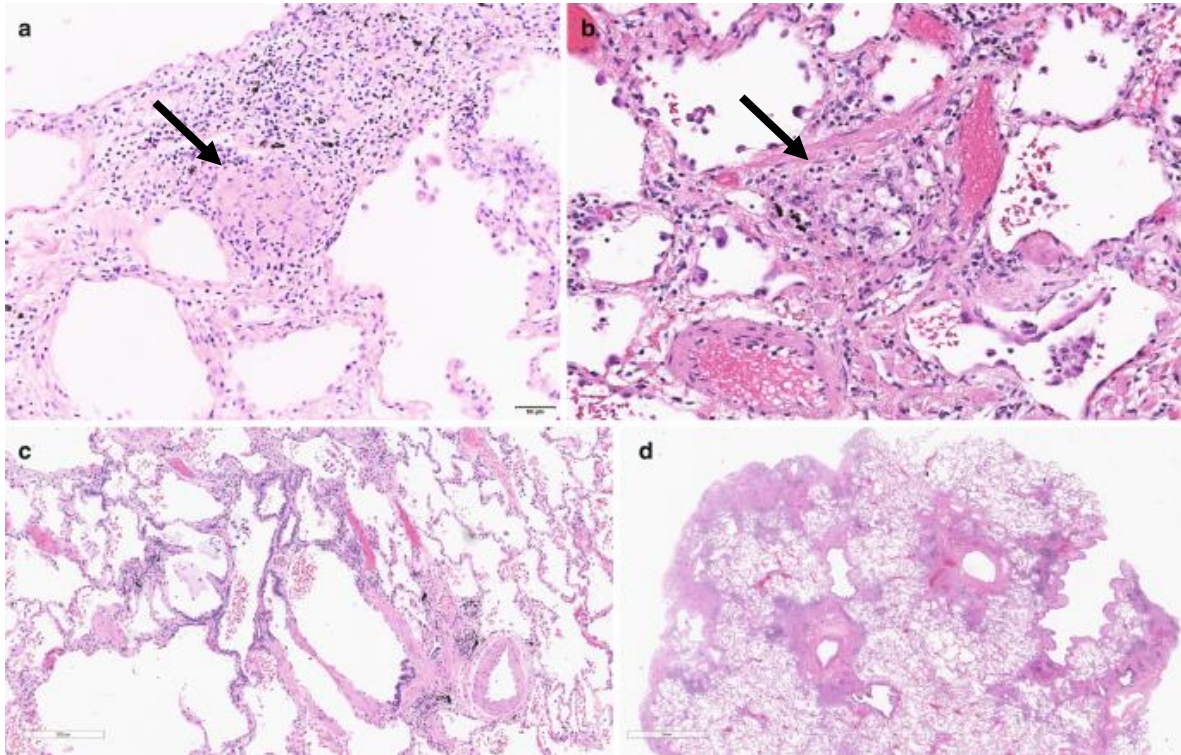


Figura 6. Características histológicas de la neumonitis por hipersensibilidad. Ejemplo del patrón histológico de un paciente con NH fibrótica. Patrón de neumonía intersticial usual (NIU) caracterizado por fibrosis en parches e incremento en el infiltrado inflamatorio, principalmente linfocítico (hematoxilina-eosina, aumento original 20X en a y c, 40X en b y 10X en d). Las flechas señalan granulomas. Figura tomada de Stanzione y Fishbein, 2022.

A nivel molecular y celular, el desarrollo de la NH involucra los siguientes eventos:

- a) *Un individuo genéticamente susceptible.* Se han identificado polimorfismos asociados con un incremento en la susceptibilidad de desarrollar NH: del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), del transportador de presentación de antígeno (TAP) y de la mucina 5 (MUC5).
- b) *Exposición a factores ambientales.* La exposición puede ocurrir en el lugar de trabajo, el hogar, los lugares que visita la persona o estar relacionada con pasatiempos. La duración de la exposición es variable, de días a semanas, meses o años. El epitelio alveolar responde a las moléculas alergénicas y colabora con las células del sistema inmune que reconocen β -d-glucanos en las paredes bacterianas y fúngicas que inducen hipersensibilidad, así como micotoxinas, reconocimiento que llevan a cabo por medio

de los receptores de reconocimiento de patrones o PPRs (del inglés, Pattern Recognition Receptors) (Vasakova *et al.*, 2019).

- c) *Respuesta inmune innata.* Esta respuesta involucra 1) el reconocimiento de antígenos por los PPRs; 2) fagocitosis y 3) el procesamiento de antígenos por el MHC I y II. La vía del MHC I implica el procesamiento de antígenos que se liberan al citosol, se conectan al TAP y se transportan al endosoma, en donde se asocian con el MHC I. Por la vía del MHC II, las proteínas extrañas se degradan en el proteosoma y los péptidos se unen al MHC II. Finalmente, ocurre la presentación del antígeno por moléculas del MHC I en células T CD8⁺ o por el MHC II en células T CD4⁺ y células presentadoras de antígenos (APC). En el caso de los inductores inorgánicos se puede activar el inflamosoma a través de NALP3 (por sus siglas en inglés de NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3), así como ocurre después de la fagocitosis de partículas de sílice en los macrófagos de pulmón (Leung *et al.*, 2012).
- d) *Sensibilización.* Los linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ reconocen al antígeno como una señal de peligro, lo que desencadena una reacción inmunitaria que conduce a la inmunidad celular, humoral y de memoria.
- e) *Reacción inmune ante la reexposición al antígeno.* Ocurre una respuesta inmune de linfocitos T tipo 1 (Th1), Th2 y Th17 que conduce a la inflamación linfocítica, bronquitis, bronquiolitis, alveolitis y formación de granulomas (fig. 6).
- f) *Fibrosis.* El epitelio dañado y las células inflamatorias secretan citocinas pro fibrosantes que promueven el reclutamiento y la activación de fibroblastos, su proliferación y la producción descontrolada de matriz extracelular que se acumula en el espacio intersticial. Se cree que en esta etapa hay un cambio (“shift”) hacia el aumento de la respuesta Th2, caracterizada por la secreción de IL4, IL3 y TGFβ1, citocinas pro fibrosantes que promueven el incremento de la síntesis de colágena, así como su depósito. En conjunto, la enfermedad que progresa de esta manera sin un tratamiento resulta en una NH crónica (Costabel, 2020).

2.2 Daño epitelial de causa desconocida y el desarrollo de Fibrosis Pulmonar

Idiopática (FPI)

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es la enfermedad intersticial pulmonar más severa, es una enfermedad crónica, progresiva, de etiología desconocida y asociada al envejecimiento. A nivel celular, se caracteriza por un daño inicial al epitelio pulmonar, seguido de la migración y activación de fibroblastos que producen una acumulación excesiva de moléculas de la matriz extracelular, principalmente colágenas fibrilares (Tsukui *et al.*, 2020), lo que provoca, entre otros problemas que aquejan a estos pacientes, pérdida de la arquitectura pulmonar, dificultad para respirar y tos seca. La FPI es una enfermedad incurable, un individuo con esta enfermedad sufrirá una pérdida progresiva de la función pulmonar, aumento de disnea y tendrá un empeoramiento de pronóstico. La supervivencia media de estos pacientes es de 3-5 años después del diagnóstico (Lederer y Martínez, 2018).

No se ha podido determinar un agente causal de la FPI, sin embargo, se ha sugerido que los individuos que la padecen tienen alteraciones en el epitelio alveolar y una capacidad regenerativa alterada o disminuida, la capacidad de las AECII para restaurar las células AECI dañadas se ve gravemente afectada (Selman y Pardo, 2001). Durante el desarrollo de la FPI hay un aumento en el nivel de apoptosis de las células AEC II tanto en áreas donde la fibrosis se encuentra establecida como en áreas en las que no (Sharma *et al.*, 2021; Barbas-Filho *et al.*, 2001). También se ha descrito un aumento en el número de AEC II hiperplásicas e hipertróficas con abundante citoplasma, con núcleos hipercromáticos y cuboidalización del epitelio, principalmente en las zonas donde los septos alveolares se engrosan y se desarrolla la fibrosis (Selman y Pardo, 2006).

Dentro del microambiente de la enfermedad, el peróxido de hidrógeno secretado por los miofibroblastos funciona como una señal que difunde a través de la membrana de las células epiteliales y desencadena la apoptosis (Waghray *et al.*, 2005). Las AEC II que escapan de la apoptosis adoptan un fenotipo mesenquimal, proceso que en la literatura está referido como Transición Epitelio Mesénquima (TEM), este proceso sostiene la generación de AEC II aberrantemente activadas, ya que secretan factores profibrosantes como TGF- β 1 lo que, a su vez, impide la re-epitelización después del daño. El fallo de los mecanismos de control intracelulares como el sistema ubiquitina-proteosoma, la respuesta de proteínas mal plegadas, la macroautofagia, la mitofagia y el mantenimiento de los telómeros resultan en una gran

diversidad de endotipos y firmas moleculares como estrés de retículo endoplásmico, defectos en la autofagia, disfunción mitocondrial, apoptosis, reclutamiento de células inflamatorias, liberación de moléculas pro fibrosantes y la alteración de la función progenitora, lo que finalmente conduce a un daño epitelial permanente y al desarrollo de la fibrosis pulmonar (fig. 7) (Katzen y Beers, 2020).

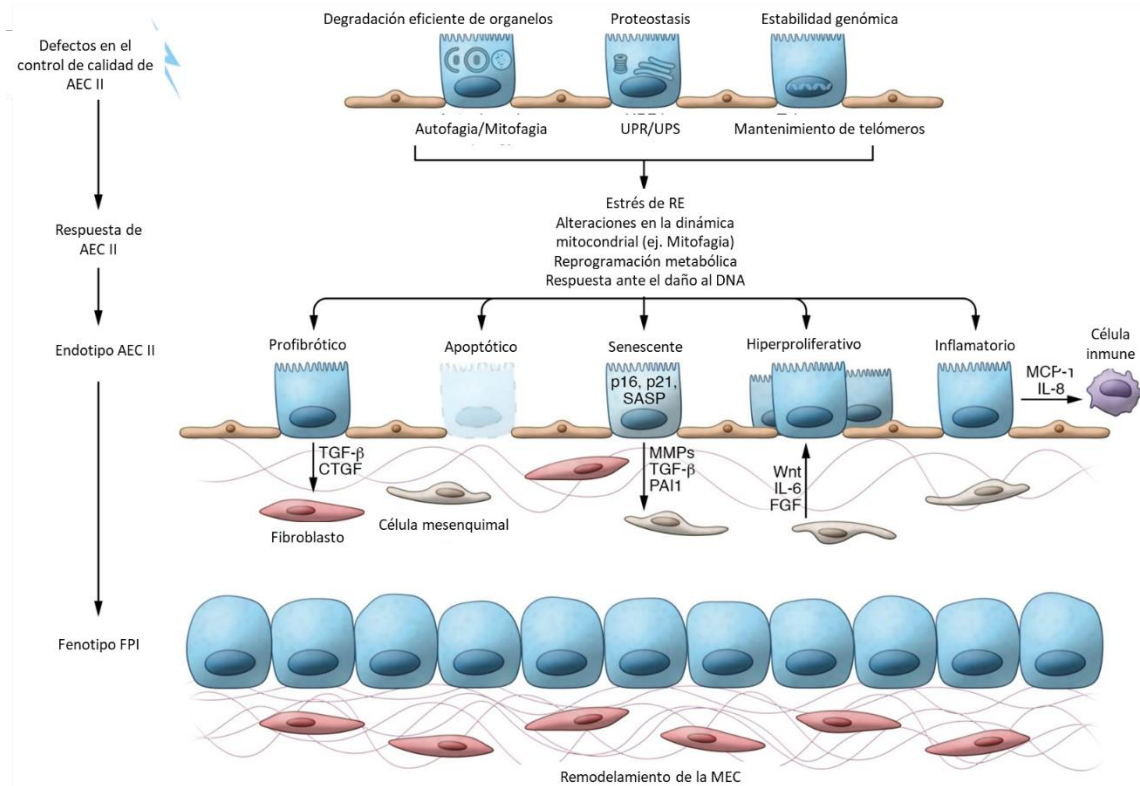


Figura 7. Alteraciones epiteliales durante el desarrollo de FPI. Tomada y modificada de Katzen y Beers, 2020.

3. Alteraciones en los sistemas de degradación celular en el epitelio pulmonar y su papel en la patogénesis de las enfermedades fibrosantes

Las principales vías de degradación celular en los eucariontes son el sistema ubiquitina-proteosoma y la autofagia. Tanto el flujo autofágico como la función del proteosoma están alterados en los tejidos pulmonares de pacientes con NH y FPI. La inhibición en la actividad autofágica aumenta el estrés del retículo endoplásmico y la senescencia en células epiteliales bronquiales (Araya *et al.*, 2013). También se ha demostrado que la inhibición de la autofagia desencadena la transición epitelio mesénquima de células AEC I. No es claro si las células

epiteliales que sufren dicha transición contribuyen a la población de fibroblastos secretores de matriz extracelular, pero sí contribuyen a una comunicación aberrante entre fibroblastos y células epiteliales (Yue *et al.*, 2022).

In vitro, varios genes esenciales en la vía autofágica, incluidos ATG14 y Beclin1, están disminuídos en las células epiteliales pulmonares cuando son estimuladas con la citocina IL-17, que en su mayoría es liberada por los neutrófilos (Yue *et al.*, 2022).

Reforzando las evidencias encontradas en las EPID en humano, en un modelo animal de fibrosis pulmonar se demostró que la deficiencia de ATG4B resulta en un incremento en la apoptosis de células epiteliales bronquiales y alveolares en el día 7 después del tratamiento con bleomicina, junto con una respuesta inflamatoria aguda, lo que resultó en una fibrosis más severa y una acumulación de colágena. Por otro lado, la activación de la autofagia disminuye el daño pulmonar en el modelo murino de fibrosis inducida por bleomicina, a través de la inhibición de la apoptosis en las células epiteliales (Wang *et al.*, 2018).

Por lo tanto, alteraciones en la autofagia conducen a la disfunción de las células epiteliales y al subsecuente desarrollo de fibrosis pulmonar. A continuación, se describen de forma general las características de los sistemas de degradación ubiquitina-proteosoma y autofagia.

3.1 Sistema ubiquitina proteosoma

El proteosoma es un complejo proteico dependiente de ATP altamente conservado que consiste en dos motivos principales: el centro catalítico con la partícula 20S y la partícula reguladora 19S u 11S (Liu *et al.*, 2016). El proteosoma puede actuar tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula, este sistema es el encargado de la degradación de alrededor del 80% de las proteínas en la célula. Para que ocurra la degradación, la ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos de ~8.6 kDa, se une a las proteínas. Esta unión conocida como ubiquitinación, es un proceso de modificación postraduccional en el que se unen moléculas de ubiquitina en residuos aminoácidos, dicho proceso se lleva a cabo a través de una cascada enzimática de enzimas ubiquitina ligasas (E1, E2, E3). Inicialmente, la ubiquitina se activa a través de la formación de un enlace tioéster de alta energía entre el sitio activo de la enzima activadora E1 y el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina (esto es dependiente de ATP). Luego, la ubiquitina se transfiere a las conjugasas de ubiquitina (E2) y finalmente se conjuga

con los residuos de lisina dentro del sustrato, o con el grupo amino N-terminal, mediante una ligasa de ubiquitina (E3), que reconoce motivos específicos en la proteína blanco (fig. 8).

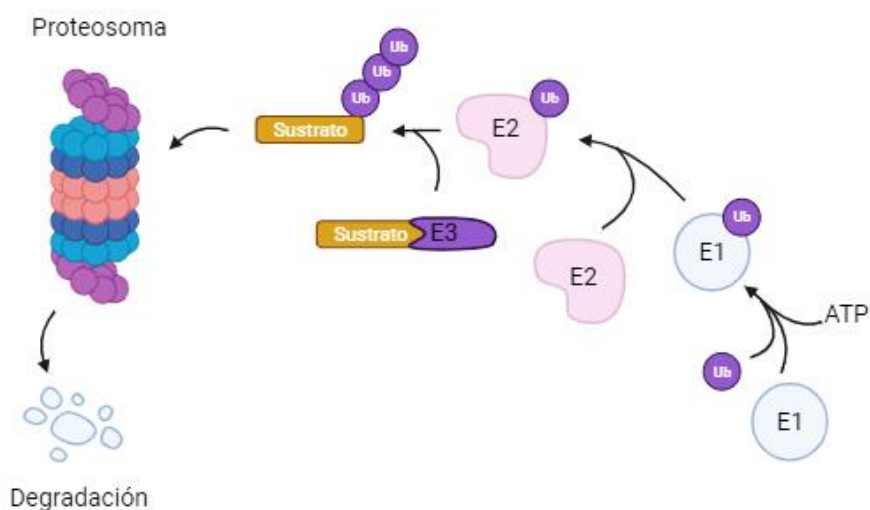


Figura 8. Mecanismo de degradación de proteínas ubiquitinadas por la vía del proteosoma.

3.2 Autofagia

La autofagia es una vía de degradación celular conservada en todos los eucariotas, degrada agregados proteicos y organelos en el citoplasma a partir de la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas. Este proceso se encuentra involucrado en el recambio normal de mitocondrias (mitofagia) y también de otros organelos como el retículo endoplásmico (reticulofagia), peroxisomas (peroxifagia), proteosomas (proteofagia) e incluso, la degradación de micronúcleos (nucleofagia). La remoción de agregados proteicos por esta vía también se conoce como agregofagia, agregados que se pueden acumular en condiciones de estrés, envejecimiento y en distintas enfermedades (Wyant *et al.*, 2018).

Las proteínas clave en esta vía están codificadas por la familia de genes ATG (Autophagy-related genes), descritos inicialmente en levaduras (Tsukada y Ohsumi, 1993). Actualmente, esta familia comprende más de 30 ATGs (Münz, 2017). En condiciones fisiológicas, la autofagia ocurre a un nivel basal, aunque también es un proceso celular adaptativo que ocurre en respuesta a diferentes formas de estrés como pueden ser privación de nutrientes, disminución de factores de crecimiento, infección, hipoxia (Dikic y Elazar, 2018) y estrés de retículo endoplásmico (Yorimitsu *et al.*, 2006), por mencionar algunos ejemplos (fig. 9). La autofagia actúa principalmente como un mecanismo para prevenir la muerte celular, sin

embargo, cuando la viabilidad celular no se logra conseguir, componentes de la autofagia pueden interactuar con componentes de la vía apoptótica y activarla (Choi *et al.*, 2013).

3.2.1 Etapas de la autofagia

3.2.1.1 Inicio o nucleación

La activación de la autofagia depende de la inhibición de mTOR (mammalian Target of Rapamycin), ya que esta cinasa regula negativamente a la enzima UKL1 (unc-51 like autophagy kinase 1), un inductor de la autofagia (Lawrence y Zoncu, 2019; Kim *et al.*, 2011). En condiciones de privación de nutrientes, el factor de transcripción TFEB (Transcription Factor EB) se desfosforila y se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes relacionados con la autofagia y los lisosomas. La nucleación inicia con la cinasa de treonina-serina ULK1 que forma un complejo con ATG13, ATG101 y FIP200. Una vez activado el complejo ULK1, desencadena la formación del fagóforo, una membrana de aislamiento que se elonga alrededor del cargo y lo separa físicamente del resto del citoplasma (Settembre *et al.*, 2011).

3.2.1.2 Elongación y maduración del autofagosoma

El proceso de elongación implica el reclutamiento de las diferentes proteínas ATGs al omegasoma que es un dominio del RE en donde se inicia la formación del autofagosoma y se asemeja en morfología a la letra omega del alfabeto griego, esta estructura se encuentra enriquecida con Fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P). El fagóforo puede provenir de membranas de orígenes distintos, como el retículo endoplásmico, el aparato del Golgi, el núcleo, la mitocondria y la membrana plasmática. ATG9 es la proteína transmembranal encargada de dirigir las membranas desde los organelos donadores hacia la región yuxtannuclear para la formación del fagóforo (Zhou *et al.*, 2017). Durante el proceso de elongación, la proteína WIPI2 puede reclutar directamente a ATG16L1 que, a su vez, reclutará al complejo ATG5-ATG12 para formar un complejo de unión trimérico, lo que promueve la conjugación de LC3B (microtubule-associated protein light chain 3) (Dikic y Elazar, 2018). Por otro lado, también se puede dar la conjugación a través de ATG4B, la única proteasa dentro de las ATGs que procesa a la proteína pro-LC3B para exponer al residuo de glicina en su grupo carboxilo terminal, generando la forma LC3B-I, y se pueda unir el componente lipídico fosfatidiletalonamina de forma covalente para formar LC3-II, lo

que permite a esta proteína incorporarse a ambas membranas del fagóforo para extenderlas, hasta que se cierran formando un autofagosoma maduro.

La proteína p62 funge como proteína adaptadora, por medio de su dominio LIR (LC3 Interaction Region) se une a LC3 en la membrana del autofagosoma y por medio de su dominio UBA a las ubiquitinas del sustrato a degradar (Dikic y Elazar, 2018). Una señal de que el flujo autofágico no funciona de manera correcta es el aumento en la acumulación de p62 en el citoplasma. La fase final de la formación del ahora nombrado autofagosoma consiste en el sellado de la membrana del fagóforo, en donde la membrana interna y la externa se transforman en entidades separadas, será en la membrana interna donde se encuentren los elementos citosólicos a digerir (agregados proteicos, patógenos, organelos, etc.) (Knorr *et al.*, 2015).

3.2.1.3 Fusión con el lisosoma y formación del autolisosoma

Finalmente, el autofagosoma maduro es transportado hacia el lisosoma o al endosoma (Lei y Klionsky, 2020). Las proteínas encargadas del transporte vesicular pertenecen a la familia de las GTPasas Rab. Adicionalmente, la fusión del autofagosoma y el lisosoma está guiada por proteínas SNARE (SNAP-REceptor) que se encuentran ancladas en la membrana (Itakura *et al.*, 2012).

Se ha observado que la membrana interna del autofagosoma se degrada después de que el autofagosoma se fusiona con el lisosoma y luego de que la proteína STX17 se desacopla de la membrana (Tsuboyama *et al.*, 2017).

3.2.1.4 Degradación del cargo y reciclaje de productos degradados

La degradación del cargo dentro de los autolisosomas se lleva a cabo mediante las hidrolasas que se encuentran en el interior de los lisosomas como las catepsinas, así se producen biomoléculas como aminoácidos, nucleótidos y carbohidratos que posteriormente son liberados al citoplasma para la obtención de energía y su reutilización en la síntesis de polímeros (Gatica *et al.*, 2018). El lisosoma es un organelo característicamente ácido con alrededor de 60 hidrolasas que le confieren su función degradativa y pueden degradar desde ácidos nucleicos hasta bacterias (Schroder *et al.*, 2010). Las enzimas encargadas de la degradación trabajan a un pH ácido y cuando la acidificación del lumen del lisosoma no es óptima, el proceso autofágico se ve interrumpido y puede desencadenar algunas patologías que no están relacionadas con deficiencias de ATGs (Colacurcio y Nixon, 2016). De manera

general, se acepta que los metabolitos producto de la degradación son reciclados en el citoplasma a través de transportadores en la membrana de los lisosomas (Xu y Ren, 2015).

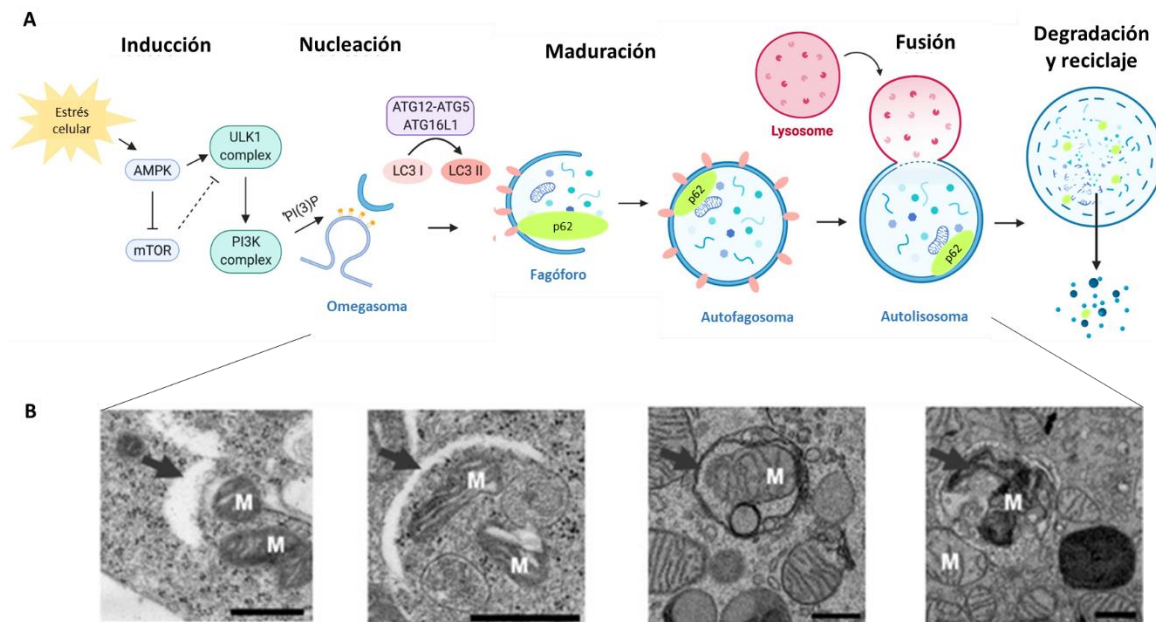


Fig. 9. A. Etapas de la autofagia. La proteína adaptadora p62 se muestra en color verde dentro del fagóforo. Tomada y modificada de Chang, 2020. **B.** Mitofagia. Micrografías de microscopía electrónica. La letra M indica a la mitocondria que será degradada y la flecha indica la formación del fagóforo. Tomada de Jung *et al.*, 2019.

4. La proteína p62 y su papel en las vías de degradación celular

La proteína adaptadora más estudiada en los procesos de degradación es p62 y participa tanto en el sistema ubiquitina-proteosoma, como en la autofagia. Se ha descrito previamente que la proteína adaptadora p62, marca el cargo a degradar e interactúa con la proteína LC3B-II, favoreciendo la formación del autofagosoma alrededor del cargo en la vía autofágica. En el sistema ubiquitina-proteosoma, la ubiquitina funge como etiqueta que permite marcar a las proteínas que se van a degradar y p62 puede participar en el reconocimiento de los sustratos y dirigirlos a su degradación. El tamaño del sustrato a degradar es un factor crítico para la elección de la vía de degradación, el proteosoma degrada principalmente proteínas aisladas o polipéptidos mal plegados que son capaces de entrar en la pequeña cavidad de su estructura de barril (fig. 8). Sin embargo, si se trata de grandes agregados proteicos, o de proteínas dañadas o mal plegadas, el mecanismo de degradación es la autofagia. Adicionalmente,

organelos como la mitocondria o fragmentos de núcleo son degradados por autofagia (Pohl y Dicik, 2019).

La proteína p62, también conocida como SQSTM1, se encuentra conservada en todos los metazoarios. En humanos, el gen *SQSTM1* se encuentra en el cromosoma 5 y posee 8 exones que codifican a una proteína de 440 aminoácidos, con un peso molecular de 62 kDa, y en mamíferos se expresa en todos los tejidos (Kumar *et al.*, 2022). Shin, quién clonó la proteína por primera vez, le acuñó el nombre de Sequestosoma 1 (SQSTM1) debido a su capacidad de formar agregados, sin embargo, de aquí en adelante me referiré a ella como p62. Debido a sus múltiples dominios estructurales, p62 puede interactuar con una gran cantidad de proteínas, lo que le permite participar en distintos procesos celulares. Posee un dominio amino terminal Phox-BEM1 (PB1) a través del que puede homopolimerizar, un dominio de dedos de zinc tipo ZZ, un motivo de exportación nuclear (NES), una región que interactúa con LC3 (LIR), una región que interactúa con Keap-1 (KIR) y un dominio carboxilo terminal de asociación a ubiquitina (UBA) (Fig. 10) (Liu *et al.*, 2016).

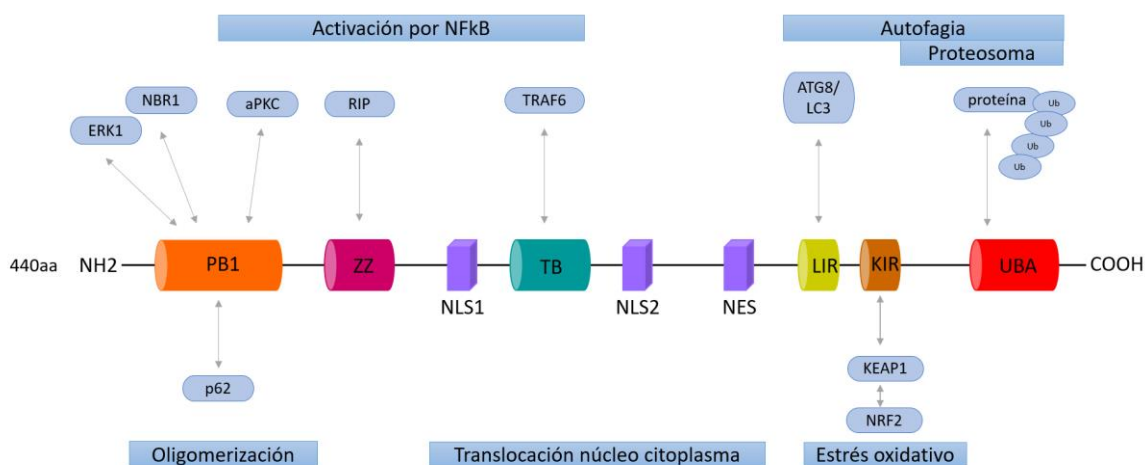


Figura 10. Dominios estructurales de p62 y proteínas de interacción. p62 posee 6 dominios principales, necesarios para la interacción con la maquinaria autofágica y otras vías de señalización. El dominio localizado en el extremo amino terminal PB1 (Phox and Bem1, 21-203 aa) está involucrado en la auto oligomerización de p62 o la heterodimerización con NBR1, así como también se puede unir a aPKC o ERK1. El motivo de dedos de zinc (ZZ, 128-163 aa) y el dominio de unión a TRAF6 (TB, 225-250 aa), interactúan con RIP y TRAF6, respectivamente, para regular la vía de

NFkB. p62 posee dos secuencias de localización nuclear (NLS1 y NLS2), además de una secuencia de exportación (NES), cuya activación modula la translocación núcleo-citoplasma de la proteína. p62 interactúa con la maquinaria autofágica a través de la región de interacción con LC3 (LIR, 321-345 aa) y el dominio asociado a ubiquitina ubicado en el extremo carboxilo terminal (UBA; 386-44 aa), este último también le proporciona acceso a la vía del proteosoma para la degradación de moléculas. La región de interacción con Keap1 (KIR, 346-359 aa), que se une a Keap1, permite la estabilización y translocación nuclear de Nrf2, encargado del control de la respuesta ante estrés oxidante.

La proteína p62 reconoce sustratos ubiquitinados a través de su dominio UBA. Las modificaciones de ubiquitina en un residuo aminoácido pueden adoptar diferentes configuraciones, por ejemplo, puede ser una cadena de ubiquitinas de manera lineal o ramificada, dependiendo de la enzima que coloque la marca. Se ha propuesto que el destino del sustrato a degradar también depende del residuo aminoácido que se encuentre ubiquitinado, ya que proteínas que se encuentran ubiquitinadas en el residuo K48 son dirigidas al proteosoma (Han *et al.*, 2018), mientras que cadenas de ubiquitina en K63, se dirigen a la degradación independiente del proteosoma. Aunque también existen modificaciones de ubiquitina en K6, K11, K27, K33 y K29, por mencionar algunas, y de estas últimas no se conoce un destino de degradación preponderante (Seibenhener *et al.*, 2004), por lo que cada cadena de ubiquitina podría tener una función celular distinta e interactuar con una proteína de unión a ubiquitina específica. El dominio UBA de p62 se une preferentemente a la cadena de poliubiquitina en K63 (Matsumoto *et al.*, 2011). Adicionalmente, por medio de su dominio PB1 se conjuga con las subunidades Rpn10 y Rpt1 de la partícula 19S del proteosoma y por medio de su dominio LIR se une a LC3B en el autofagosoma, participando en la vía autofágica (Cohen-Kaplan, *et al.*, 2016). La proteína p62 se une directamente también a las proteínas efectoras autofágicas LC3A y a las proteínas GABARAP y GABARAP-L1 y -2, a través de su dominio LIR. De esta manera, p62 selectivamente escolta a los sustratos a degradar hacia alguna de las dos vías. En la figura 11 se esquematiza cómo la proteína adaptadora p62, a través de las interacciones que establece con sus distintos dominios estructurales, se encuentra involucrada en ambas vías de degradación.

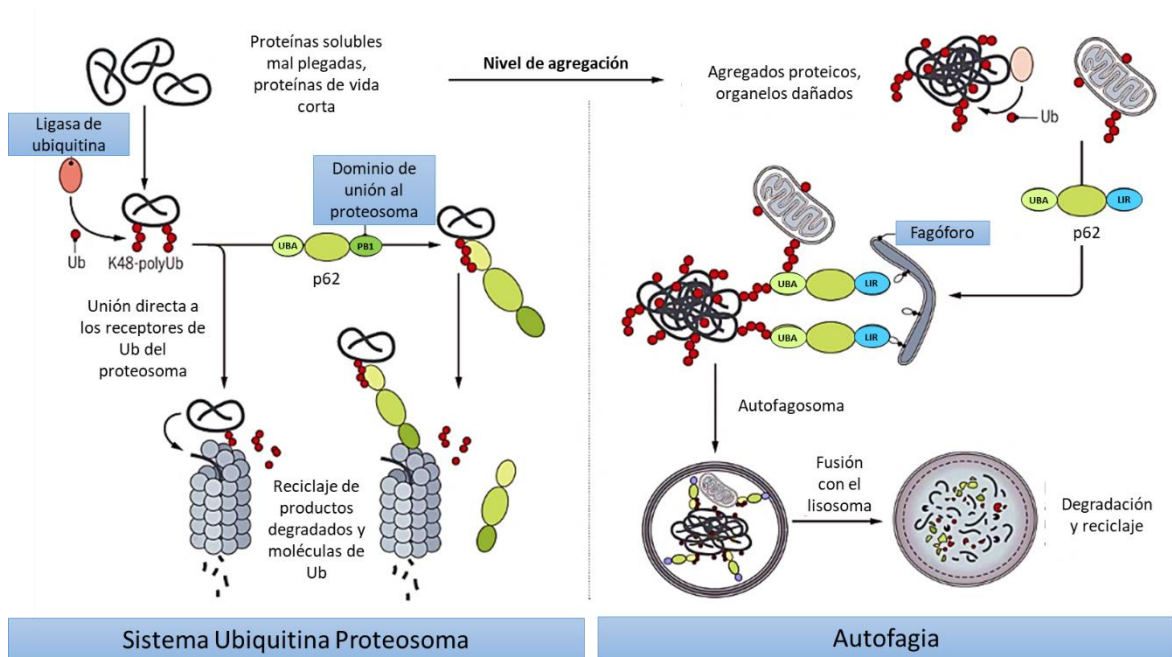


Figura. 11. Vías de degradación de la célula: Sistema Ubiquitina Proteosoma y Autofagia. La proteína adaptadora p62 se encuentra involucrada en ambas vías de degradación debido a las interacciones que establece con sus dominios estructurales. Su dominio UBA se une a residuos de ubiquitina, mientras que su dominio PB1 se une al proteosoma. Por otro lado, su dominio LIR le permite interactuar con LC3B-II en la membrana del autofagosoma. El nivel de agregación es un factor importante en la activación de una u otra vía de degradación. Tomada y modificada de Pohl y Dikic, 2019.

ANTECEDENTES

La autofagia se encuentra desregulada tanto en FPI como en NH. Se ha reportado que los pulmones de pacientes con FPI podrían presentar una disminución en la actividad autofágica, debido a que se observó que los niveles de la proteína p62 son más altos en FPI en comparación con el tejido pulmonar de sujetos control. También mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal se encontró acumulación de p62 en el epitelio de pacientes con FPI y colocalizó con la sonda *proteostat* que marca agregados proteicos (Patel *et al.*, 2012).

Por otro lado, recientemente, en nuestro grupo de investigación se planteó explorar si había expresión de marcadores de la vía de la autofagia en el pulmón de pacientes con NH (Cabrera *et al.*, 2020). Por inmunohistoquímica, se encontró un incremento en la señal positiva en el pulmón de pacientes con NH tanto para LC3B como para p62, principalmente en macrófagos y en el epitelio cercano a zonas de fibrosis mientras que la señal en el pulmón de individuos control fue menos intensa, y se detectó sólo en algunos macrófagos, en epitelio bronquial. El patrón de tinción positiva tanto de p62 como de LC3B fue citoplásmico, con una apariencia granular, como se muestra en la figura 12.

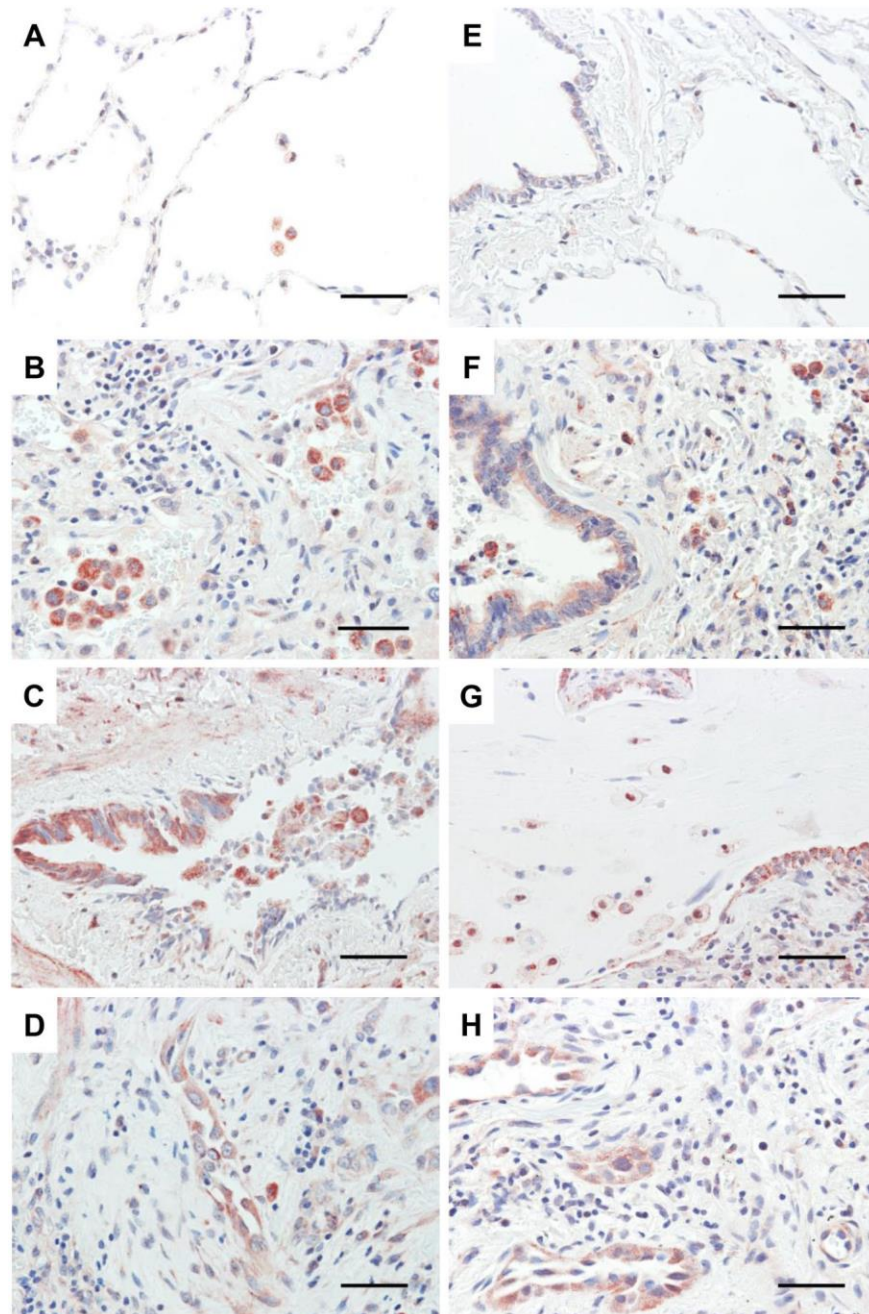


Figura 12. Inmunotinción con LC3B y p62 de tejido pulmonar de individuos control y pacientes con NH. Microfotografías representativas de la tinción inmunohistoquímica de LC3B en tejido pulmonar de pacientes control (A) y HP (B–D). Análisis inmunohistoquímico de p62 en secciones de tejido pulmonar de pacientes control (E) y HP (F–H). La señal positiva se observa en rojo. Las barras de escala en todas las imágenes representan 50 μm (Tomada de Cabrera *et al.*, 2020).

Un hallazgo relevante fue que también se identificó a p62 en el núcleo de algunas células epiteliales y en algunos macrófagos en el pulmón de los pacientes con NH (ver Fig. 12 G y

H). En el año 2010, Pankiv *et al.* describieron que p62 posee dos señales de localización nuclear (NLS), NLS1 y NLS2, siendo la segunda la que juega un papel preponderante al momento de la translocación al núcleo; su trabajo destaca que la fosforilación de la treonina 269 y la serina 272 incrementan la translocación de NLS2 al núcleo, mientras que la fosforilación en la serina 266, a la mitad de la secuencia de NLS2, tiene un efecto inhibitorio en la translocación (fig. 10). Dado que la autofagia ocurre exclusivamente en el citosol, el papel y la importancia biológica de p62 en el núcleo sigue siendo un área por estudiar. Estos antecedentes permitieron generar mi proyecto de maestría, dado que previamente no se ha reportado p62 nuclear en células del pulmón.

1. p62 y los efectos asociados a su localización nuclear.

Se ha considerado que p62 es una proteína citosólica y ha habido poca atención a los posibles roles nucleares de esta proteína. Los compartimentos nuclear y citosólico en las células eucariotas en interfase están separados por la membrana de dos capas de la envoltura nuclear. Debido al tamaño relativamente pequeño de los poros nucleares (~50 nm), sólo 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 denominados carioferinas. 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 y como mencioné previamente se han identificado dos señales de localización nuclear (NLS) en p62 una y una señal de exportación nuclear (NES). La distribución nucleocitosólica y el transporte de p62 están regulados por varios mecanismos que incluyen la auto interacción y la polimerización, la unión a ubiquitina y la fosforilación de residuos de serina y treonina en la proximidad de NLS2 (Pankiv *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2021).

Se ha descrito, a través del software String que genera redes de interacción *in silico* y que incluye datos experimentales, así como modelos predictivos que además de interacciones con los sustratos autofágicos LC3A, LC3B, ATG5, ATG12, con PINK1 en la mitofagia y con la

ligasa E3 del proteosoma, p62 interactúa con proteínas implicadas en la respuesta a estrés oxidante como Keap1 (Fig. 13). El nivel de expresión de p62 es fuertemente inducido a nivel de mRNA en respuesta a agentes oxidantes, por lo que es una proteína que puede reflejar condiciones de estrés citotóxico en las células. Los niveles intracelulares de p62 están regulados transcripcionalmente por el factor de transcripción Nrf2. En condiciones fisiológicas los factores de transcripción Keap1 y Nrf2 se encuentran unidos, sin embargo, en respuesta al estrés oxidante, p62, a través de su dominio KIR, se une a Keap1 para dirigirlo a la degradación, lo que provoca que se separe de Nrf2. Ahora Nrf2 puede translocarse al núcleo para la activación de genes relacionados con la respuesta antioxidante (Komatsu *et al.*, 2010) y a la región promotora de p62, lo que crea una retroalimentación positiva de p62 y Nrf2 (Jain *et al.*, 2010).

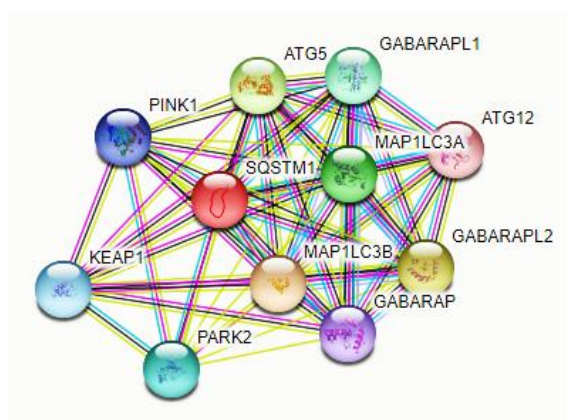


Figura. 13. Red de interacción establecida a partir de bases de datos y modelos computacionales que predicen las distintas asociaciones que p62 puede tener con otras proteínas. Tomada de: <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=11rpQMYLC8Xw>

La forma nuclear de p62 puede formar condensados con proteínas ubiquitinadas para degradar proteínas nucleares a través de la maquinaria del sistema ubiquitina-proteosoma nuclear (Fu *et al.*, 2021). Recientemente se identificó una secuencia de localización nucleolar (NoLS) entre las regiones PB1 y NLS, que provoca que p62 se desplace al nucléolo donde secuestra proteínas nucleares durante el estrés celular (Lobb *et al.*, 2021). Como mencioné previamente, el dominio UBA tiene sitios importantes de fosforilación S403 y S409 que, cuando se fosforilan, aumentan la afinidad de p62 por las cadenas de poliubiquitina (Matsumoto *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2015). Además de la autofagia, algunos dominios

provocan que p62 participe en eventos de señalización, por ejemplo, el dominio TB de p62 desencadena la poliubiquitinación de TRAF6, activando así la vía inflamatoria NF- κ B (Wooten *et al.*, 2005; Zotti *et al.*, 2014). En conjunto, los niveles de p62 y sus múltiples interacciones tienen ramificaciones importantes en el inicio del envejecimiento, donde las capacidades autofágicas y del sistema ubiquitina-proteosoma disminuyen progresivamente (Fig. 14).

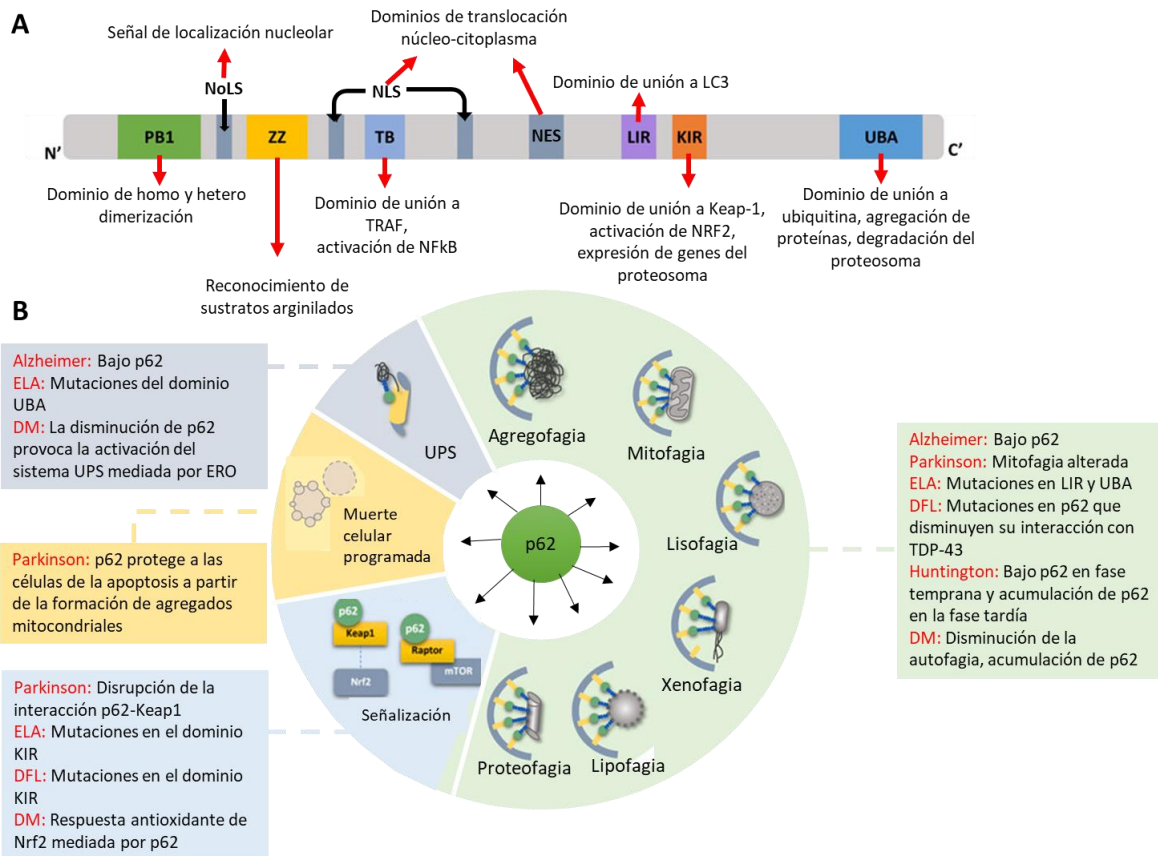


Figura 14. Naturaleza multifacética de los dominios de p62 y alteraciones asociadas con enfermedades degenerativas relacionadas con la edad. **A.** La proteína p62 consta de varios dominios que interactúan con distintas proteínas lo que conduce a la participación de p62 en diversas funciones. **B.** p62 desempeña funciones en diferentes formas de autofagia selectiva, en el sistema ubiquitina-proteosoma, en la muerte celular programada y en vías de señalización de inflamación y de oxidación. ELA: Esclerosis lateral amiotrófica, DM: degeneración macular asociada con la edad, DFL: degeneración frontotemporal lobar. Tomada y modificada de Kumar *et al.*, 2022.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No se ha descrito previamente la translocación nuclear de p62 en el pulmón de pacientes con FPI y NH. Dada la naturaleza multifacética de p62 por sus múltiples dominios y los efectos pleiotrópicos que puede tener, dado que participa en varios procesos celulares como son la autofagia, la apoptosis, en el sistema ubiquitina proteosoma, en la respuesta inflamatoria y en la respuesta oxidante, será relevante poder determinar cuál es la función de p62 en el epitelio pulmonar y si existen diferencias en su localización subcelular durante la patogénesis de estas enfermedades intersticiales. Por ello planteamos responder en este proyecto las siguientes preguntas específicas:

- a) *¿Existe un aumento en la translocación nuclear de p62 en NH y FPI en el epitelio pulmonar en comparación con individuos control?*
- b) *¿La inducción de daño citotóxico a células epiteliales promueve la translocación de p62 al núcleo?*
- c) *¿Cuáles podrían ser los posibles efectos de la translocación de p62 en las células epiteliales?*

HIPÓTESIS

Si existe un aumento en la translocación nuclear de p62 en el epitelio pulmonar dañado de pacientes con NH y FPI en comparación con el pulmón control, entonces la inducción de estrés provocada por distintos agentes citotóxicos en células epiteliales de pulmón promueve un incremento en la translocación nuclear de p62.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen diferencias en el nivel de translocación nuclear de p62 en el epitelio pulmonar de pacientes con NH y FPI en comparación con individuos sanos y analizar, *in vitro*, si la inducción de daño y estrés citotóxico en líneas epiteliales de pulmón resulta en un cambio en la localización núcleo-citoplasma de p62.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la localización celular y subcelular de la proteína p62 en tejido pulmonar de individuos control y de pacientes diagnosticados con NH y FPI. Determinar si existen diferencias en el nivel de translocación nuclear al comparar con el pulmón de sujetos control.
2. En líneas celulares de epitelio pulmonar, inducir estrés citotóxico con tres agentes: bleomicina, H₂O₂ y radiación UV, y determinar si ocurre translocación nuclear de p62 en comparación con la condición basal.
3. Caracterizar los efectos asociados a la posible relocalización subcelular de la proteína p62 en respuesta al estrés en células epiteliales alveolares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Fueron utilizadas biopsias de pacientes diagnosticados con FPI y NH y de individuos control incluidas en parafina, del biobanco del INER (Protocolo “*Evaluación del papel de la autofagia y el estrés de retículo endoplásmico en neumonitis por hipersensibilidad*” aprobado por el Comité de Investigación y Ética en Investigación, INER), para obtener cortes seriados de 5 μm . Se analizaron 3 pacientes diagnosticados con NH crónica, 3 pacientes con FPI y 1 individuo control. El diagnóstico se basó en criterios clínicos combinados, antecedentes de exposición a antígenos y pruebas de laboratorio de exposición (IgG sérica específica) en el caso de NH, linfocitosis por lavado bronco alveolar y tomografía computarizada de alta resolución (TACAR) de tórax compatible con NH o FPI, incluida la presencia de granulomas mal formados (para NH) y características histopatológicas compatibles con NH y con FPI.

Modelo murino de NH

Ratones macho de la cepa C57BL/6 tratados por vía intranasal con 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de *Saccharopolyspora rectivirgula* disuelta en solución salina, se utilizó un volumen total por dosis = 3250 μL distribuido en 3 días por semana, durante 3 semanas consecutivas. Los ratones control fueron tratados con solución salina siguiendo el mismo esquema de tratamiento. Los ratones tratados con *S. rectivirgula* categorizados con la NH “aguda” y “crónica” no corresponden a la neumonitis no fibrótica y fibrótica descrita en la enfermedad desarrollada en humanos, estos términos se utilizan para hacer referencia a los días en los que se sacrificaron los ratones después de la tercera semana de tratamiento, 1 día (fenotipo agudo) o 4 días (fenotipo crónico), respectivamente. No se observaron diferencias entre los ratones control de los periodos 1 día y 4 días.

Este modelo murino de NH fue desarrollado por el Dr. Luis Jiménez Álvarez, después de sacrificar a los ratones de este estudio, sus pulmones fueron fijados en paraformaldehído al 4% y posteriormente embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 5 μm de los bloques de pulmón incluidos en parafina, mismos que se montaron en portaobjetos de vidrio silanizados, dichos cortes fueron donados por el Dr. Jiménez Alvarez (Jiménez-Alvarez, *et al.*, 2010), y fueron utilizados para realizar la inmunohistoquímica de p62.

Modelo murino de bleomicina para inducir fibrosis pulmonar

Los ratones de la cepa C57BL6 fueron mantenidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y todos los procedimientos realizados con los animales fueron desarrollados con autorización del comité de ética de dicha institución.

La instilación intratraqueal de bleomicina produce fibrosis pulmonar de manera dosis dependiente, en la actualidad es el modelo más utilizado para estudiar la FPI; este fármaco fue administrado a ratones previamente anestesiados con una solución 1:10 de pentobarbital sódico, a los ratones se les introdujo un catéter desde la boca hasta la tráquea por el que se les administró una dosis única de 165 µg de bleomicina disuelta en 33 µL de agua inyectable. Los ratones fueron sacrificados a los 28 días post instilación (etapa de fibrosis) mediante la administración intraperitoneal de una solución de pentobarbital sódico 1:1. Antes de extraer los pulmones, se realizó una perfusión con 5 mL de solución salina en el ventrículo derecho del corazón para eliminar los eritrocitos. Se fijó el pulmón izquierdo con paraformaldehído al 4%.

Inmunohistoquímica

Para desarrollar la técnica de inmunohistoquímica se utilizaron cortes de pulmón embebidos en parafina. Para disolver la parafina, las laminillas fueron sumergidas en xilol absoluto durante 30 minutos. La rehidratación de los tejidos se llevó a cabo mediante lavados sucesivos con etanol absoluto, etanol al 80%, etanol al 50%, agua desionizada estéril y PBS 1X, por 5 minutos cada uno. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con una dilución de H₂O₂ al 3% en metanol absoluto durante 30 minutos. Las laminillas fueron lavadas dos veces con PBS 1X. Para la revelación del antígeno, las laminillas se colocaron en buffer de citratos 10 mM, pH 6, y se calentaron en el horno de microondas en dos ciclos. El bloqueo de los tejidos se realizó mediante la colocación de solución bloqueadora a 1X (Universal Blocking Reagent 10x, BioGenex) en los tejidos durante 10 minutos y se sustituyó por una solución de suero fetal bovino durante 30 min (SFB 1:100). Los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a una temperatura de 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-p62 (Santa Cruz Biotechnology, sc-28359), anti-p62 (Sigma-Aldrich, P0067), anti-p62 (BD, Biosciences, 610833). Al día siguiente las laminillas se lavaron dos veces con PBS-T 0.05%.

Los tejidos se incubaron con antiinmunoglobulinas biotiniladas para anticuerpos anti-ratón y anti-conejo (Super Sensitive Multi-link, BioGenex, 94538) seguido de estreptavidina peroxidasa conjugada (BioGenex, HK330-5K) y se aplicó el crómogeno 3-amino-9-etil-carbazol (BioGenex, HK092-5K). La contratincción se realizó con hematoxilina y solución de bicarbonato de sodio. Por último, las laminillas se colocaron en medio de montaje Crystal Mount.

Para la evaluación semicuantitativa, se seleccionó aleatoriamente un campo de 3 casos de NH, un campo de 2 casos de FPI y un campo de 2 controles, todos con aumento 40x y el porcentaje de células marcadas se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de células positivas} = \frac{\text{Número de células positivas}}{\text{Número total de células}} * 100$$

Inmunofluorescencia en tejidos

Se utilizaron cortes de pulmón embebidos en parafina y se realizó el mismo procedimiento descrito para la técnica de inmunohistoquímica hasta la etapa de bloqueo de los tejidos que se realizó mediante la colocación de solución bloqueadora 1X (Universal Blocking Reagent 10X, BioGenex) en los tejidos durante 10 min, posteriormente se bloqueó y permeabilizó con una solución de BSA al 2% con tritón al 0.1% durante 45 min. Los tejidos se incubaron con durante toda la noche a una temperatura de 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-p62 (Sigma-Aldrich, P0067) y SP-C (5E6A9): sc-293169 (Santa Cruz Biologicals). Al día siguiente las laminillas se lavaron tres veces con PBS-T 0.05%.

Los tejidos se incubaron con una mezcla de los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 546 anti-mouse y Alexa Fluor 647 anti-rabbit durante 2h. Se realizaron tres lavados con PBS-T 0.05%. Los núcleos se contratiñeron con Hoechst 1:6000 diluido en PBS 1X durante 10 min. Por último, las laminillas se colocaron en medio de montaje FluorMount.

Cultivo de células epiteliales

La línea de células epiteliales de pulmón de ratón MLE-12 se adquirió de American Type Culture Collection (ATCC, CRL2110). Se cultivaron con medio HITES (F-12/DMEM), suplementado con 0.01% de hidrocortisona, 1% de insulina-transferrina-selenito sódico,

0.01% de β -estradiol, 100 unidades/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 1% de L-glutamina, 1% de HEPES, 0.01% de β -estradiol y suero bovino fetal al 2%.

La línea de células epiteliales de pulmón de humano A549 se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC, CCL-185). Las células A549 se cultivaron con medio DMEM suplementado con 0.01% de β -estradiol, 100 unidades/mL de penicilina y suero bovino fetal al 10%.

Las células se llevaron a confluencia y se estimularon con 10 y 100 mU de bleomicina por 3h, posteriormente se retiró el estímulo y se dejaron en medio con suero para completar las 24h. La actividad de la bleomicina varía dependiendo la marca y el lote. El cálculo en miliunidades (mU) se realizó para la bleomicina de marca Sigma Aldrich con número de catálogo B8416 y se consideró una actividad de 1.5 U/mg, entonces 10 mU corresponden a una concentración de 4.6 μ M como estímulo inicial en células MLE12 y 100 mU corresponde a una concentración de 46.3 μ M. De manera separada, las células se llevaron a confluencia y se estimularon con peróxido de hidrógeno a distintas concentraciones: 50, 100 y 250 μ M por 3h, posteriormente se retiró el estímulo y se dejaron en medio con suero para completar las 24h. Otro experimento consistió en llevar las células a confluencia y estimularlas con rapamicina en una concentración de 10 nM por 3h, posteriormente se retiró el estímulo y se dejaron en medio con suero para completar las 24h.

Para las curvas dosis respuesta para inmunofluorescencia se sembraron 35,000 células por pozo en placas de 24 pozos, se llevaron a confluencia y al tercer día se sincronizaron durante 24h con medio sin suero. Transcurrido este tiempo, se agregó el estímulo disuelto en medio sin suero. La línea de células bronquioalveolares humanas HBE4-E6/E7 se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC, CRL2078). Las células se cultivaron con medio para queratinocitos, adicionado con 0.05 mg/mL de extracto pituitario bovino, 5 ng/mL de la proteína recombinante del factor de crecimiento epidermal humano, 10 ng/mL de toxina del cólera y suero fetal bovino al 10%. Las células se llevaron al 80% de confluencia en cajas de cultivo T75.

Las células HBE4-E6/E7 se sincronizaron durante 24h con medio sin suero antes de aplicar el estímulo. Transcurrido el tiempo, se agregó 20 μ g/mL de bleomicina (Cayman, No. 13877) y se esperaron 30min, posteriormente, se retiró el estímulo y se agregó leptomicina B 10 nM

(Santa Cruz Biotechnology, sc-358688) y se dejaron transcurrir otros 30min. Finalmente, se retiró el medio con leptomicina B, se hicieron dos lavados rápidos con PBS 1X y se despegaron las células con tripsina 1X.

Todas las células se cultivaron en una incubadora de CO₂ (5% CO₂–95% aire) a 37 °C.

Irradiación con luz UV

Se sembraron 800,000 células en una caja de cultivo p60 por cada condición a evaluar, cuando alcanzaron entre el 80 y el 90 % de confluencia, se irradiaron durante diferentes periodos de tiempo dentro del equipo Ultraviolet Crosslinker modelo CL 1000 que genera luz UV de tipo C (254 nm) y cuya intensidad energética es modulable. Transcurrido el tiempo de irradiación, se tomaron micrografías en el microscopio invertido y se procedió a la extracción de DNA con Trizol como lo indica el proveedor o se fijaron las células para inmunofluorescencia. El DNA procedente de la extracción con Trizol se corrió en un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TAE para evaluar la presencia de fragmentación.

Extracción de proteínas

Se utilizó el kit NE-PER (Thermo Scientific, 78835) para la extracción de proteínas de las fracciones citoplasmática y nuclear.

La pastilla celular proveniente de la caja de cultivo se resuspendió en 1 mL de PBS 1X estéril en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 min a 4 °C. Se retiró completamente el PBS 1X y se resuspendió en CER1 con inhibidores de proteasas. Posteriormente se agitó en vortex por 15 s, se incubó en hielo durante 10 min y se añadió CERII. Se agitó en vortex durante 5 s y se incubó en hielo por 1 min. Se agitó 5 s y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante con la fracción citoplasmática a un tubo limpio pre-enfriado y se almacenó a -80 °C hasta la posterior cuantificación de proteínas de esta fracción. Por otro lado, se resuspendió la fracción insoluble en NER y se hicieron 8 ciclos de agitación vorticial 15 s e incubación en hielo 5 min hasta completar 40 min. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante con la fracción nuclear a un tubo limpio pre-enfriado y se almacenó a -80 °C hasta la posterior cuantificación de proteínas de esta fracción.

Inmunoblot

Se determinó la concentración de proteínas de los extractos celulares con el ensayo de ácido biocinconínico, kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), por duplicado. Se agregaron 75 μ L de la mezcla de BCA en los pozos de una microplaca de 96 pozos. Para la curva estándar se utilizaron concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (1, 2, 4, 6, 8, 10 y 20 μ g). Se incubaron las muestras 30 min a 37 °C, posteriormente se dejaron enfriar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 562 nm con el espectrofotómetro Sinergy.

Después de ajustar la proteína del fraccionamiento celular a 3 μ g y las proteínas totales a 3.7 μ g, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8, 10 y 15%. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de polivinildifluoruro (PVDF, Millipore, IPV H00010) y se bloquearon en una solución de leche (Blotting Grade Blocker, Bio-Rad) al 3% diluida en TBS-T 1x por una hora a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-p62 (Santa Cruz Biotechnology, sc-28359), anti-p62 (Sigma-Aldrich, P0067), anti-p62 (BD, Biosciences, 610833), anti-lámina A/C (Invitrogen, ARC5001-08-01) y β -actina (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778), todos en una dilución 1:1000. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario diluido en TBS-T 0.05% suplementado con leche al 3%. Después de esta incubación, se hicieron 3 lavados de 10 min. cada uno con buffer TBS-T al 0.05%.

Finalmente, la reacción antígeno-anticuerpo fue detectada con luminol y peróxido de hidrógeno como sustrato usando el reactivo Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate y la quimioluminiscencia fue detectada usando el equipo Chemidoc (Bio-Rad).

Inmunofluorescencia en células epiteliales en cultivo.

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos, se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 min. Para las células en las que se observó Lysotracker Red DND-99 (Molecular Probes L7528), las células se incubaron primero durante 30 min con la sonda diluida 1:2000 en medio sin suero y posteriormente se fijaron. Se permeabilizó y bloqueó al mismo tiempo con Tritón x-100 (Research Organics, Cleveland, OH, USA) y FBS al 1%. Se incubaron durante toda la noche a -4 °C con el anticuerpo primario. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-p62 (Santa Cruz Biotechnology, sc-28359), anti-lamina A/C (Invitrogen

MA5-35284), anti-p53 (Novus Biological NBP1-00969), anti- γ H2AX (Abcam ab26350). Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-T 0.05%. Posteriormente, se incubó con anticuerpo secundario durante 1h a temperatura ambiente protegido de la luz. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: Donkey anti-Mouse IgG 488 (Invitrogen A-21202), Donkey anti-Rabbit IgG 546 (Invitrogen A-11035), Donkey anti-Rabbit IgG 488 (Invitrogen A21206). Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-T al 0.05%. Los núcleos se contratiñeron con Hoechst durante 10 min (Thermo). Las muestras se montaron con Fluoromount (Sigma-Aldrich) y se observaron en el microscopio confocal. La cuantificación de señal positiva se realizó con el software ImageJ (NIH). El porcentaje de núcleos positivos para cada anticuerpo se obtuvo mediante la fórmula

$$\% \text{ de núcleos positivos} = \frac{\text{Número de núcleos positivos}}{\text{Número total de células}} * 100$$

Estadística

La cuantificación de células y núcleos positivos se hizo a partir de micrografías tomadas con el software NIS elements, la cuantificación se realizó con el software Image J. Se utilizó Rstudio para los análisis estadísticos de normalidad de Shapiro-Wilk, homogeneidad de varianzas de Levene, prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y prueba *post hoc* de Conover. Se consideraron como significativos los valores p -value < 0.05. Se utilizó la paquetería *ggplot2* y *gplyr* de Rstudio para la visualización de los datos.

RESULTADOS

En primer lugar, se realizó la evaluación de la localización de p62 en el tejido de pacientes con dos EPID, FPI y NH, en comparación con tejidos de individuos control. Con el objetivo de corroborar que la señal positiva en la reacción de inmunohistoquímica corresponde a la interacción específica del epítipo de la molécula diana (p62) y el paratopo del anticuerpo primario, las laminillas de pulmón de pacientes diagnosticados con NH, FPI y controles, fueron incubadas sin anticuerpo primario, posteriormente se incubaron anti-inmunoglobulinas biotiniladas para anticuerpos anti-ratón y anti-conejo, para descartar la posibilidad de interacciones inespecíficas. Los tejidos destinados a control negativo fueron sometidos a los mismos tratamientos durante todo el protocolo de IHC, para descartar la unión de los anticuerpos utilizados de forma no específica a otros componentes celulares. Como se muestra en la fig. 15, no se observó señal positiva (o tinción en color rojo), ni siquiera tenue, en ningún tipo celular, lo que indica que la interacción con el antígeno p62 es específica y no hay señal cromogénica inespecífica por asociación del anticuerpo secundario.

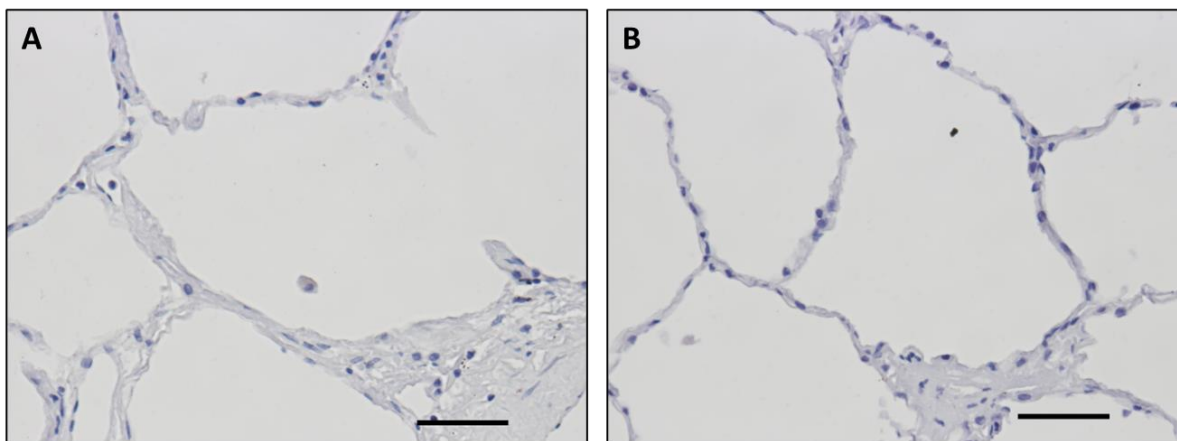


Figura 15. Control negativo de tinción de p62. Las imágenes se tomaron con un aumento de 40x. Barra de referencia de 50 μ m.

Imunolocalización de p62 en pulmón

Pulmón control

Debido a que existe una limitación para obtener biopsias de pulmón de individuos sanos o control, en este trabajo y en los análisis posteriores solo se consideró un caso control que se seccionó en tres áreas diferentes y posteriormente se hizo el conteo de células para poder

hacer la comparación con tres áreas distintas de tres individuos diferentes diagnosticados con FPI y NH (Fig. 16, tabla 1). Se observó que las células epiteliales alveolares de individuos control presentan una señal positiva tenue en el citoplasma para p62, sin embargo, las células epiteliales con núcleos positivos fueron muy escasas (1.109 ± 1.07) (Fig. 16).

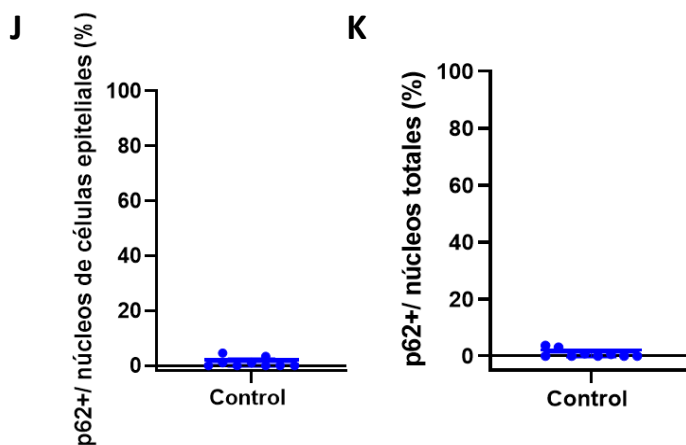
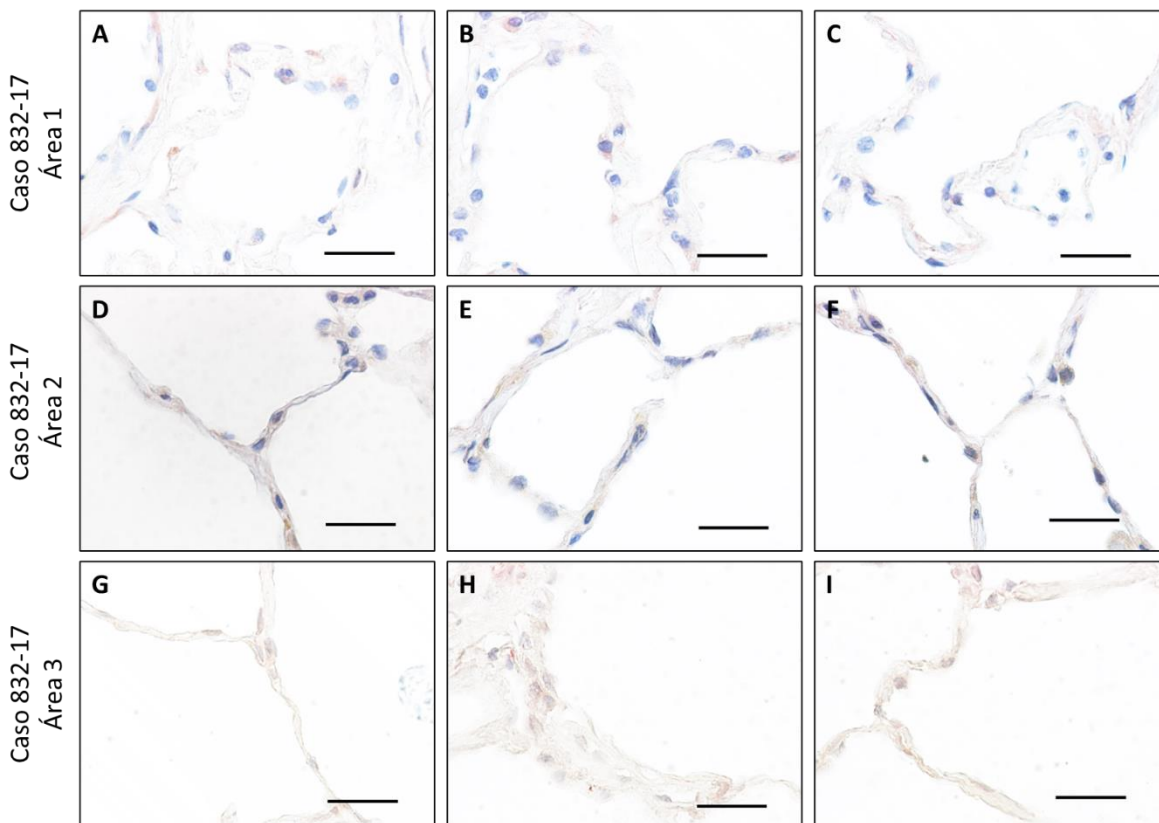


Figura 16. Inmunolocalización de p62 en pulmón control. **A-I.** Micrografías de los distintos campos evaluados. **J.** Porcentaje de células con p62 nuclear en relación con el total de células epiteliales positivas. **K.** Porcentaje de células con p62 nuclear en relación con los núcleos totales en el campo. Campos cuantificados n=9. Los datos representan la media +/- desviación estándar y cada campo está representado como un punto. Las imágenes se tomaron con un aumento de 100x. Barra de referencia de 25 μ m.

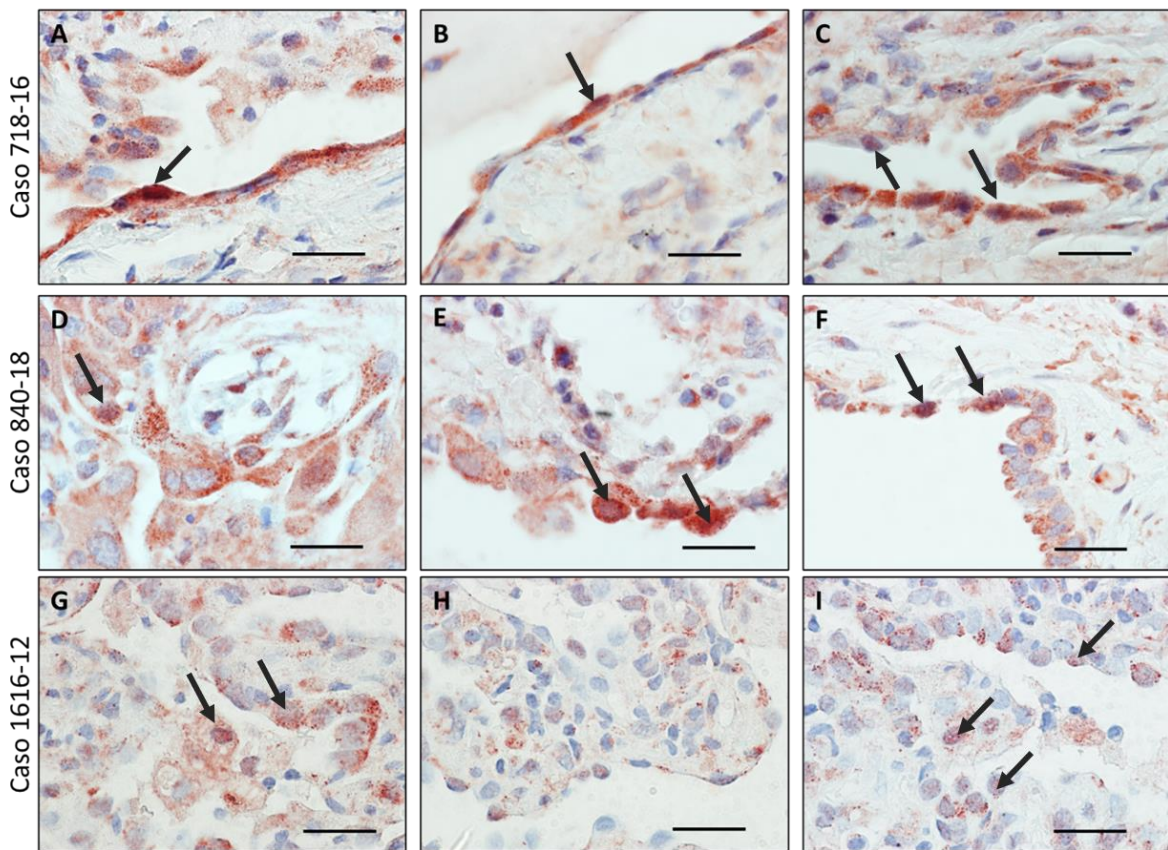
Pulmón de pacientes diagnosticados con FPI

En FPI, se observó señal positiva para p62 principalmente en el citoplasma de las células epiteliales y también en células inflamatorias como macrófagos y en algunas células intersticiales (fig. 17 A, D y E); sin embargo, en algunas células epiteliales se pudo identificar señal nuclear (Fig. 17 A-I). Al contar el número de núcleos totales y hacer la relación con los núcleos positivos de p62, observamos que alrededor del **8.66%** de las células presentó señal nuclear de p62 y el **37%** de las células epiteliales presentó localización nuclear (fig. 17 J y K). Dado que en estos pacientes se pierde la arquitectura normal del pulmón y se presenta un patrón histológico de neumonía intersticial usual, en algunas zonas se aprecia una mayor celularidad, en donde la luz alveolar se ha perdido casi por completo (Fig. 17 D). Observamos que hay un aumento significativo en el número de células con localización de p62 nuclear en los tejidos de FPI en comparación con el tejido control.

3 casos de FPI. Los datos representan la media +/- desviación estándar y cada campo está representado como un punto. Las imágenes se tomaron con un aumento de 100x. Barra de referencia de 25 μ m.

Pulmón de pacientes diagnosticados con NH

En los pulmones de pacientes con NH también se presenta un patrón de neumonía intersticial usual, así como focos fibróticos e infiltración de células inflamatorias en el espacio alveolar. Asimismo, la señal para p62 se presentó mayormente en el citoplasma de células epiteliales y macrófagos. Alrededor del 8% de las células epiteliales presentaron señal nuclear positiva para p62 (Fig. 18 K).



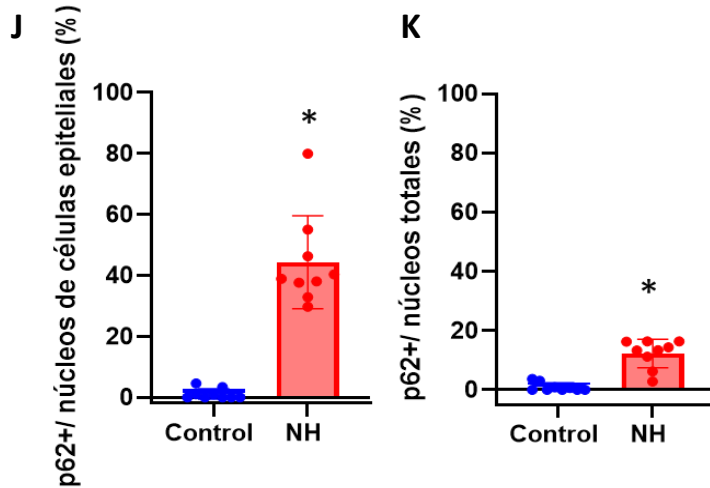


Figura 18. Inmunolocalización de pacientes con NH. **A-I.** Micrografías de los campos evaluados. Las flechas señalan las células que presentan p62 nuclear. **J.** Porcentaje de p62 nuclear con relación al total de células epiteliales positivas en individuos control vs NH. **K.** Porcentaje de p62 nuclear con relación a los núcleos totales en el control vs NH. Campos cuantificados n=9, 3 campos distintos de 3 casos de NH. Los datos representan la media +/- desviación estándar y cada campo está representado como un punto. Las imágenes se tomaron con un aumento de 100x. Barra de referencia de 25 μ m.

Aunque en este trabajo me enfoco en la presencia de p62 en el epitelio pulmonar, como mencioné previamente, los macrófagos también presentan un patrón granular citoplásmico y nuclear, como lo demostraron previamente Cabrera *et al.*, en 2020 (Fig. 19).

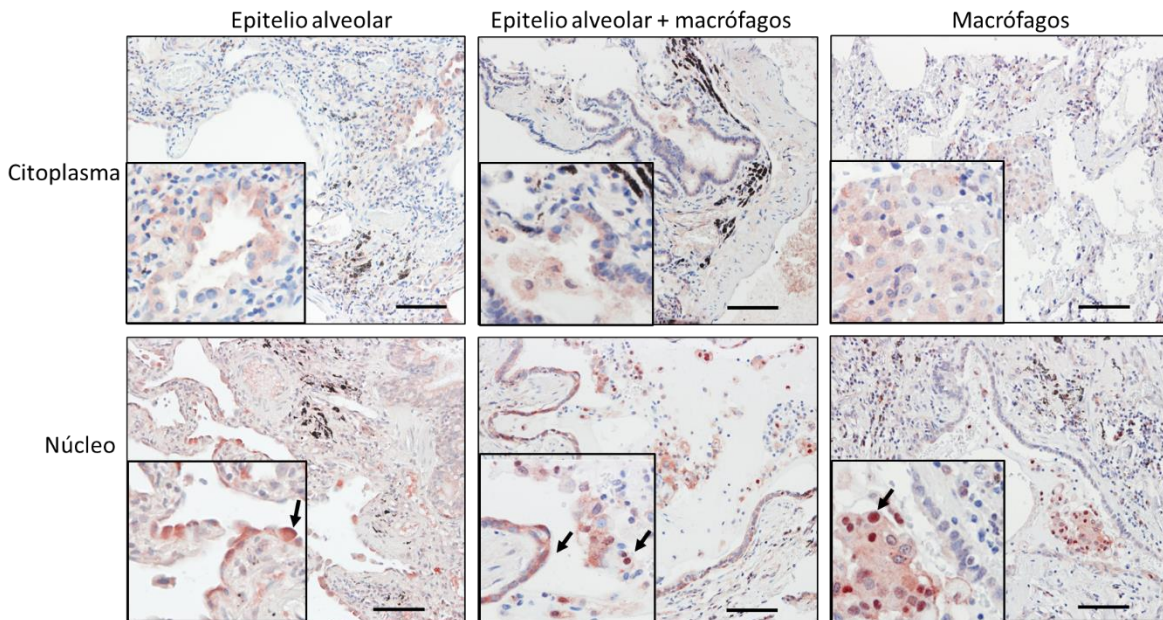


Figura 19. Patrón citoplásmico y nuclear de p62 en NH. Las flechas indican la localización nuclear de p62 en epitelio y macrófagos. Las imágenes se tomaron con un aumento de 20x. Barra de referencia de 100 μm .

Identificación de p62 utilizando anticuerpos dirigidos contra distintas regiones de la proteína

Adicionalmente, para corroborar que la señal nuclear de p62 no es un efecto inespecífico del anticuerpo con relación a la marca, o si es policlonal o monoclonal, se realizaron inmunohistoquímicas con 3 anticuerpos distintos. Se utilizaron tres anticuerpos de distintas casas comerciales. Los anticuerpos de BD Biosciences y Santa Cruz Biotechnology son monoclonales y están diseñados contra los aminoácidos de la secuencia de localización nuclear de p62, en la estructura primaria de la proteína comprende los residuos de aminoácidos 257-437 y 151-440, respectivamente. Mientras que el anticuerpo de Sigma-Aldrich es policlonal derivado de conejo. Observamos que la señal positiva identificada con el anticuerpo de Sigma-Aldrich es más intensa, probablemente debido a que reconoce distintos epítopes de p62, ya que es policlonal. Como se muestra en la figura 20, se observó localización nuclear de p62 en el epitelio de pacientes con NH y FPI con los tres tipos de anticuerpos anti-p62, por lo tanto, pudimos corroborar que es un fenómeno real y que está ocurriendo translocación en células epiteliales.

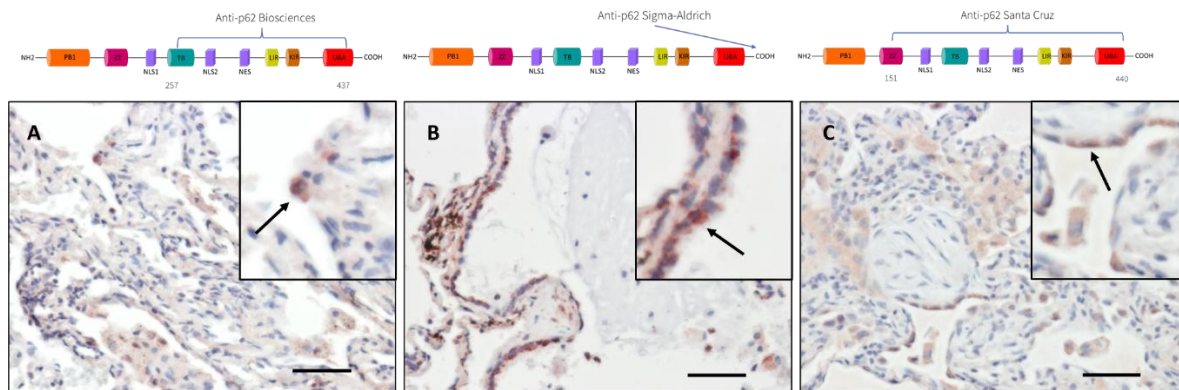


Figura 20. Anticuerpos para p62 de diferentes casas comerciales. **A.** p62 BDBiosciences No. Cat. 610833. **B.** p62 Sigma-Aldrich No. Cat. P0067. **C.** p62 Santa Cruz Biotechnology No. Cat. sc-28359. Arriba de cada micrografía se presenta un esquema de los dominios que reconoce cada anticuerpo. Las flechas indican núcleos positivos para p62. Las imágenes se tomaron con un aumento de 20x. Barra de referencia de 50 μm . Aumento digital.

p62 nuclear en células epiteliales de pacientes con EPIDs: FPI y NH.

Como describí previamente, el pulmón control presenta algunas células con señal positiva débil para p62 en su citoplasma y fueron pocas células las que mostraron tinción nuclear. Al realizar una comparación del pulmón control con el pulmón de pacientes diagnosticados con FPI y NH, se encontró que hay un aumento significativo en la celularidad, debido a la infiltración de células inflamatorias, mesenquimales y a la proliferación de células epiteliales aberrantes (fig. 21).

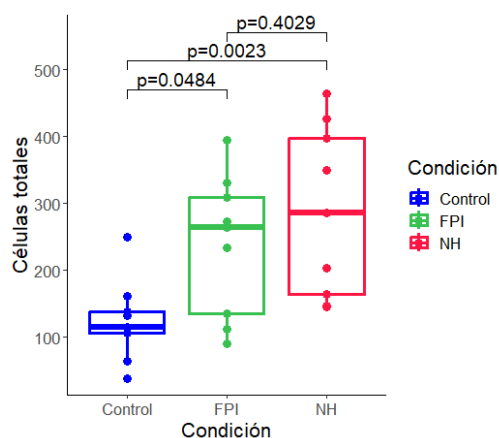


Fig. 21. Diferencias en el número total de células entre individuos control y tejidos de pacientes con FPI y NH. Células observadas con aumento de 40x por cada condición. Diferencias calculadas con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* de Conover, *p-value* aceptado $p < 0.05$.

Al tomar en cuenta sólo las células positivas para p62 nuclear en los tres diferentes casos y después de haber normalizado con respecto al número de células totales presentes por campo, se observó que existen diferencias significativas entre las patologías con respecto al control. No se encontraron diferencias entre NH y FPI (fig. 22).

Al hacer un análisis de normalidad de Shapiro-Wilk se determinó que el grupo control no se comportaba de manera normal, así como tampoco el grupo de FPI (tabla 2). Sin embargo, con la prueba de Levene que es menos sensible a las muestras que no se comportan de manera normal, se obtuvo que las varianzas sí son homocedásticas (tabla 3).

Tabla 2. *p-value* resultado de la prueba Shapiro-Wilk

Condición	<i>p-value</i>
NH	0.05068
FPI	0.01585
Control	0.001242

Tabla 3. *p-value* resultado de la prueba Levene

Grados de libertad	F-value	<i>p-value</i>
2	2.0496	0.1507

Tabla 4. Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis

Chi-cuadrada	Grados de libertad	<i>p-value</i>
15.484	2	0.0004341

Dado que no se cumple el criterio de normalidad, pero sí el de homocedasticidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para responder si existían diferencias entre los diferentes grupos, esta prueba es una alternativa no paramétrica a la ANOVA, pero, a diferencia de esta, compara las medianas de diferentes grupos en donde la hipótesis alternativa es que sí hay diferencias entre los diferentes grupos y no provienen de la misma población. Debido a que sí existen diferencias entre los grupos (tabla 4), se realizó la prueba *post hoc* de Conover que brinda los valores de significancia de la fig. 22 B.

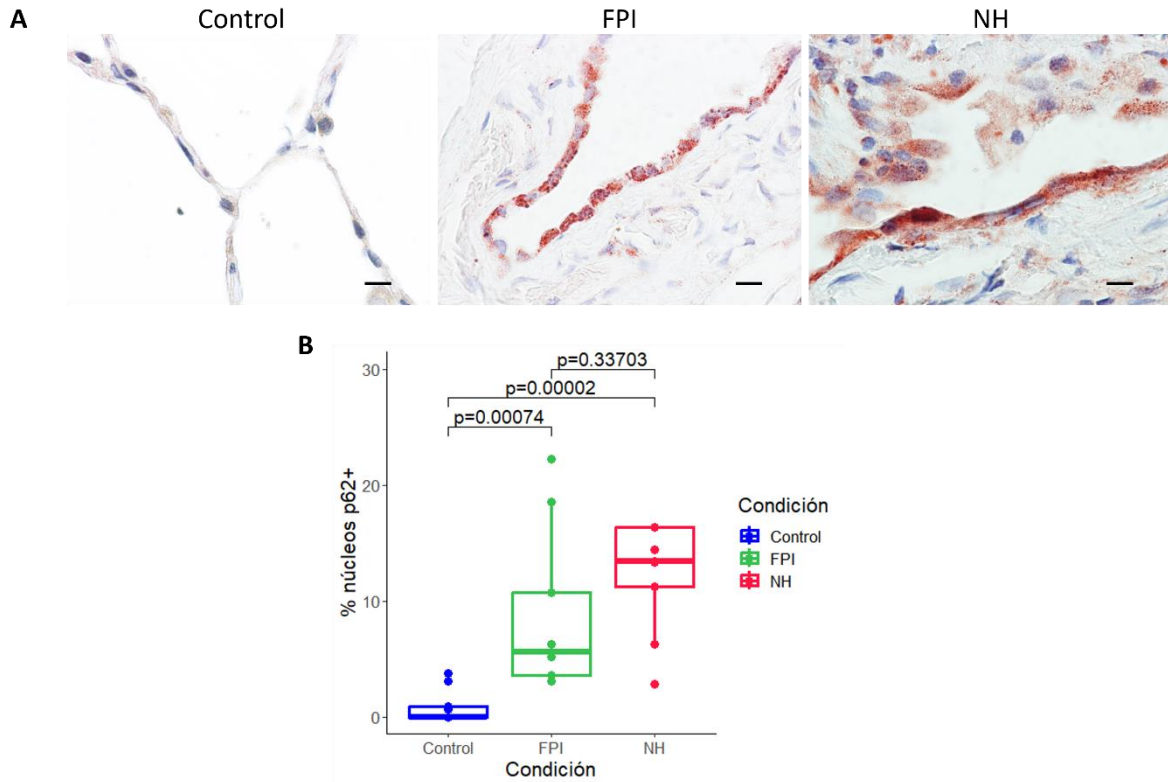


Figura 22. La proteína p62 presenta localización nuclear en células epiteliales de pacientes con EPIDs: FPI y NH. **A.** Señal nuclear positiva para p62 en control, FPI y NH. Las imágenes se tomaron con un aumento de 100x. Barra de referencia de 10 μ m **B.** Cuantificación de núcleos positivos para p62 en tres subáreas de tres casos de NH, tres casos de FPI y un caso control. Diferencias calculadas con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* de Conover, *p-value* aceptado $p < 0.05$.

Las células AEC II presentan localización nuclear de p62

Para validar mis resultados, consulté al patólogo, el Dr. Miguel Gaxiola, para que corroborar qué células presentaban tinción positiva de p62 en núcleo y él corroboró que las células con tinción positiva eran epiteliales, además de macrófagos como he descrito en las secciones previas. Aunado a esto, se hizo una colocalización por inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo dirigido contra p62 y otro contra la proteína SPC (Por sus siglas en inglés, Surfactant Protein C), que es uno de los principales componentes del surfactante, un tensioactivo pulmonar compuesto por un 90% de lípidos y un 10% de proteínas, para

corroborar la tinción nuclear en epitelio. La proteína SPC se utiliza ampliamente como un biomarcador de las células AECII, ya que el surfactante es secretado exclusivamente por dichas células alveolares. Se observó la presencia de ambas marcas, p62 nuclear y SPC en algunas células del campo, tanto en FPI como en NH, lo que indica que la translocación nuclear de p62 ocurre en algunas células AECII, aunque no todas las células con p62 nuclear fueron positivas para SPC (fig. 23). Adicionalmente, el tejido de pacientes con NH presenta una mayor densidad de gránulos de p62 en comparación con FPI, así como mayor intensidad de señal fluorescente (rojo).

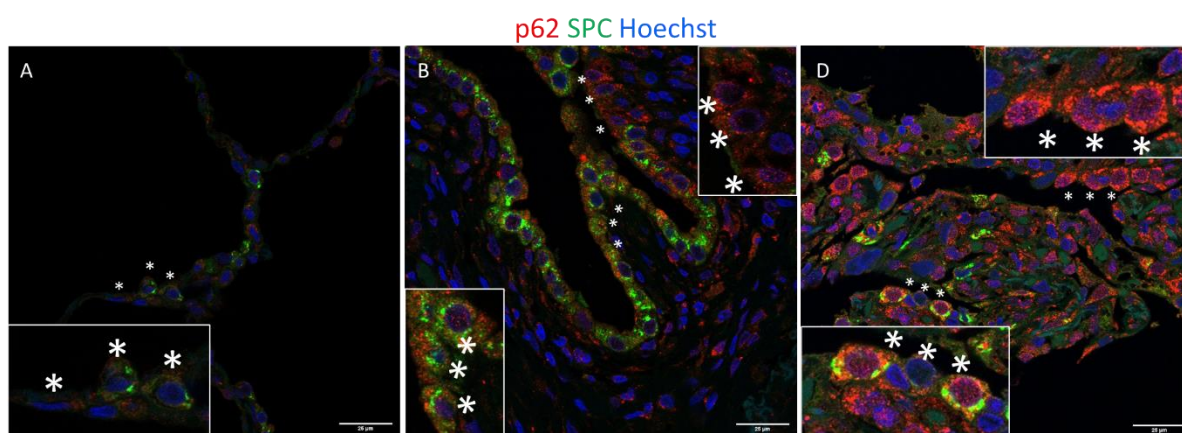


Fig. 23. Localización de p62 en el núcleo de células AECII en FPI y NH. Inmunofluorescencia para p62 (rojo) y SPC (verde) en tejidos **A.** Control. **B.** FPI y **C.** NH. Núcleos contrateñidos con Hoechst. Los asteriscos indican las zonas en donde se encuentra células con p62 nuclear. Aumento 63x y digital. Barra de referencia de 25 μm.

Para corroborar que la interacción de los anticuerpos primarios era específica contra los distintos epítopes y descartar que los anticuerpos secundarios fluorescentes se estuvieran uniendo de manera inespecífica, se incubó el tejido únicamente con los anticuerpos secundarios. Estas laminillas se procesaron de la misma manera y al mismo tiempo con los tejidos que sí fueron incubados con anticuerpos primarios. Como se observa en la fig. 24, no se identificó señal positiva por el anticuerpo secundario 647 (rojo) en el tejido (usado para detectar p62), aunque sí se observó ruido de fondo para la señal del anticuerpo secundario 546 (verde) (usado para detectar SPC); sin embargo, fue una señal muy débil.

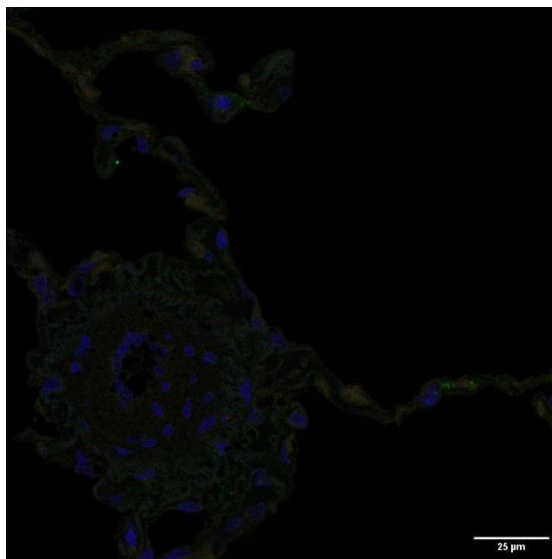


Fig. 24. Control negativo de la técnica. Núcleos contrateñidos con Hoechst (azul). Tejido incubado con anticuerpos secundarios 488 y 647. Aumento 63x. Barra de referencia de 25 μm .

Modelo *in vivo*

Pulmón de ratón del modelo de fibrosis inducida con bleomicina y neumonitis por hipersensibilidad (NH) inducida con *S. rectivirgula*

Para averiguar si los resultados en humano se presentan también en ratón, se evaluó la inmunolocalización de p62 en dos modelos murinos que llegan a desarrollar fibrosis pulmonar: el modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y el modelo de NH hipersensibilidad inducida por *S. rectivirgula*, contrastándolos con el pulmón de ratón control tratado con solución salina. Para este experimento se utilizaron 4 individuos del modelo de bleomicina, 2 individuos del modelo de NH y un caso control que se seccionó en 2 áreas aleatoriamente para amplificar el valor de *n*. Adicionalmente, se incluyó un tejido de pulmón de ratón del modelo de NH que se sometió a las mismas condiciones que las demás laminillas pero que no se incubó con el anticuerpo primario, al que se denominó control negativo de la técnica, porque permite discriminar la señal positiva en la reacción de inmunohistoquímica que corresponde a la interacción específica del epítipo de la molécula diana (p62) y el paratopo del anticuerpo primario.

Como se muestra en la fig. 25A, no se observó señal positiva (o tinción en color rojo), ni siquiera tenue, en ninguna célula, lo que indica que la interacción con el antígeno p62 es

específica y no hay señal cromogénica inespecífica por asociación del anticuerpo secundario. En el pulmón del ratón control se observa una arquitectura normal del parénquima pulmonar, se pueden observar espacios alveolares bien definidos y epitelio alveolar, así como epitelio bronquial estratificado (fig. 25B y C) y no se observa tinción positiva de p62.

En comparación con el ratón control, el epitelio bronquial de los ratones con NH presentó tinción positiva para p62, cuya localización se encuentra en el citoplasma y en algunas células de este epitelio se puede observar a p62 en el núcleo (fig. 25D y E). De manera similar, el epitelio bronquial de ratones del modelo de bleomicina también presenta tinción positiva para p62 (fig. 25F, G, H e I).

Los pulmones de los ratones de los dos modelos de daño presentaron cierto grado de fibrosis y destrucción del parénquima, sin embargo, la señal positiva de p62 fue más evidente en el epitelio bronquial en ambos modelos, aunque dicho epitelio no se encontrara adyacente a zonas de mayor celularidad, mayor presencia de fibrosis o mayor destrucción del parénquima pulmonar.

Se realizó la cuantificación de células del epitelio que presentaban localización nuclear de p62 y se encontró que, de manera general, en los individuos del modelo de bleomicina la proporción de células del epitelio bronquial con p62 nuclear se encuentra en un rango del 14-36 % y que dicha proporción es significativa con respecto al individuo control y a los individuos del modelo de NH (fig. 25J).

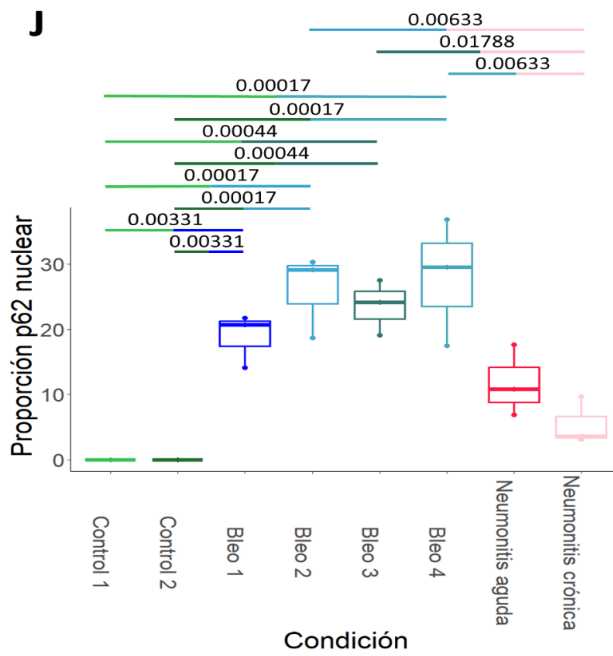
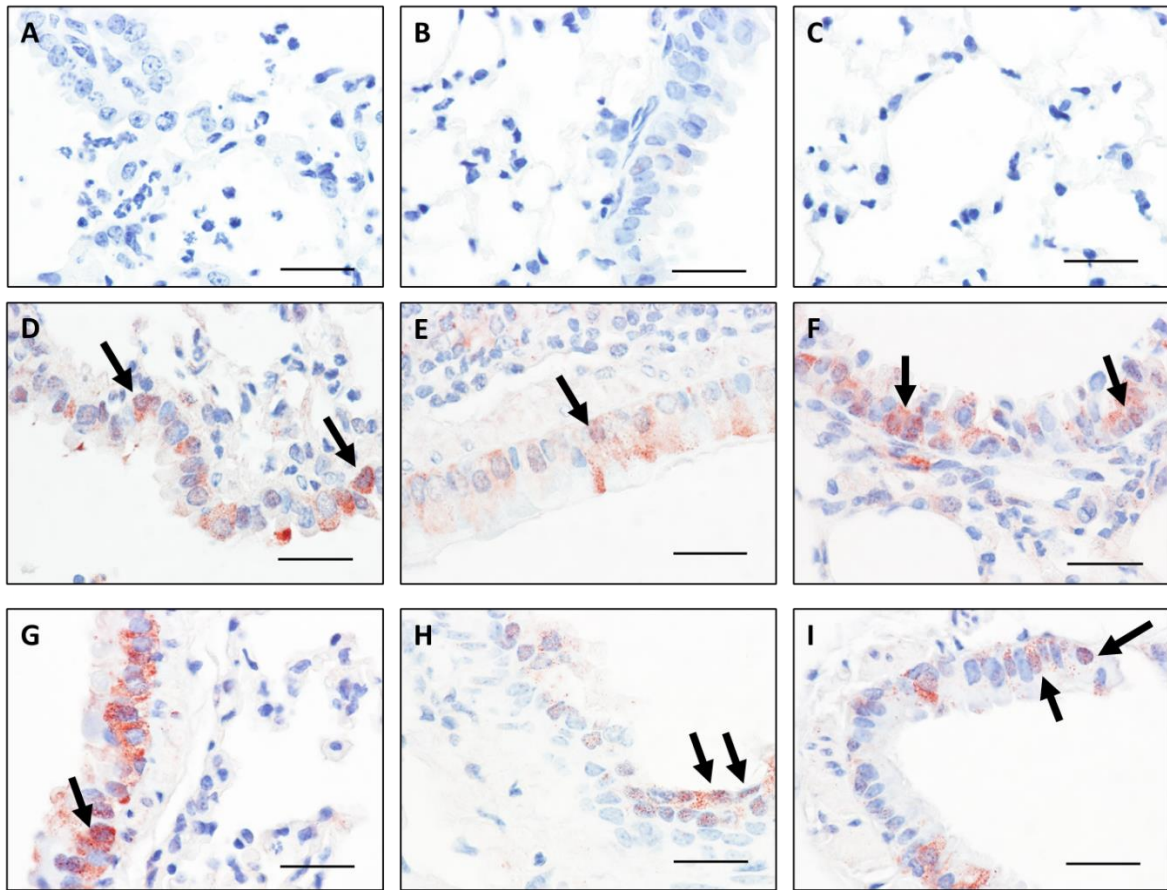


Figura 25. Inmunolocalización de p62 en tejido de pulmón de ratón. Imágenes representativas del **A.** Control negativo de la técnica. **B y C.** Individuo control. **D y E.** Modelo de NH. **F-I.** Modelo de

bleomicina. Las imágenes se tomaron con un aumento de 100x. Barra de referencia de 25 μm . Las flechas señalan las células que presentaron p62 nuclear. Cuantificación de las células que presentaron localización nuclear de p62. **J.** Comparación de p62 nuclear con relación al total de células epiteliales entre todos los grupos de ratones: Se cuantificaron 3 campos distintos de dos áreas distintas de un individuo control (B y C), 3 campos distintos de 2 individuos distintos del modelo de NH (D y E) y 3 campos distintos de 4 individuos distintos del modelo de bleomicina (F-I). Los datos representan la media \pm desviación estándar y cada campo está representado como un punto. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* de Conover para determinar las diferencias entre grupos, solamente se muestra los *p-value* significativos, $p < 0.05$.

Modelo *in vitro*

Inducción de daño y estrés citotóxico en líneas epiteliales de pulmón

Se ha observado la translocación nuclear de p62 en experimentos *in vitro* como un fenómeno asociado al DNA provocado por irradiación γ (Hewitt et al., 2016; Wang et al., 2016) o por el aumento de especies reactivas del oxígeno (Wang et al., 2019); por esta razón, se utilizó bleomicina y peróxido de hidrógeno para inducir estrés citotóxico en células epiteliales. Se cultivaron las líneas de células epiteliales bronquiales derivadas de pulmón humano HBE4 (*Células epiteliales bronquiales humanas inmortalizadas por los genes E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16 HBE4-E6/E7 [NBE4-E6/E7]j*) y A549 (*células epiteliales que fueron aisladas de carcinoma de pulmón*). También se utilizó la línea de células epiteliales de ratón MLE12 (*células epiteliales aisladas del pulmón de una ratona hembra de 5 meses de edad*).

Inducción de estrés en células epiteliales HBE4-E6/E7 por bleomicina y evaluación de la localización subcelular de p62

Se cultivaron células HBE4-E6/E7 a confluencia y se trataron con bleomicina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, un antibiótico antineoplásico que se utiliza en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, que provoca daño directo al DNA y además genera especies reactivas del oxígeno, induciendo muerte celular. Después de colocar el estímulo en el medio, se evaluó la respuesta en las células células HBE4-E6/E7 tras un tratamiento de 1h, ya que el fenómeno de translocación nuclear de p62 es un proceso dinámico que puede ocurrir en tiempos cortos (Pankiv *et al.*, 2010). Adicionalmente, para promover la retención de p62 en el núcleo tras agregar el

estímulo con bleomicina, se utilizó leptomicina B. La leptomicina B es un inhibidor de CRM1 (por sus siglas en inglés Chromosomal Region Maintenance 1). CRM1 es el principal receptor para la exportación nuclear de RNA y proteínas que contienen una señal de exportación nuclear (NES). Al inhibir la exportación nuclear, la leptomicina B puede provocar la acumulación nuclear de proteínas que se desplazan entre el citosol y el núcleo. Las células fueron tratadas con leptomicina B en una concentración de 10 nM por 30 min después de haber sido estimuladas con bleomicina, al paso de 1h, las células se lisaron y se realizó la extracción de proteínas por fraccionamiento subcelular, en dónde se separaron las fracciones citosólica y nuclear (fig. 26 E).

Como se muestra en las imágenes de contraste de fases, no observamos cambios morfológicos en las células HBE4-E6/E7 al comparar tratadas *vs* control, ni pérdida de células por apoptosis (fig. 26 A-D). Se determinó el nivel de p62 en las fracciones citosólica y nuclear, sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de p62 en relación con los distintos tratamientos (fig. 26 E).

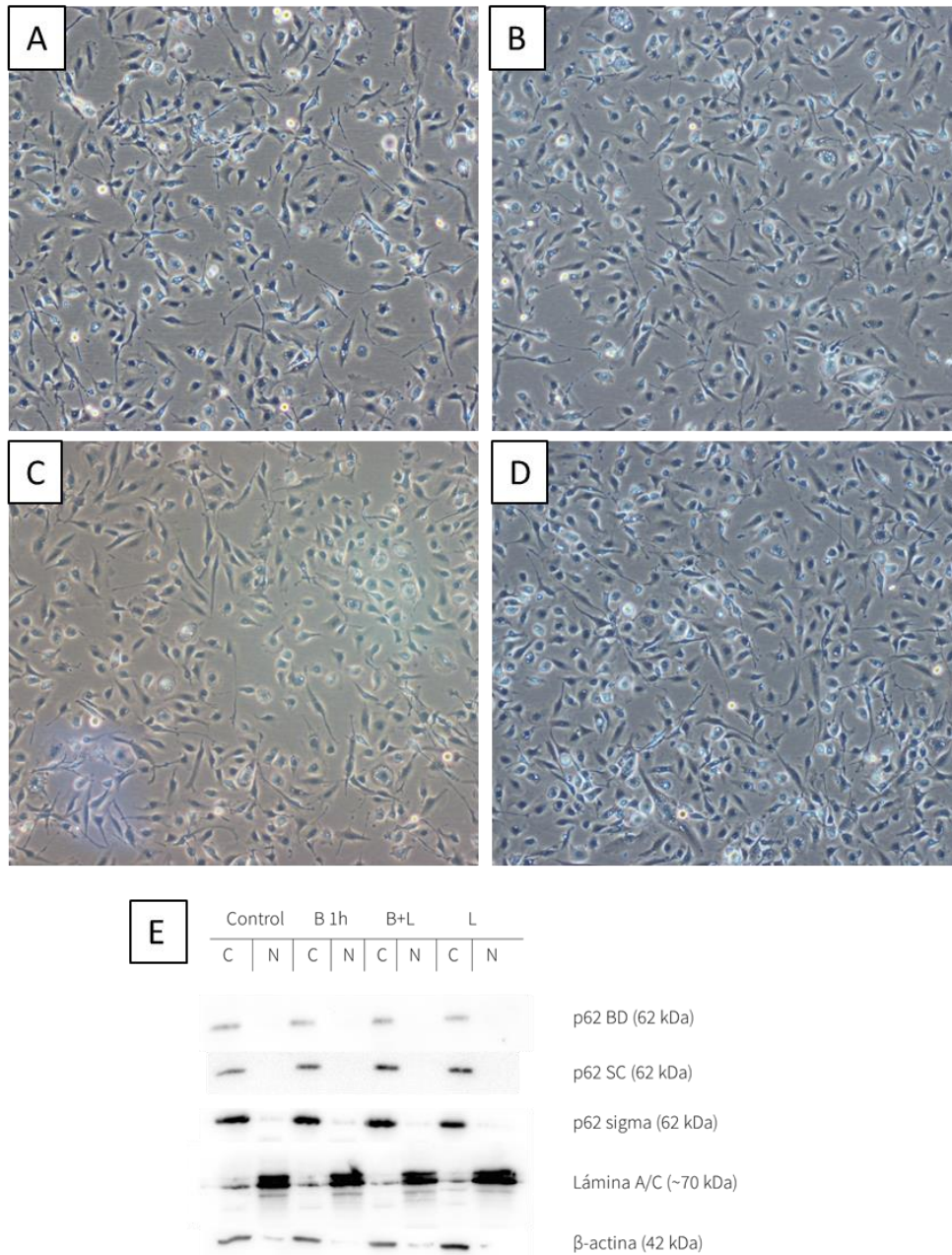


Fig. 26. Células HBE4-E6/E7 después de un estímulo con bleomicina en un tiempo corto. **A.** Control. **B.** Estímulo con bleomicina 20 μ g/mL durante 30 min. **C.** Estímulo con bleomicina durante 30 min seguido de leptomicina b durante 30 min. **D.** Leptomicina 10 nM durante 30 min. **E.** Inmunoblot de p62 en células HBE4-E6/E7 después de los estímulos. En las bandas del Western blot, se observan las diferentes condiciones a las que se expusieron las células, de izquierda a derecha: control, estímulo con bleomicina 20 μ g/mL durante 30 min, estímulo con bleomicina durante 30 min seguido de leptomicina b durante 30 min y leptomicina 10 nM durante 30 min. Se utilizaron distintos anticuerpos para p62 (BD: BD Biosciences, SC: Santa Cruz Biotechnology y Sigma: Sigma-Adrich).

Inducción de estrés en células epiteliales A549 por bleomicina y H₂O₂ y evaluación de localización subcelular de p62

Debido a que no se obtuvieron cambios en las células bronquiales con 20µg/mL de bleomicina y esta dosis pareció inocua, se decidió hacer una curva de dosis-respuesta (0-800 µM) en células alveolares A549 para evaluar la concentración inhibitoria (IC_{50} por sus siglas en inglés Inhibitory Concentration) de bleomicina, es decir, la concentración del estímulo que provoca la muerte de la mitad de la población celular y así poder captar las células efectivamente dañadas por dicho estímulo.

Se midió el porcentaje de células viables por medio de la conversión de la sal de tetrazolio a formazán, esta reacción se lleva a cabo por medio de enzimas en las células metabólicamente activas y es una reacción colorimétrica que puede ser detectada en un espectrofotómetro. Al considerar el número inicial de células que es igual para cada condición, se espera que, en después del tratamiento con el estímulo del estrés citotóxico, el porcentaje de viabilidad disminuya, lo que se verá reflejado en una menor conversión en formazán y una menor señal detectada por el espectrofotómetro.

Después de tratar las células A549 por 24h con las distintas concentraciones de bleomicina, el porcentaje de viabilidad no disminuyó más del 50%, incluso ni con 800 µM de bleomicina, a pesar de ser una concentración superior a la reportada para inducir daño en el DNA y apoptosis (Brar *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha descrito que el inhibidor de autofagia cloroquina (CQ), sensibiliza a las células incrementando el porcentaje de apoptosis (Hoffmann *et al.*, 2011); sin embargo, la adición de CQ 10 µM para inhibir la autofagia tampoco incrementó la sensibilidad a la apoptosis de las células A549 después de ser tratadas con bleomicina (fig. 27).

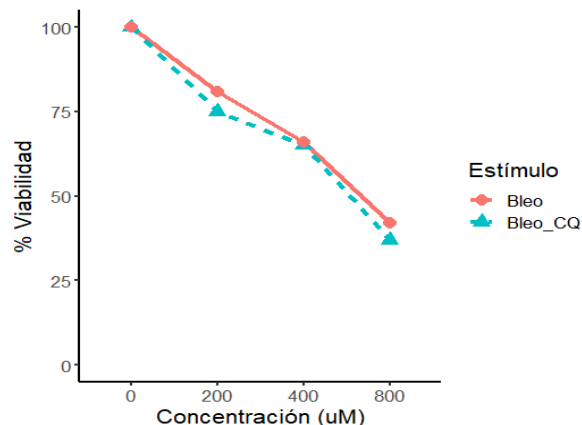


Fig. 27. Curva de IC₅₀ determinada por ensayo de viabilidad con el kit WST-1 en células A549. Se utilizaron concentraciones crecientes de bleomicina sola, o en combinación con CQ 10 μ M y se determinó la viabilidad después de 24h.

Para investigar la susceptibilidad de las células A549 frente al daño inducido por H₂O₂, realicé una curva dosis respuesta (0-800 μ M). En comparación con la bleomicina, la concentración de 800 μ M de H₂O₂ sí indujo una disminución en la viabilidad celular de alrededor del 60%, el resultado fue similar después de aplicar CQ 10 μ M, lo que sugiere que la CQ no modifica la susceptibilidad frente al daño inducido por peróxido de hidrógeno (fig. 28). Aunque en los puntos con concentración de 200 y 400 μ M hay un aumento en el porcentaje de viabilidad, estos resultados son reflejo de un experimento único, para descartar o validar dichos datos, se necesitan hacer más repeticiones del mismo experimento.

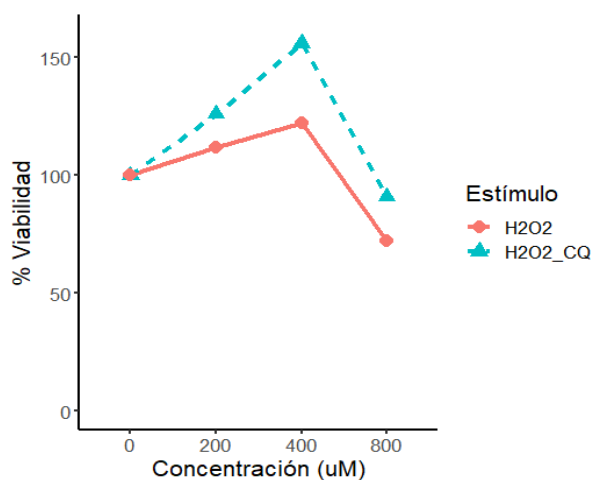


Figura 28. Curva de IC₅₀ determinada por ensayo de viabilidad con el kit WST-1 en células A549. Se utilizaron concentraciones crecientes de H₂O₂ solo, o en combinación con CQ 10 μM, y se determinó la viabilidad después de 24 h.

Inmunolocalización de p62 en respuesta al tratamiento con bleomicina en células epiteliales A549

Previamente, en experimentos realizados por Brar *et al.* (2012), se observó que concentraciones de bleomicina que van desde 100 μM y hasta 400 μM generan daño en el DNA a las 48h. Sin embargo, el fenómeno de translocación nuclear de p62 es un proceso dinámico que puede ocurrir en tiempos cortos (Pankiv *et al.*, 2010). Así que se evaluó la localización de p62 después del tratamiento con bleomicina con concentraciones de 100 μM hasta 400 μM, después de 1, 6 y 12h de aplicar el estímulo en células epiteliales de pulmón de la línea A549.

El análisis de las células A549 con luz transmitida en el microscopio, mostró que algunas células tenían un citoplasma reducido, característico de células en apoptosis, dichas células también eran las que presentaban una señal de p62 nuclear como se indica con flechas en la figura 29. El inicio de la apoptosis puede ser detectado por microscopía óptica debido a la reducción del soma celular y del compartimento nuclear, además de la condensación de la cromatina hacia la periferia de la membrana nuclear (Saraste y Pulkki, 2000). Estos hallazgos podrían sugerir que la translocación de p62 está asociada con el inicio de la apoptosis.

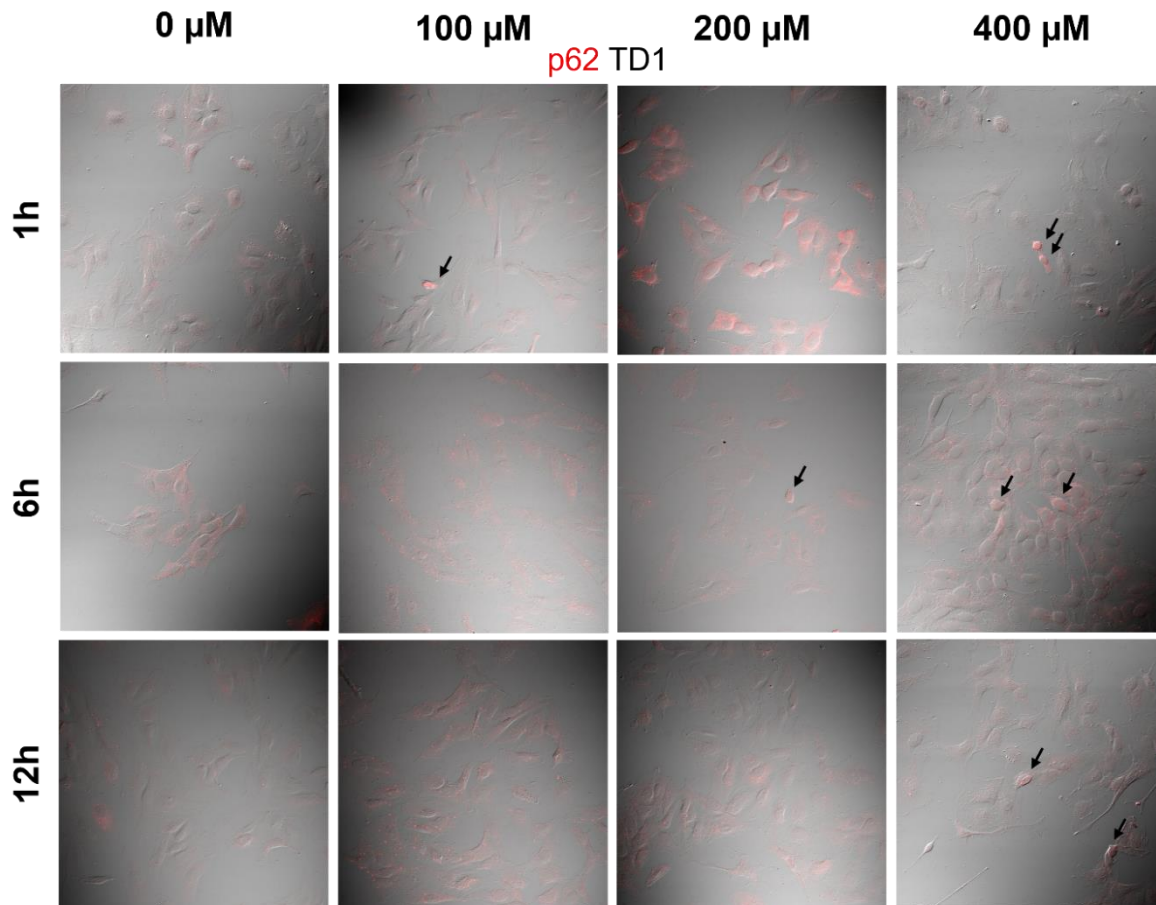


Figura 29. Inmunofluorescencia para p62 (rojo) con contraste de luz transmitida en condiciones basales y después de 1, 6 y 12h de aplicar bleomicina en concentraciones de 100, 200 y 400 μM en células A549. Las flechas señalan a las células con soma reducido y redondeado, que además presentan p62 nuclear. Aumento 40x

Lamina A/C es una proteína que se encuentra en la lámina nuclear de las células y se utiliza como un marcador nuclear o control positivo para teñir los núcleos de las células en combinación con p62, para así poder determinar el porcentaje de translocación nuclear de p62 en respuesta al tratamiento con bleomicina. Observamos señal fluorescente en verde correspondiente a lamina A/C en todos los núcleos de las células A549, sin embargo, solo observamos señal citoplásmica para p62 (en rojo) en algunas células tratadas con 200 μM de bleomicina, después de 1 hora de tratamiento. No logramos ver p62, incluso al duplicar la concentración de bleomicina. Tampoco detectamos p62 nuclear. Dado que p62 se expresa de forma basal y su expresión puede incrementar en respuesta al daño, podemos concluir que hubo un problema técnico en el desarrollo de la inmunofluorescencia y la colocalización, ya

que no se observó p62 ni siquiera en el citoplasma al aumentar la concentración de bleomicina y el tiempo de tratamiento (fig. 30).

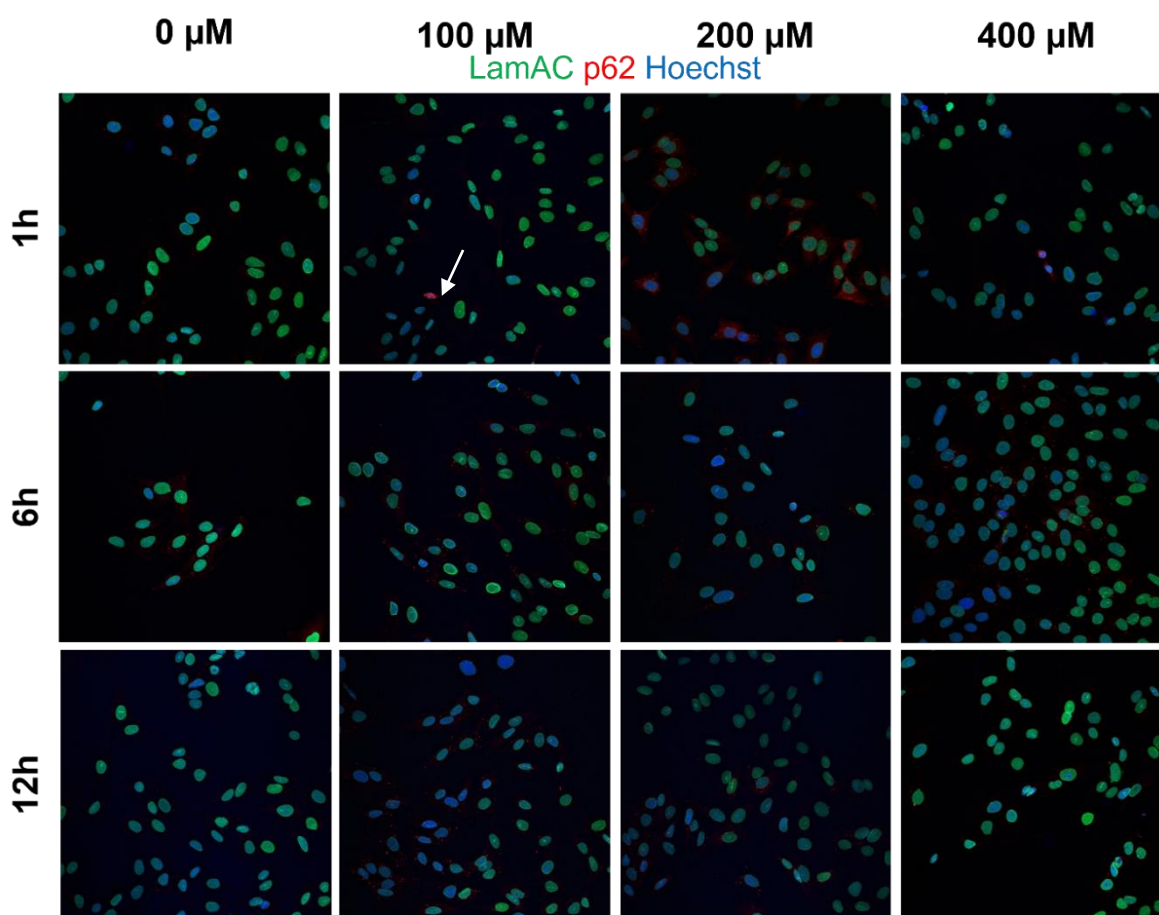


Figura. 30. Inmunofluorescencia para p62 (rojo), lamina A/C (verde) en condiciones basales y después de 1, 6 y 12h de aplicar bleomicina en concentraciones de 100, 200 y 400 μM en células A549. Núcleos contrateñidos con Hoechst. La flecha indica la única célula en la que se apreció p62 nuclear. Aumento 40x.

Identificación de marcas de daño al DNA (p53 y γH2AX) en respuesta al tratamiento con bleomicina en células epiteliales A549

H2AX es la variante X de la histona 2A y es fosforilada en respuesta al daño en el DNA (Fernández-Capetillo *et al.*, 2004), mientras que p53 es una proteína involucrada en la reparación del DNA (Vogelstein *et al.*, 2000) y tras la formación de rupturas en el DNA de doble cadena debido a estrés oxidante, estrés replicativo, actividad enzimática, exposición química o radiación ionizante, puede acumularse en el núcleo.

Se identificó p53 en el citoplasma de las células A549 control. En comparación con las células A549 control, observamos que hubo un incremento de p53 en el núcleo de algunas células en respuesta a bleomicina en las distintas concentraciones utilizadas. La señal fluorescente en rojo para p62 tuvo un patrón granular y solo se pudo identificar en algunas células escasas, sin embargo, no se identificó señal nuclear o colocalización con p53 (fig. 31 y 32).

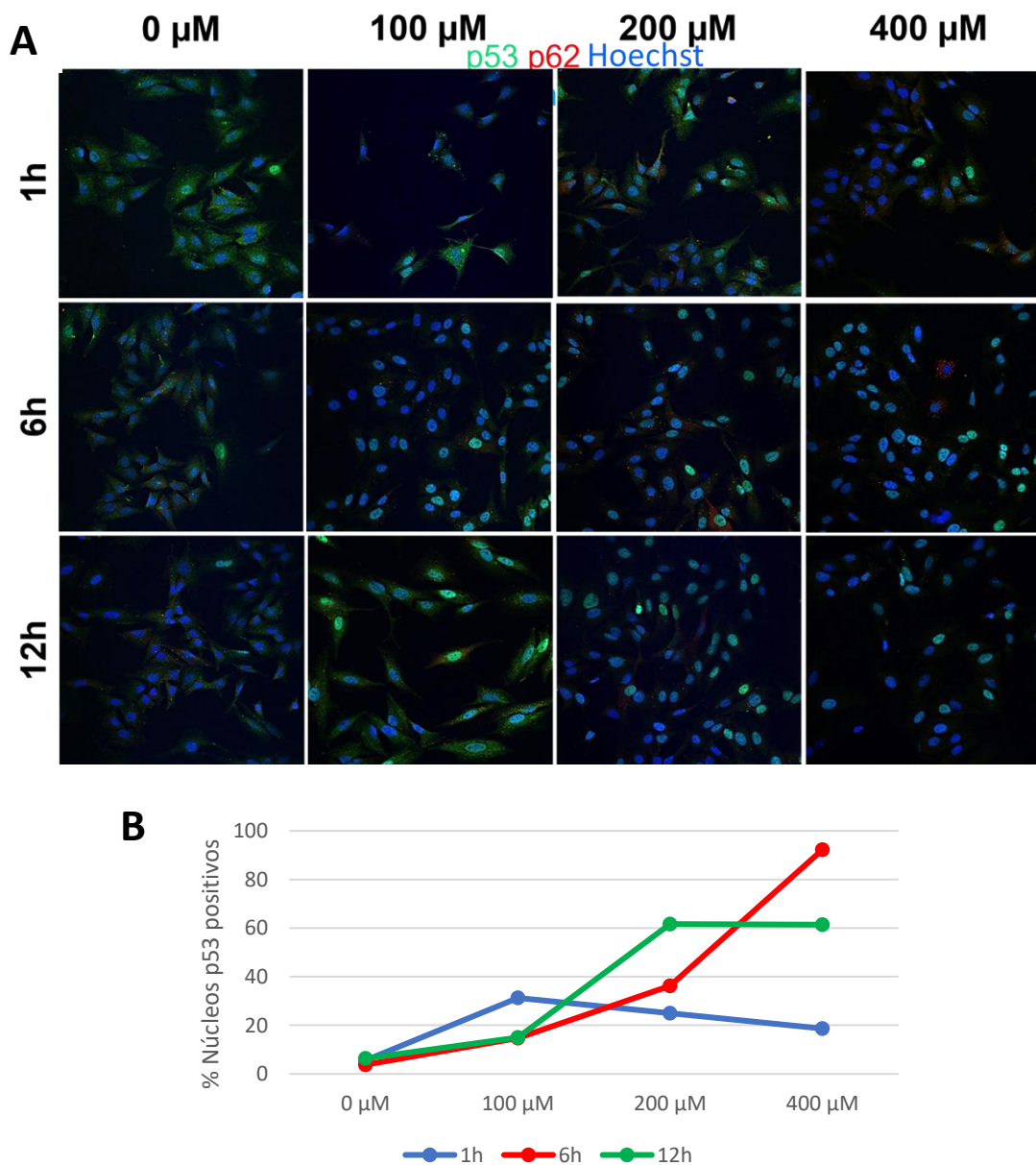


Figura 31. A. Inmunofluorescencia para p62 (rojo), p53 (verde) en condiciones basales y después de 1, 6 y 12h de aplicar bleomicina en concentraciones de 100, 200 y 400 μM en células A549. Núcleos

contrateñidos con Hoechst. Aumento 40x. **B.** Cuantificación de células con núcleos positivos para p53 en comparación con los núcleos totales.

La segunda marca de daño evaluada fue la histona γ H2AX (fig. 32). En condiciones basales no se observó presencia de γ H2AX nuclear. En comparación con las células A549 control, observamos que hubo un incremento de γ H2AX en el núcleo de algunas células en respuesta a bleomicina en las distintas concentraciones utilizadas, sin embargo, no se observó una correlación positiva entre la concentración de bleomicina y el número de núcleos positivos para γ H2AX, sino más bien se observó una saturación, tanto a las 6 como a las 12 h desde la concentración 100 μ M. En este experimento no se pudo incluir la colocalización de p62, sin embargo, se corroboró que a partir de 100 μ M de bleomicina se indujo daño al DNA.

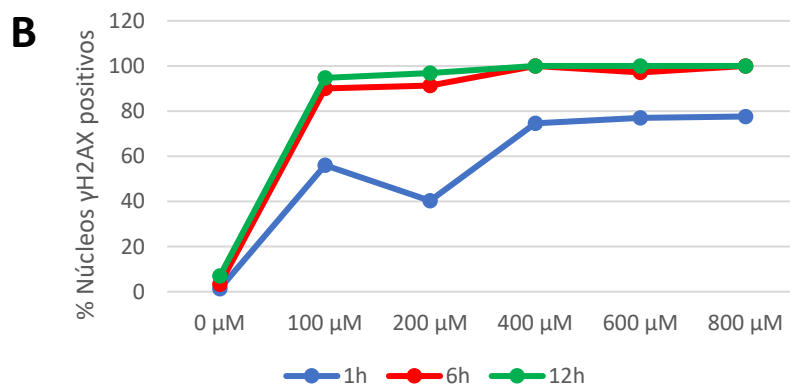
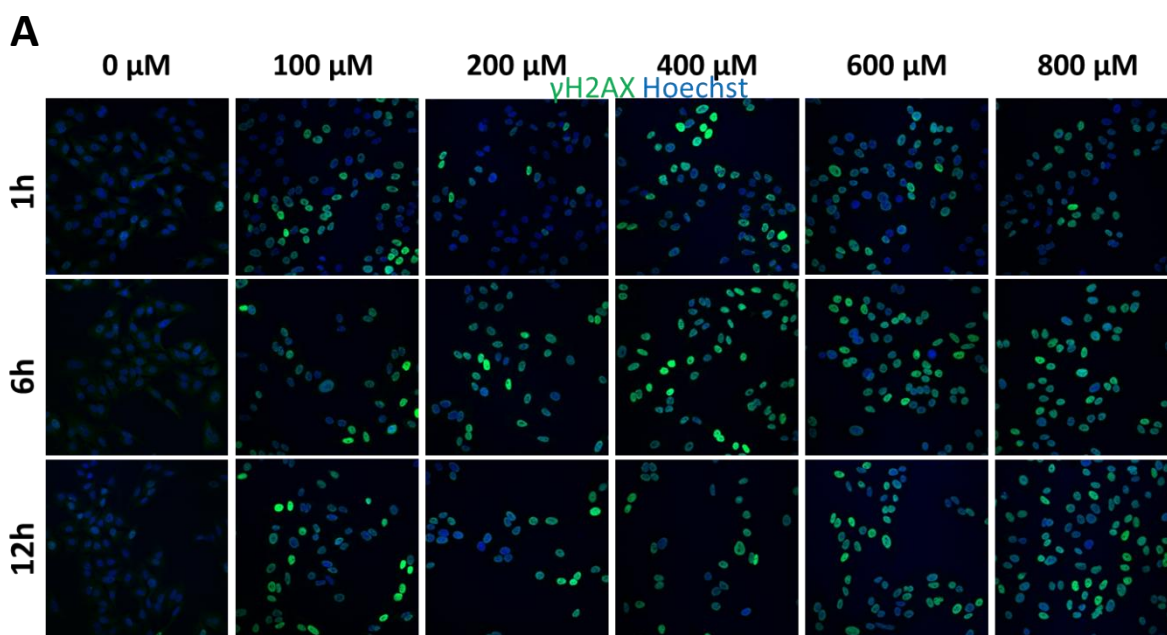


Figura 32. A. Inmunofluorescencia para γ H2AX (verde) en condiciones basales y después de 1, 6 y 12h de aplicar bleomicina en concentraciones de 100, 200, 400, 600 y 800 μ M en células A549. Núcleos contrateñidos con Hoechst. Aumento 40x. **B.** Cuantificación de células con núcleos positivos para γ H2AX en comparación con los núcleos totales.

En resumen, la presencia de las marcas de daño p53 y γ H2AX indica que la bleomicina está induciendo de forma efectiva daño al DNA, sin embargo, solo se induce apoptosis en el 30% de las células con una concentración de 400 μ M y no se alcanza el 50% de apoptosis con una concentración de 800 μ M. Por inmunocitofluorescencia no se pudo identificar de manera exitosa p62 citoplásmico, ni localización nuclear de p62.

Adicionalmente, la concentración más alta de bleomicina (800 μ M) no provocó muerte masiva en las células A549, lo que podría indicar un fenómeno de resistencia probablemente debido a que estas células provienen de carcinoma pulmonar.

Identificación de marcas de daño al DNA (p53 y γ H2AX) en respuesta al tratamiento con H_2O_2 en células epiteliales A549.

Adicionalmente evaluamos la inducción de daño al DNA con p53 y su posible colocalización con p62 en respuesta al tratamiento con H_2O_2 . Se identificó p62 (en rojo) en el citoplasma de las células, en algunos casos con un patrón granular, pero no hubo una correlación positiva en relación con la concentración de H_2O_2 utilizada y el tiempo de exposición, ni tampoco se observó translocación de p62 al núcleo. Se pudo observar p53 en el núcleo de algunas células, tanto en células control, como en células tratadas con peróxido de hidrógeno, sin embargo, no hubo una correlación positiva de p53 nuclear y la concentración de peróxido. No se observó colocalización de p53 y p62 (fig. 33).

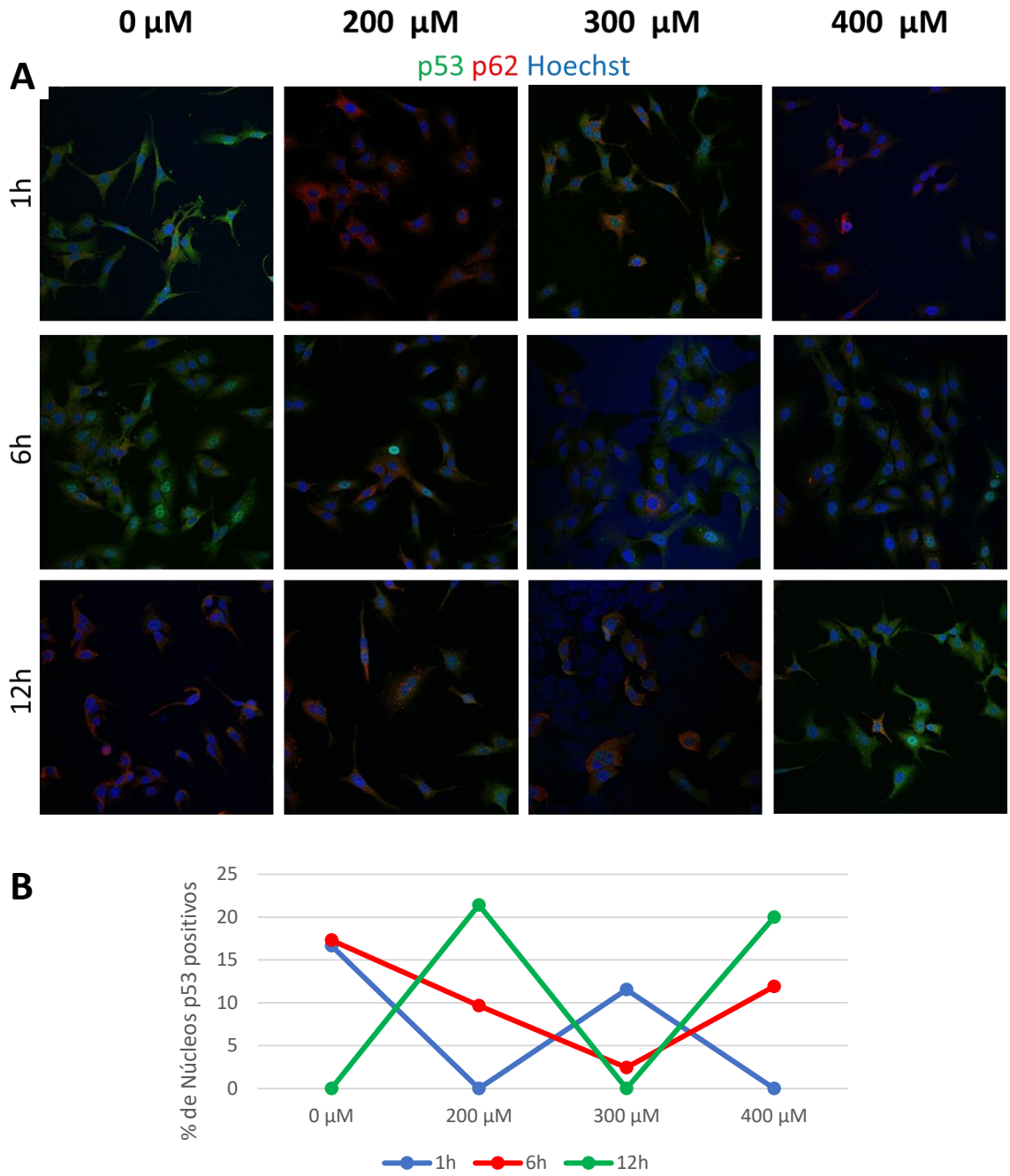


Figura 33. A. Inmunofluorescencia para p62 (rojo) y p53 (verde) en condiciones basales y después de 1, 6 y 12h de aplicar H_2O_2 en concentraciones de 200, 300 y 400 μM en células A549. Núcleos contrañidos con Hoechst. Aumento 40x. **B.** Cuantificación de células con núcleos positivos para p53 en comparación con los núcleos totales.

En la figura 34 se muestran los controles negativos de la técnica en donde no se agregó ningún anticuerpo primario, sino únicamente anticuerpos fluorescentes secundarios.

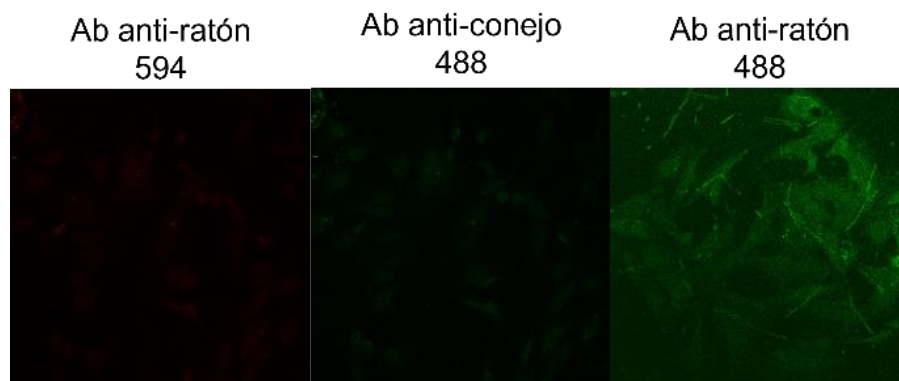


Figura 34. Controles negativos de la técnica de inmunofluorescencia. Se muestra la fluorescencia que emiten los anticuerpos secundarios cuando no se colocan anticuerpos primarios. Se muestra el canal en el que fluoresce cada anticuerpo, respectivamente. Aumento 40x.

Modelos in vitro en células epiteliales de pulmón de ratón MLE12

Las células epiteliales de pulmón MLE12 (del inglés Murine Lung Epithelial cell line) representan células de la zona distal bronquioalveolar y del epitelio alveolar y fueron producidas a partir de tumores de ratones transgénicos infectados con el virus SV40. Las células presentan un crecimiento rápido y no sufren inhibición de proliferación por contacto, su morfología es de tipo epitelial hasta por 30-40 pasajes. Vistas al microscopio electrónico, estas células poseen características de AEC II debido a sus microvellosidades, múltiples vesículas en el citoplasma y cuerpos lamelares, además, presentan expresión de proteínas del surfactante y secreción de fosfolípidos (Wikenheiser et al., 1993). Se ha descrito en la literatura que las células MLE12 son más susceptibles frente a distintos tipos de estrés en comparación con las A549 o HBEC, que en general son más resistentes. Para inducir daño y apoptosis en las células MLE12 se han usado concentraciones de 10 y 100 mU/mL.

Basándonos en las concentraciones reportadas en la literatura, las células MLE12 fueron tratadas con bleomicina 10 mU y con H₂O₂ 100 μM y fueron fijadas después de 3h de tratamiento para desarrollar inmunocitoquímica e inmunocitofluorescencia. Por inmunocitoquímica se observó que en las células no tratadas el patrón de p62 es citoplasmático. El tratamiento con bleomicina y con H₂O₂ indujo translocación nuclear de p62, sin embargo, observamos un mayor número de células con p62 nuclear en aquellas tratadas con H₂O₂, y además identificamos que estas células mostraban un soma celular

reducido, indicando que podría tratarse de células apoptóticas. Analizado por inmunocitofluorescencia, observamos p62 citoplásmico (en verde) desde la condición basal y también un incremento en la señal para p62 en respuesta a los estímulos citotóxicos. En pocas células localizamos p62 nuclear, particularmente en aquellas tratadas con H_2O_2 y con un soma celular reducido, sugiriendo de nuevo que podría tratarse de células apoptóticas (fig. 35 B).

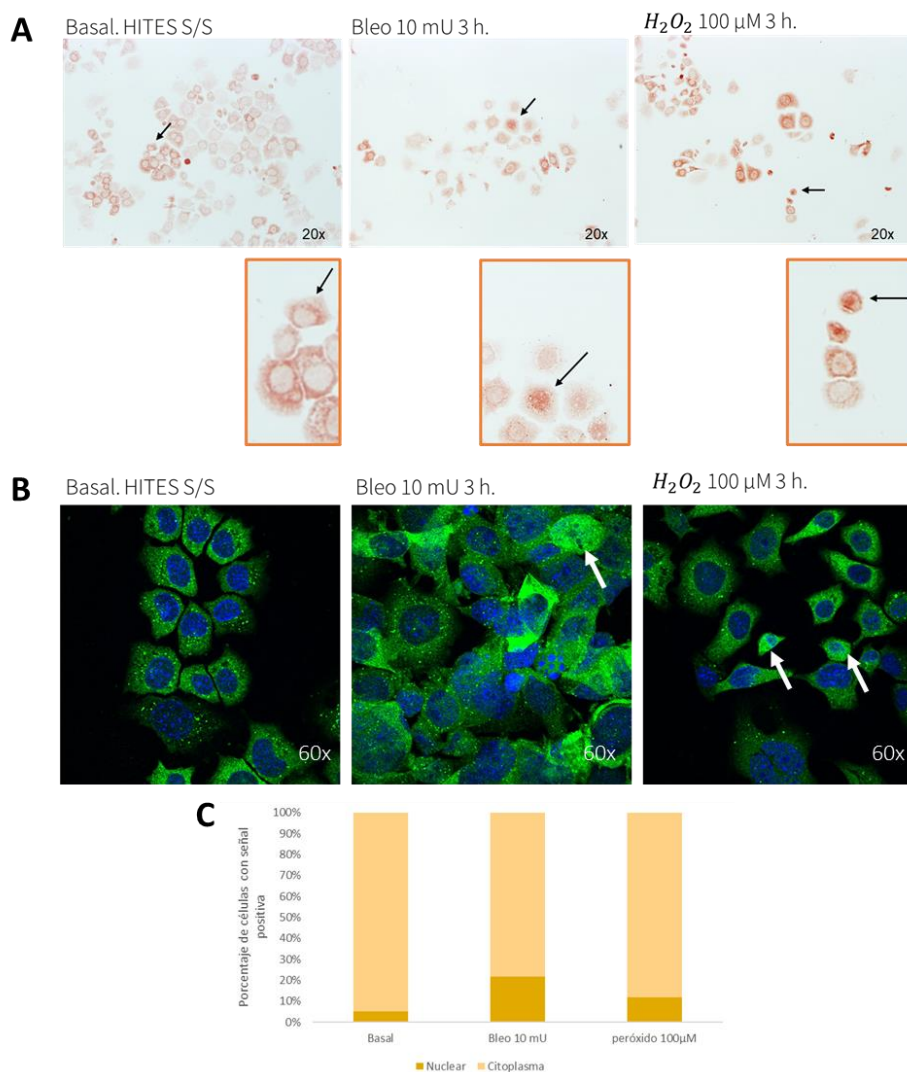


Figura 35. Inmunolocalización de p62 en células MLE-12 en respuesta a estímulos citotóxicos. **A.** Inmunocitoquímica de p62 en condiciones basales y después de 3h con 10 mU de bleomicina y 100 μ M de H_2O_2 . **B.** Inmunofluorescencia de p62 en condiciones basales y después del tratamiento por 3h con 10 mU de bleomicina o H_2O_2 100 μ M y 24h de recuperación. Las flechas muestran la

localización nuclear de p62. C. Proporción de células con señal positiva para p62 en los compartimentos citoplasmático y nuclear, n=6.

Concentración inhibitoria (IC_{50}) para células MLE12 en respuesta a dos tipos de estrés citotóxico: bleomicina y H_2O_2

Es necesario considerar que las células tumorales poseen cierta resistencia al daño al DNA inducido por quimioterapia o por agentes citotóxicos (Holohan *et al.*, 2013; Larsen *et al.*, 2022). Debido a que los experimentos realizados con células A549 estimuladas con bleomicina mostraron que la localización nuclear de p62 se encuentra en algunas células con soma reducido que podrían ser apoptóticas (fig. 28), y observamos lo mismo con las células MLE12, se realizó una curva dosis-respuesta para evaluar la concentración inhibitoria (IC_{50}) de H_2O_2 (0-100uM) y bleomicina (0-80 μ M).

Como se muestra en la gráfica de la figura 36 A, una concentración de 25 μ M de H_2O_2 es suficiente para disminuir la viabilidad celular en un 50 % después de 24 h y este efecto fue similar cuando se bloquea la autofagia con CQ 10 μ M.

Con el estímulo de bleomicina observamos que desde una concentración de 20 μ M hay una disminución de la viabilidad de hasta de un 80 %. De manera destacable, las células MLE12 resultaron más susceptibles en comparación con las A549, ya que desde 20 μ M, disminuye significativamente la viabilidad. Cuando se bloquea la autofagia con CQ, no se incrementa la susceptibilidad, indicando que probablemente no está involucrada la autofagia (fig. 36 B).

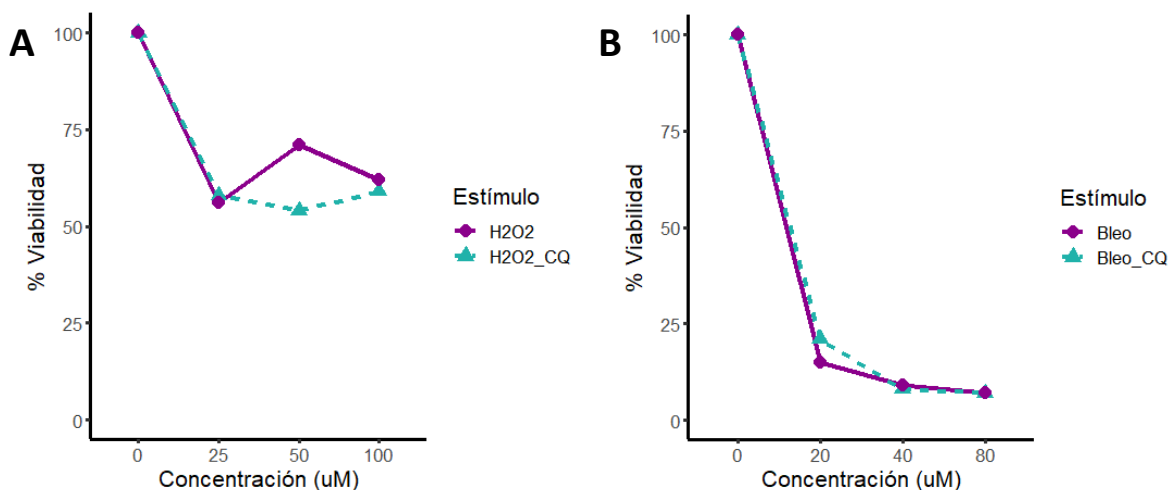


Figura. 36. Curva de IC₅₀ a partir de la conversión de la sal de tetrazolio comercial WST-1 en células MLE-12: **A.** H₂O₂ y H₂O₂ + CQ 10 μM después de 24 h. **B.** Bleomicina y bleomicina + CQ 10 μM.

Inmunolocalización de p62 en células MLE12 en respuesta a los estímulos de bleomicina y H2O2 en presencia o ausencia de CQ.

Para determinar si existían cambios en la presencia de autolisosomas y lisosomas en respuesta al estrés citotóxico, se evaluó por inmunofluorescencia la localización de p62 en combinación con lysotracker (sonda fluorescente que marca los compartimentos subcelulares ácidos, como los lisosomas y los autolisosomas). Observamos algunas vesículas en rojo en la condición basal (fig. 37 A y D), lo cual es lógico debido a que las células presentan lisosomas. No se observó p62 en citoplasma (en verde), sin embargo 2 células en el campo mostraron gránulos nucleares de p62. El tratamiento con bleomicina incrementó la presencia de vesículas ácidas en el citoplasma de las células (fig. 37 B), pero esto no se incrementó en comparación con la combinación de bleomicina + CQ. Respecto a p62, observamos que hubo más núcleos positivos para p62 en el tratamiento bleomicina + CQ (fig. 37 C).

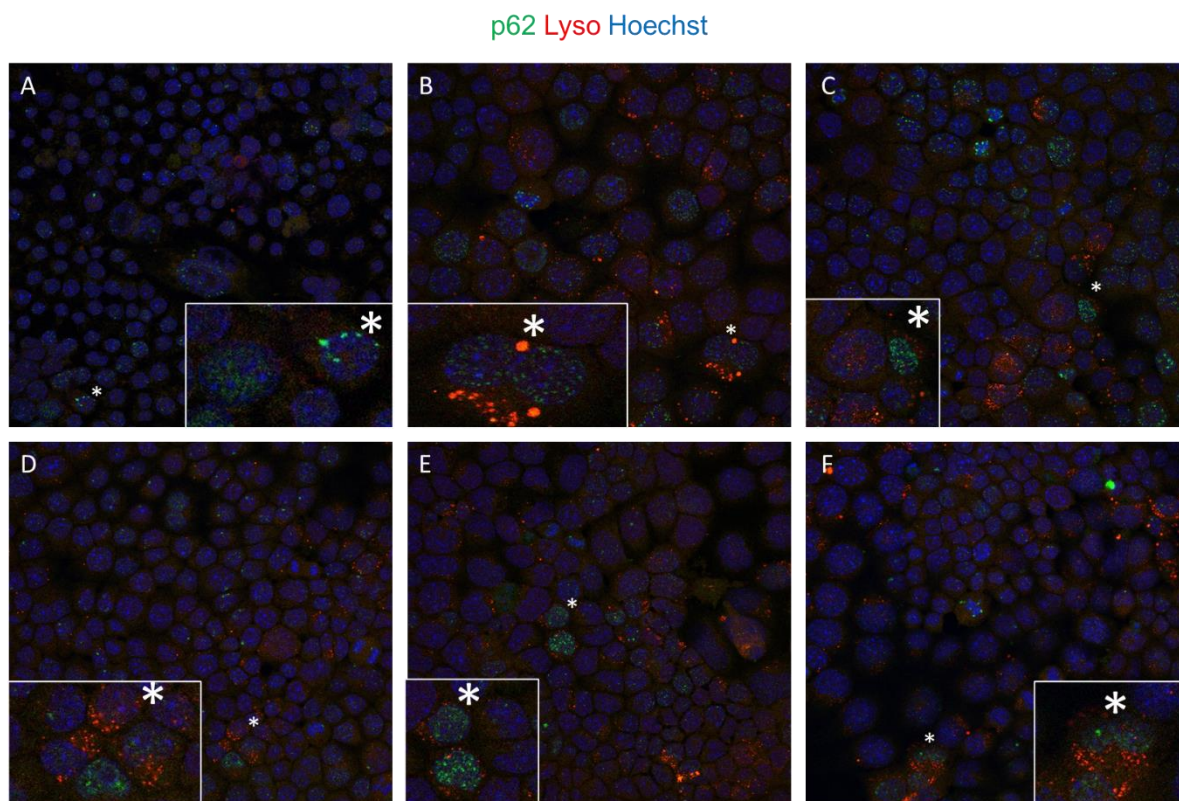


Figura 37. Inmunofluorescencia para p62 (verde) y lysotracker (rojo) en condiciones basales y después de aplicar las concentraciones IC₅₀ de bleomicina y H₂O₂ con y sin inhibición de autofagia con CQ 10 μM después de 24h en células MLE-12. **A.** Células sin estímulo de daño. **B.** Bleomicina. **C.** Bleomicina + CQ 10 μM. **D.** Células sin estímulo de daño + CQ 10 μM. **E.** H₂O₂. **F.** H₂O₂ + CQ 10 μM. Núcleos contrateñidos con Hoechst. Aumento 63x. Aumento digital. Los asteriscos indican células con núcleos positivos para p62.

En respuesta al estímulo con peróxido de hidrógeno, las células que presentan mayor acumulación de vesículas ácidas no son las mismas que presentan p62 nuclear (fig. 37 E y F y fig. 38 B). La localización de p62 nuclear no necesariamente correlaciona con la presencia de vesículas ácidas marcadas con lysotracker. Adicionalmente, la sola inhibición de la autofagia con CQ no se relaciona con un cambio en la localización de p62, lo que podría sugerir que la localización nuclear de p62 en las condiciones evaluadas es independiente de la autofagia (figura 38 A).

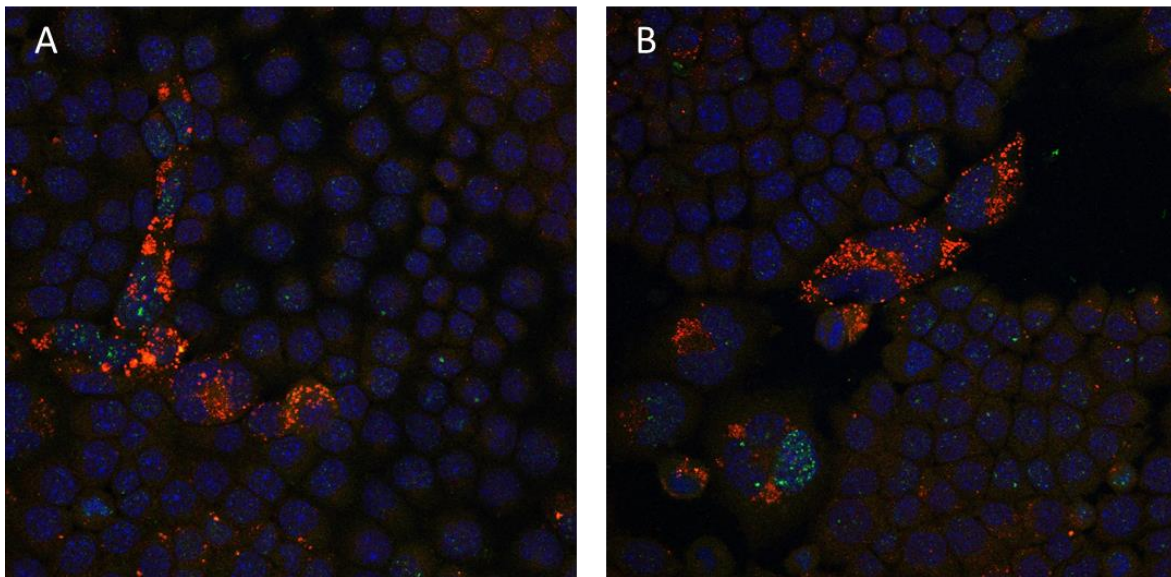


Figura. 38. Inmunofluorescencia para p62 (verde) y lysotracker (rojo) en células MLE-12 después de 24h. **A.** Células sin estímulo de daño + CQ 10 μM. **B.** H₂O₂+ CQ 10 μM. Núcleos contrateñidos con Hoechst. Aumento 63x.

Inducción de fragmentación del DNA con luz ultravioleta (UV) como control positivo de daño en células A549

Debido a que los experimentos que describí previamente sugieren que p62 se transloca al núcleo, principalmente en células, que por sus características morfológicas parecen estar en apoptosis, decidimos utilizar un inductor de daño y apoptosis más potente, como lo es la irradiación con luz UV. Por otro lado, se ha reportado la translocación nuclear de p62 en experimentos *in vitro* como un fenómeno asociado al daño al DNA, específicamente en respuesta al rompimiento de doble cadena, provocado por la irradiación γ (Hewitt *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Se ha descrito que la luz UV interfiere directamente con la unión entre los nucleótidos del DNA. Las dos principales lesiones del DNA formadas por la exposición a los rayos UV son los dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPD) y los fotoproductos de 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP) y sus isómeros de Dewar. La radiación UVA (y también UVB) causa daño indirecto al DNA mediante la absorción de fotones por cromóforos que no pertenecen al DNA. Esto genera especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno que oxida las bases del DNA provocando mutaciones. Además, las longitudes de onda UV más largas también pueden inducir pequeñas cantidades de rupturas en el DNA y entrecruzamientos entre proteínas y entre las cadenas dañadas (Kciuk *et al.*, 2020).

Debido a que no se encontró un consenso en la literatura sobre las condiciones de exposición a luz UV necesarias para inducir rompimiento de doble cadena al DNA en células epiteliales, y algunas fuentes reportaban la exposición de luz UV de intensidad de 40 J/m^2 durante 10s con un periodo de recuperación de 48h (Lee *et al.*, 2016), y otras fuentes reportaban que bastaba con la exposición a luz UV de intensidad de 20 J/m^2 con un periodo de recuperación de 1h (Borisova *et al.*, 2018), se decidió probar diferentes combinaciones de irradiación en células A549 considerando ambas condiciones reportadas. Las células fueron sembradas a semi confluencia e irradiadas con UV, posteriormente se evaluó la morfología de las células y se hizo extracción del DNA total para evaluar la fragmentación mediante electroforesis en un gel de agarosa (fig. 39).

No se encontraron diferencias morfológicas aparentes después de la irradiación con luz UV en las células A549 en comparación con las células control (no irradiadas), ni tampoco se observó fragmentación del DNA en el gel de agarosa con ninguna de las condiciones utilizadas: células irradiadas durante 17 s que se dejaron en recuperación durante 24h, células

irradiadas durante 1 min que se dejaron en recuperación durante 24h y células irradiadas durante 1 min que se dejaron en recuperación durante 1h (fig. 39).

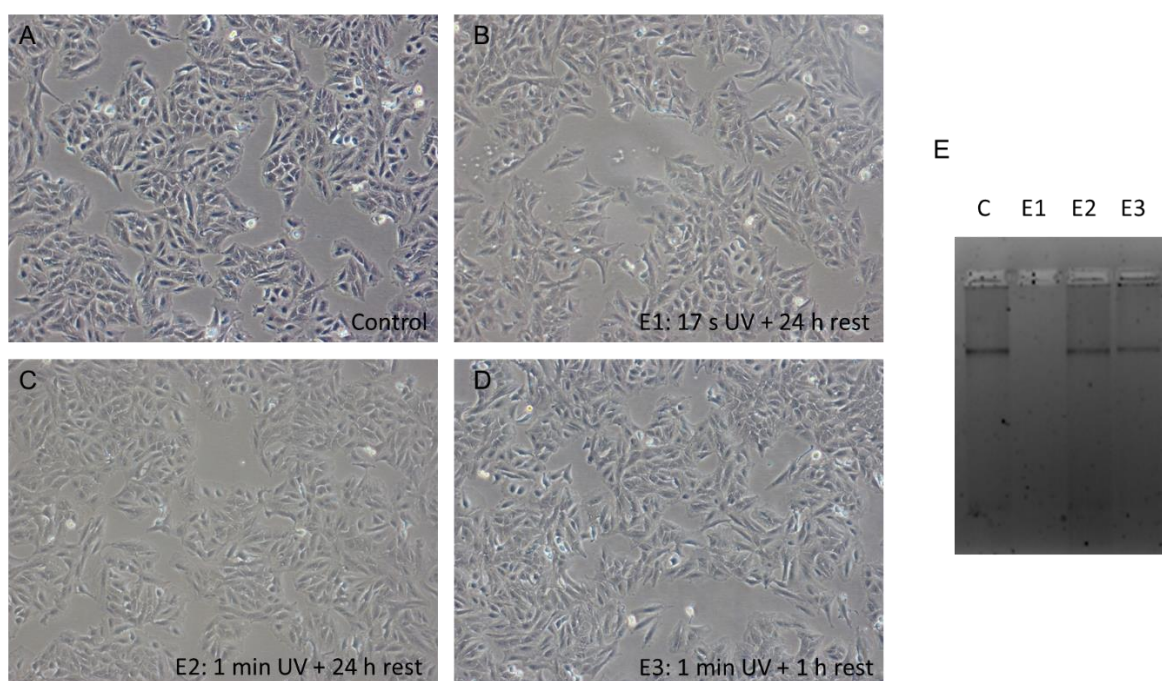


Figura 39. Evaluación del efecto de la irradiación con luz UV de intensidad 40 J/m^2 en células A549 **A.** Control sin irradiar. **B.** Células irradiadas durante 17s que se dejaron en recuperación durante 24h. **C.** Células irradiadas durante 1 min que se dejaron en recuperación durante 24h. **D.** Células irradiadas durante 1 min que se dejaron en recuperación durante 1h. Aumento 10x. **E.** Gel de agarosa al 1.5 % en donde se corrió el DNA extraído con Trizol de los respectivos tratamientos.

Inducción de fragmentación del DNA con luz ultravioleta (UV) como control positivo de daño en células MLE-12.

Con otro diseño experimental, pero considerando los resultados obtenidos en las células A549, se probó el daño con luz UV en células MLE12. El nuevo diseño consistió en evaluar la respuesta de las células MLE12 a la mayor intensidad de luz UV proporcionada por la lámpara de luz UV (9999 J/m^2) durante diferentes periodos de tiempo, desde 3 hasta los 30 min y que posteriormente se dejaron en recuperación con medio fresco durante 1h, en comparación con las condiciones basales y con estaurosporina $1 \mu\text{M}$ como control positivo de apoptosis (fig. 40). En cuanto a la morfología, no se observaron diferencias entre las células control y las irradiadas durante 3 min más 1h de recuperación, además de que la

confluencia también fue similar, lo que indica que la irradiación durante 3 minutos no causó apoptosis y el desprendimiento de células. Las células irradiadas durante 6, 12 y 30 min más 1h de recuperación, por otro lado, mostraron un cambio en la morfología del núcleo, con un aspecto más denso/oscuro al ser analizadas por contraste de fases en el microscopio óptico. Otros cambios que identificamos es que los bordes celulares/membrana plasmática son más refringentes, en algunas células parece haber una reducción en el tamaño del núcleo y/o en el soma de las células y en otras células observamos la presencia de muchas vacuolas en el citoplasma (figura 40 I, J y K), indicando que la exposición a 9999 J/m^2 de luz UV por 6, 12 y 30 minutos induce daño.

Como un control adicional positivo de apoptosis, las células MLE12 fueron expuestas a estaurosporina. La estaurosporina (STS) se ha considerado un inhibidor de amplio espectro de cinasas y ha sido bien establecido que la inducción de apoptosis por la STS involucra la liberación de citocromo c de las mitocondrias, la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y la activación de caspasa 3. La caspasa 3 rompe o degrada a iCAD, que es el inhibidor de la DNAsa activada por caspasa (CAD) (Feng y Kaplowitz, 2002).

En las células en las que se indujo apoptosis con STS, se observó disminución de su soma, pequeñas extremidades en sus bordes y mayor refringencia, señal de que la célula se está desprendiendo del sustrato, lo cual se observa en el campo en donde se aprecian varias regiones sin células. Sin embargo, no se identificaron los cambios que observamos en el núcleo de las células irradiadas con UV, es decir los núcleos no fueron más densos (Fig. 40 F).

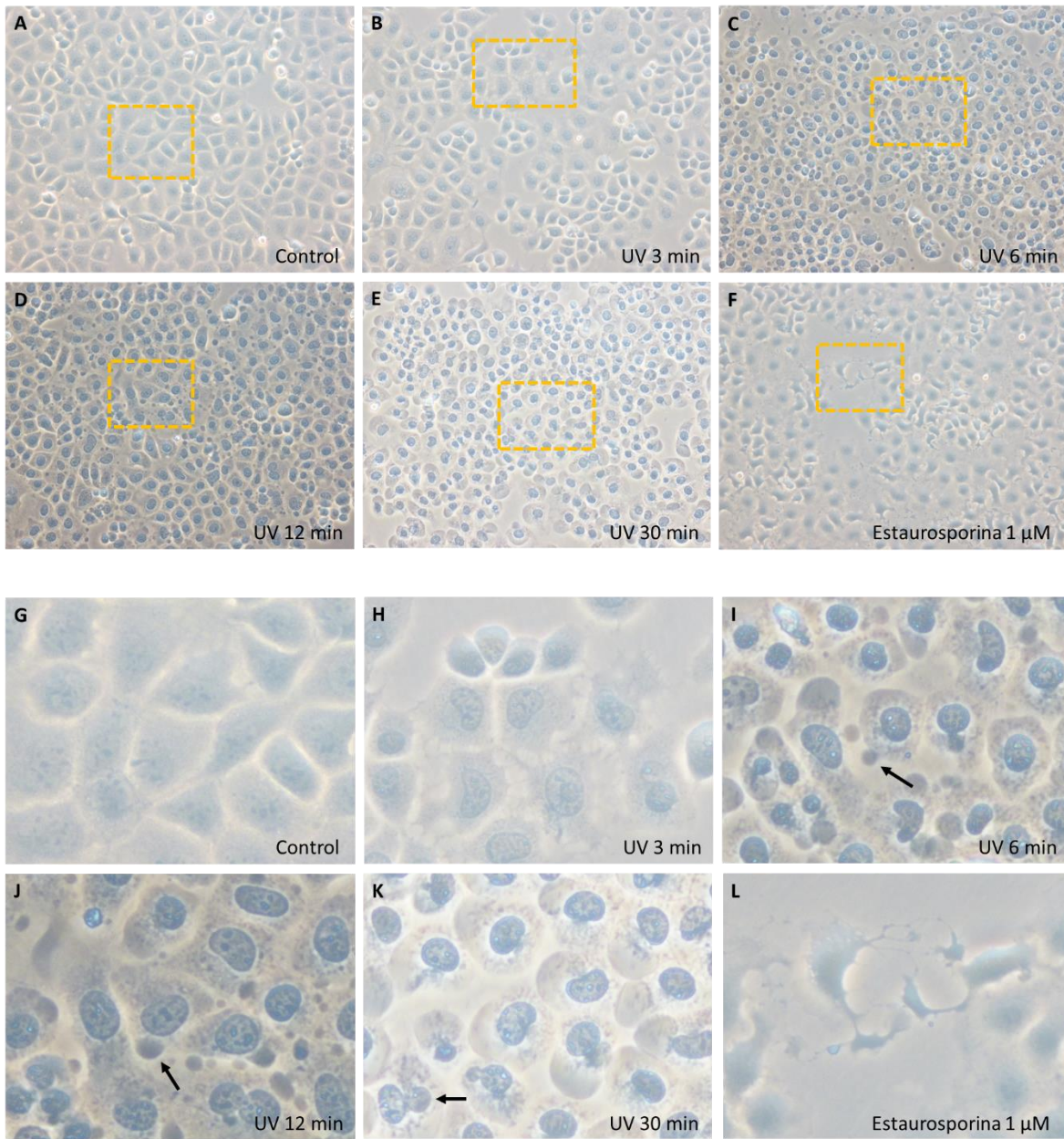


Figura 40. Evaluación del efecto de la irradiación con luz UV de intensidad 9999 J/m^2 en células MLE-12. **A.** Control sin irradiar. **B.** Células irradiadas durante 3 min. más 1h de recuperación. **C.** Células irradiadas durante 6 min. más 1 h de recuperación **D.** Células irradiadas durante 12 min. más 1h de recuperación **E.** Células irradiadas durante 30 min. más 1h de recuperación **F.** Células con estímulo de estaurosporina $1 \mu\text{M}$ durante 1h. Las flechas señalan vacuolas en el campo generadas después de la irradiación. Aumento 20x. **G-L.** Aumento digital.

Posteriormente, se evaluó la localización de p62 en estas condiciones de irradiación con luz UV, así como la marca de daño γH2AX (fig. 41). Las células en condiciones basales (no

irradiadas) no mostraron presencia de p62 nuclear (verde), mientras que en las células irradiadas fue evidente la translocación nuclear de p62, y además se observó un patrón granular intranuclear, a partir de los 3 min de irradiación y se observó que su presencia en el núcleo fue disminuyendo a medida que transcurría el tiempo de exposición. Las células estimuladas con STS (otro control positivo de apoptosis) no presentaron localización nuclear de p62. Las células basales presentaron un patrón citoplasmático de p62 tanto difuso como granular, mientras que las células estimuladas con STS presentaron un patrón de agregación citoplasmático mayormente granular para p62 (fig. 41 B). En cuanto a la marca de daño γ H2AX, observamos que está ausente en las células control, mientras a los 3 y 6 minutos se observa en el núcleo (en rojo). En estos periodos de tiempo sí vemos tanto la marca de p62, como la de γ H2AX en los núcleos, aunque ocupando regiones diferentes. Observamos que el tratamiento con STS no induce la presencia de la marca de daño γ H2AX en el núcleo, corroborando que el mecanismo de translocación de p62 al núcleo está asociado con daño al DNA y no con otros mecanismos de inducción de apoptosis.

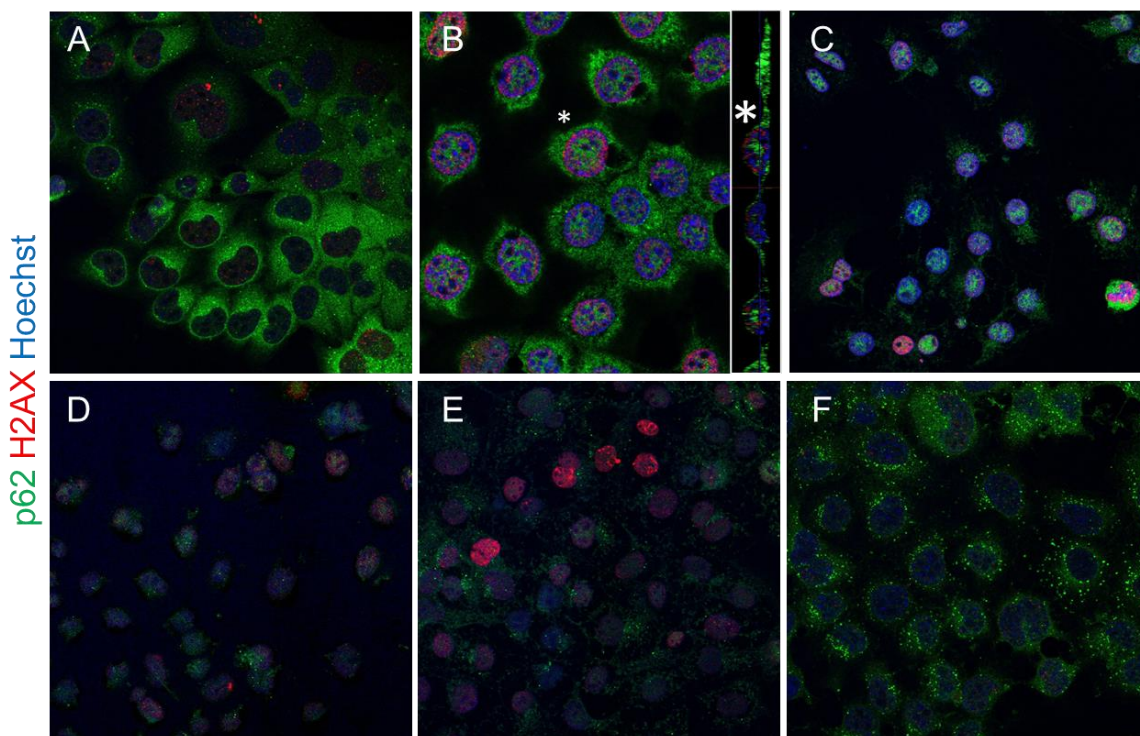


Figura 41. Inmunofluorescencia para p62 de sigma (verde) y γ H2AX (rojo) en condiciones basales y después de irradiar a células MLE-12 con luz UV de intensidad 9999 J/m^2 durante diferentes periodos de tiempo. **A.** Células sin irradiar. **B.** Células irradiadas durante 3 min. El asterisco muestra

la célula que se enfocó como referencia para hacer una reconstrucción en Z. **C.** Células irradiadas durante 6 min. **D.** Células irradiadas durante 12 min. **E.** Células irradiadas durante 30 min. **F.** Células con estímulo de estaurosporina 1 μ M durante 1 h. Aumento 63x.

Al evaluar los marcadores de autofagia del lisado total de células control y células que fueron irradiadas con luz UV durante 3 min, no se observaron cambios en los niveles de LC3B ni en p62, lo que podría sugerir que no hay alteraciones en el flujo autofágico y que los cambios subcelulares citoplasma/núcleo de p62 no están asociados con su papel en autofagia, pero sí con su función en respuesta al daño al DNA (fig. 42).

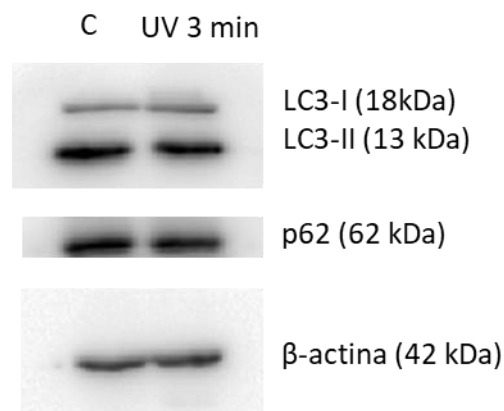


Fig.42. Inmunoblot de p62 (Sigma) y LC3 para el control y después de irradiar a células MLE-12 con luz UV de intensidad 9999 J/m² durante 3 min. Después de la irradiación ambas condiciones se dejaron recuperar durante 1 h con medio fresco a 37 °C.

DISCUSIÓN

Existen muchas evidencias que sugieren que el daño al epitelio y la disfunción epitelial pulmonar son factores centrales en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Han surgido datos interesantes que integran las vías de respuesta a las lesiones y al estrés celular (UPR, autofagia, mitofagia) juntas en la patogénesis de la FPI. Adicionalmente, resultados de experimentos recientes realizados en nuestro laboratorio, que están evaluando el papel de la autofagia y el estrés del retículo endoplásmico, indican que estos procesos podrían estar asociados con la patogénesis de la NH y también apuntan a que el epitelio alveolar es un regulador clave de la cascada fibrótica en la NH.

En esta tesis se muestra la presencia de p62 con patrón granular en el citoplasma en algunas células epiteliales alveolares en pacientes con NH y FPI, lo que corrobora los hallazgos de Cabrera S, *et al.* (2020). Anteriormente, se había observado la acumulación de p62, así como de otras proteínas que participan en la autofagia como LC3B y distintas ATGs, en el epitelio de pacientes con NH y FPI, en ambas patologías se presenta el aumento de estos marcadores autofágicos con respecto a individuos control; sin embargo, un aumento en la señal de estas proteínas no indica mayor autofagia.

Aunque en el trabajo publicado por Cabrera *et al.*, 2020 se describe la presencia de p62 en el núcleo de células epiteliales, no se cuantificó la proporción de células positivas con marca nuclear. En el presente trabajo, utilizando 3 anticuerpos primarios diferentes dirigidos contra p62, se corroboró la presencia de p62 nuclear y se determinó que aproximadamente el 40% de las células epiteliales que son positivas para p62, muestran también un patrón nuclear en el pulmón de pacientes con FPI y NH, y este porcentaje resultó significativamente mayor al compararlo con la proporción encontrada en el pulmón control. En este estudio también se corroboró que las células corresponden al linaje AEC II, ya que la señal de p62 se encuentra en células positivas también para SPC, una proteína exclusiva de neumocitos tipo II.

Durante el desarrollo de la fibrosis, el epitelio de pacientes con FPI y NH sufre procesos de cuboidalización y transdiferenciación, en donde se han encontrado poblaciones con marcas moleculares que corresponden a estados celulares intermedios o incompletos de diferenciación que se han denominado aberrantes. Estas células se encuentran delineando focos de fibrosis y probablemente representan un proceso de regeneración epitelial conocido

como re-epitelización. En el pulmón derivado de pacientes con FPI y NH se puede apreciar alteración del parénquima pulmonar, metaplasia e hiperplasia de las células AECII y focos de fibrosis, por lo tanto, podría resultar interesante evaluar marcadores moleculares de estados epiteliales intermedios como la CK17 o CK8 y el patrón subcelular de p62.

Actualmente, existen distintos modelos *in vivo* para evaluar el desarrollo de la fibrosis pulmonar, uno de los más utilizados es el modelo murino de bleomicina. Por otro lado, recientemente se ha desarrollado un modelo murino de la NH inducida por *S. rectivirgula*. Ambos modelos pueden llegar a presentar fibrosis pulmonar, por lo que se utilizaron ratones de ambos modelos para evaluar si la localización nuclear de p62 estaba asociada también a estos procesos fibróticos. Para fortalecer los resultados en humano, se encontró que el epitelio de ratón también presenta núcleos celulares positivos a p62, principalmente en epitelio bronquial y la proporción en la que ocurre este fenómeno es cercana al 40% en ratones del modelo de bleomicina. Esta proporción es significativamente mayor al epitelio del ratón control y de los ratones del modelo de NH.

Para estudiar si la posible translocación de p62 al núcleo en las células epiteliales estaba asociada con una respuesta al daño, decidimos explorar *in vitro*, con líneas epiteliales bronquiales y alveolares comerciales derivadas de pulmón humano, el efecto de la inducción de estrés con bleomicina en la movilización subcelular de p62. No observamos cambios morfológicos en las células epiteliales bronquiales HBE4-E6/E7 dañadas con bleomicina al compararlas vs las células control, ni pérdida de células por apoptosis, ni cambios en la localización celular de p62 por Western blot. Debido a que en tejido fue mayor la proporción de p62 nuclear en epitelio alveolar, decidimos usar la línea A549. Observamos que la inducción de daño con bleomicina en células A549 promovió la translocación de p62 en escasas células, a pesar de que se utilizaron grandes concentraciones de esta droga. Esas pocas células mostraron un soma reducido, lo que sugiere que podría tratarse de células apoptóticas, sin embargo, se requieren estudios adicionales para corroborar que efectivamente son células en apoptosis, tal vez inmunolocalizando a caspasa 3. Aunque se observaron marcas de daño en algunos núcleos de las células A549 en respuesta a bleomicina, no logramos encontrar colocalización de p62 con p53 o γ H2AX en el núcleo. El tratamiento de las células A549 con H₂O₂ no indujo translocación nuclear de p62, y no pudimos

colocalizar a p62 con p53 o γ H2AX en el núcleo. Se ha reportado que las líneas celulares derivadas de carcinoma suelen ser resistentes a la inducción de daño y apoptosis frente a ciertas drogas, e incluso se utilizan combinaciones de fármacos, para que en sinergia tengan un efecto proapoptótico.

Incluso con la coestimulación con el inhibidor de autofagia CQ, no se potenció el efecto citotóxico de la bleomicina o el peróxido de hidrógeno en células A549, ni tampoco se observó que el inhibir la autofagia promoviera más apoptosis y la translocación de p62 al núcleo.

Decidimos también utilizar la línea derivada de pulmón de ratón MLE12, que *in vitro* ha mostrado ser más susceptible al daño en respuesta a diversos citotóxicos. De hecho, en los experimentos se utilizó una concentración de bleomicina 10 veces menor, en comparación con la concentración usada para estimular a células A549, y se observó que 10uM de la droga promovió la translocación nuclear de p62. De manera similar a lo que observamos en las células A549, en las células MLE12 se identificó que las células con p62 nuclear eran pequeñas y más refringentes, indicando de nuevo que se podría tratar de células apoptóticas. Identificamos también que el tratamiento con H₂O₂ induce translocación de p62 en algunas células MLE12 y su morfología fue tamaño pequeño y con bordes refringentes.

Discutiendo estos resultados con mi comité tutor, se sugirió buscar algún agente inductor de daño y apoptosis más potente, como el etopósido o la radiación UV, que provocan daño directo al DNA. En células A549 observamos que el tratamiento con 20 y 40 J/m² no tuvo ningún efecto en la morfología celular y no se observó fragmentación del DNA por electroforesis. Sin embargo, en células MLE12 tratadas con UV (9999 J/m²), sí se observaron cambios en la morfología nuclear y además la presencia de p62 nuclear con un patrón granular y sí hubo colocalización con la marca de daño a DNA γ H2AX.

La fosforilación de la histona H2AX es el principal evento para reclutar a los siguientes efectores de la reparación del daño al DNA, si p62 se encuentra en el núcleo, cuando H2AX presenta mayor señal en respuesta al daño al DNA, posiblemente p62 tienen un efecto cooperador en este proceso. Aunque, la presencia de p62 en el núcleo de células de morfología apoptótica podría indicar que participa durante la apoptosis, como en la

reparación del DNA por la vía NER (*Nucleotide excision repair por sus siglas en inglés*) (Kciuk *et al.*, 2020).

Una exposición prolongada a la irradiación puede provocar la apoptosis de las células, tal como ocurre en la radioterapia en pacientes con cáncer. También pueden ocurrir procesos de fibrosis pulmonar por irradiación, que se caracterizan por el daño directo al DNA de las células de pulmón, ya que se ve reflejado en el aumento de apoptosis en el epitelio. En este escenario se ha observado el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) y existe una etapa inflamatoria antes de que se establezca la fibrosis, que ocurre aproximadamente después de 6 meses de irradiación (Jin *et al.*, 2020). Sería muy interesante en un futuro poder identificar en pacientes con cáncer de pulmón, que han sido sometidos a radioterapia, si existe un incremento en la translocación subcelular de p62, o si existen cambios en el porcentaje de translocación y una asociación con la recuperación, o, por otro lado, con el desarrollo de fibrosis pulmonar como efecto colateral al tratamiento con radioterapia.

En las células MLE12 irradiadas con luz UV en las que se demostró p62 nuclear, no se identificaron cambios en la cantidad total de LC3-II o p62 por Western blot, lo que sugeriría que el proceso de translocación de p62 al núcleo es un proceso independiente de la autofagia, sin embargo, en un futuro se podría hacer una colocalización con LysoTracker para monitorear si hay un incremento en autofagolisosomas. Estos resultados muestran que lo que ocurre es el movimiento núcleo/citoplasma de la proteína, en condiciones de daño directo al DNA, sin aumentar o disminuir los niveles de la proteína p62.

Al comparar los tres estímulos de daño: bleomicina, H₂O₂ e irradiación con UV, fue ésta última la que tuvo un efecto más contundente en la translocación de p62 al núcleo en células MLE12, aunque los otros agentes citotóxicos provocaron daño, la proporción de núcleos p62 positivos fue menor, sin embargo, se requieren estudios cuantitativos para determinar esto con mayor precisión.

La luz UV facilita la formación de enlaces covalentes en las moléculas del DNA y que forman dímeros de pirimidinas, que implican daño en la doble hélice. Uno de los efectos inmediatos que provoca este evento es el bloqueo de la RNA pol II, involucrada en la transcripción del material genético o, si la célula se encuentra en división, los dímeros de pirimidina afectan

la síntesis de nuevas cadenas de DNA. Este tipo de daño se repara por la vía NER (Sinha y Häder, 2002).

Se ha demostrado en células humanas con síndrome de Cockayne inmortalizadas, que después de 1h de irradiación, disminuye la transcripción del DNA por la RNA pol II, esta disminución correlaciona de manera lineal con el aumento de la intensidad de la luz UV. Sin embargo, la síntesis de RNA se restaura a medida que pasa el tiempo cuando la célula está en medio fresco, indicando que hay un fenómeno de recuperación y reparación. De acuerdo con la bibliografía, la inhibición completa de la síntesis de DNA inducida por distintos niveles de intensidad de luz UV es dependiente del tipo celular. Por ejemplo, la proteína p62 evaluada en extractos nucleares de células MRC5 (fibroblastos inmortalizados de pulmón humano) y CS1AN (fibroblastos de humano con síndrome de Cockayne) irradiadas durante 1h a una intensidad de 5 J/m^2 , no denota cambios de concentración de p62 con respecto a las células no irradiadas o con respecto al tiempo de recuperación después de la irradiación (Rockx *et al.*, 2000). En esta tesis se usaron intensidades y tiempos diferentes para estimular a células A549 y MLE12, por lo tanto, será necesario en un estudio simultáneo, irradiar a ambos tipos celulares y observar de manera comparativa su comportamiento frente al daño, así como la proporción de translocación de p62 en función de la intensidad y el tiempo.

Mientras que p62 es esencial para la formación de agregados e inducir la autofagia, estudios recientes han demostrado que p62 está relacionada también con la maquinaria de reparación del daño al DNA. En ausencia de autofagia, Hewitt *et al.* (2016) demostraron que p62 se une a filamina A (FLNA), proteína involucrada en la reparación del daño al DNA, por recombinación homóloga y la dirige a la degradación por la vía del proteosoma. FLNA está encargada de reclutar a RAD51 (*proteínas para la reparación del DNA por recombinación homóloga*) y sin ella no puede haber una correcta reparación del daño. Se comprobó también que p62 interactúa con RNF168 (*RING Finger Protein 168*), una E3 ligasa que ubiquitina a la histona H2A que desencadena la reparación del daño al DNA, esta interacción provoca la degradación de RNF168 por la vía del proteosoma (Wang *et al.*, 2016).

Para mantener la integridad genómica y la transmisión fiel del DNA completamente replicado y sin daños durante la división celular, los organismos eucariotas desarrollaron un complejo programa de vigilancia del DNA. Antes de la mitosis, las células progresan a través

de los puntos de control del ciclo celular G1/S y G2/M. La señalización de puntos de control se activa en respuesta a una replicación incompleta del DNA debido a horquillas de replicación detenidas y al DNA dañado, inducido por fuentes tanto internas como externas como la luz UV, la radiación ionizante, especies reactivas del oxígeno (ERO) o agentes quimioterapéuticos que dañan al DNA. Los puntos de control activos impiden una mayor progresión a lo largo del ciclo celular. Si la agresión genotóxica excede la capacidad de reparación, se activan vías de señalización adicionales que conducen a la muerte celular, presumiblemente a través de la apoptosis. La red canónica de respuesta al daño del DNA se ha dividido tradicionalmente en dos vías principales de señalización de cinasas efectoras CHK2 y CHK1, estas cinasas controlan los puntos de control G1/S y G2/M respectivamente. Se ha identificado el complejo p38MAPK/MAPKAP-K2 (MK2) como un tercer módulo efector de punto de control que opera en paralelo a CHK1 (Reinhardt y Yafee, 2009).

Se ha descrito que p62 posee un papel preponderante ante infecciones virales, cuando se inhibe la autofagia durante una infección latente del virus del herpes humano 4 EBV (Epstein-Barr virus) y ocurre un aumento de ERO, p62 se transloca al núcleo y provoca la disminución de RAD51 y CHK1, ambas involucradas en la reparación del daño al DNA por HR, lo que provoca que ante este escenario de daño la reparación sea deficiente (Wang *et al.*, 2019). Estos resultados indican que la deficiencia de la autofagia induce la acumulación de p62 en el núcleo y esta acumulación provoca un deterioro en la respuesta a la reparación del daño al DNA, probablemente para dirigir a la célula hacia la apoptosis. Con estos resultados se hace énfasis en la compleja relación entre la autofagia, p62 y la respuesta al daño al DNA. Sin embargo, cuando no se bloquea la autofagia, pero se induce la sobreexpresión de una mutante de p62 con localización nuclear, se observó que la translocación de p62 posee un efecto protector, ya que disminuye el porcentaje de células apoptóticas en comparación con p62 cuando no se encuentra en el núcleo, después de provocar estrés por calor en células HeLa (Fu *et al.*, 2021). Estos hallazgos indican que p62 podría prevenir la apoptosis al translocar al núcleo, paradójicamente, en nuestro modelo *in vitro*, la translocación de p62 en células epiteliales en respuesta a bleomicina, peróxido de hidrógeno o irradiación por UV parece estar asociada con las células apoptóticas, sin embargo, aún falta definir si esta translocación es la antesala de la apoptosis o por otro lado, es un fenómeno que ocurre para evitar la muerte. Será muy relevante poder generar en un futuro plásmidos de expresión con

formas mutantes en las secuencias de los dominios NLS y NES para evitar tanto su importación como exportación al núcleo y definir si evitar la translocación nuclear resulta en una resistencia o sensibilización frente a la apoptosis.

La función de p62 en las vías de degradación celular, es la de una proteína adaptadora que reconoce sustratos ubiquitinados a degradar y se extiende al compartimiento nuclear, sin embargo, los efectos de su presencia en dicho compartimiento no han sido completamente dilucidados y dependen del contexto específico de la célula. En las células, p62 se encuentra participando en diferentes procesos y es razonable pensar que en el envejecimiento o en un estado enfermo, la dinámica de p62 refleja los procesos por los que atraviesa la célula, ya sea estrés oxidante, disminución de la autofagia, daño al DNA y apoptosis. En proyectos futuros, para continuar con esta investigación, será muy importante generar formas mutantes de p62 que eviten su movilización al núcleo, en combinación con inhibidores de autofagia para discernir si su actividad en este compartimiento es autofagia-dependiente o autofagia-independiente, y si su función es promover la supervivencia o por otro lado, la muerte de las células.

CONCLUSIONES

- 1- Se identificó a p62 en el núcleo de células epiteliales en el pulmón de pacientes con NH y FPI, utilizando 3 anticuerpos distintos.**
- 2- La proporción de p62 nuclear en el epitelio del pulmón de pacientes con NH y FPI fue significativamente mayor en comparación con pulmón control.**
- 3- La translocación de p62 nuclear en epitelio ocurre en células AECII dado que colocaliza con la proteína SPC.**
- 4- Se identificó a p62 en el núcleo de células del epitelio bronquial en el pulmón de ratones del modelo de fibrosis inducida por bleomicina y el modelo de NH inducida por *S. rectivirgula*.**
- 5- La proporción de p62 nuclear en el epitelio bronquial del pulmón ratones del modelo de bleomicina fue significativamente mayor en comparación con el pulmón control y el modelo de NH.**

6- El tratamiento de células A549 y MLE12 con bleomicina induce la translocación de p62 en algunas células.

7- La identificación de p62 en células A549 y MLE12 dañadas con bleomicina fue principalmente en células con un soma pequeño y con bordes refringentes (características morfológicas similares a las de células apoptóticas).

8- La irradiación con luz UV de células MLE12 provoca daño al DNA, observado por H2XA y translocación nuclear de p62, como se identificó por inmunofluorescencia y colocalización de ambas marcas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Thoracic Society; European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jan 15;165(2):277-304. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Aug 1;166(3):426.

Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Tomassetti S, Bonella F, Costabel U, Poletti V. Interstitial lung disease. *Eur Respir Rev.* 2014 Mar 1;23(131):40-54.

Araya J, Kojima J, Takasaka N, Ito S, Fujii S, Hara H, Yanagisawa H, Kobayashi K, Tsurushige C, Kawaishi M, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Kawabata Y, Hano H, Nakayama K, Kuwano K. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013 Jan 1;304(1): L56-69.

Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, Capelozzi VL. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol.* 2001 Feb;54(2):132-8.

Brar SS, Meyer JN, Bortner CD, Van Houten B, Martin WJ 2nd. Mitochondrial DNA-depleted A549 cells are resistant to bleomycin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012 Sep;303(5):L413-24. doi: 10.1152/ajplung.00343.2011. Epub 2012 Jul 6. PMID: 22773697; PMCID: PMC3468425.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.

Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005 Nov 21;171(4):603-14.

Borisova ME, Voigt A, Tollenaere MAX, Sahu SK, Juretschke T, Kreim N, Mailand N, Choudhary C, Bekker-Jensen S, Akutsu M, Wagner SA, Beli P. p38-MK2 signaling axis regulates RNA metabolism after UV-light-induced DNA damage. *Nat Commun.* 2018 Mar 9;9(1):1017.

Cabrera S, Maciel M, Herrera I, Nava T, Vergara F, Gaxiola M, López-Otín C, Selman M, Pardo A. Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy.* 2015 Apr 3;11(4):670-84.

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

Calderón-Ezquerro MC, Guerrero-Guerra C, Martínez-López B, Fuentes-Rojas F, Téllez-Unzueta F, López-Espinoza ED, Calderón-Segura ME, Martínez-Arroyo A, Trigo-Pérez MM. First airborne pollen calendar for Mexico City and its relationship with bioclimatic factors. *Aerobiologia.* 2016; 32: 225–244.

Chan M, Liu Y. Function of epithelial stem cell in the repair of alveolar injury. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Apr 27;13(1):170.

Chaudhry R, Bordoni B. Anatomy, Thorax, Lungs. [Updated 2022 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470197/>

Cohen-Kaplan V, Livneh I, Avni N, Fabre B, Ziv T, Kwon YT, Ciechanover A. p62- and ubiquitin-dependent stress-induced autophagy of the mammalian 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Nov 22;113(47):E7490-E7499. doi: 10.1073/pnas.1615455113. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27791183; PMCID: PMC5127335.

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

Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun 20;86:193-224. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908. Epub 2017 May 1. PMID: 28460188.

Fattah EA, Bhattacharya A, Herron A, Safdar Z, Eissa NT. Critical Role for IL-18 in Spontaneous Lung Inflammation Caused by Autophagy Deficiency. *J Immunol.* 2015; 194(11): 5407-5416. **Feng G,** Kaplowitz N. Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 May;282(5):G825-34. doi: 10.1152/ajpgi.00467.2001. PMID: 11960779.

Franks TJ, Colby TV, Travis WD, Tudor RM, Reynolds HY, Brody AR, Cardoso WV, Crystal RG, Drake CJ, Engelhardt J, Frid M, Herzog E, Mason R, Phan SH, Randell SH, Rose MC, Stevens T, Serge J, Sunday ME, Voynow JA, Weinstein BM, Whitsett J, Williams MC. Resident cellular components of the human lung: current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5: 763–766.

Fu A, Cohen-Kaplan V, Avni N, Livneh I, Ciechanover A. p62-containing, proteolytically active nuclear condensates, increase the efficiency of the ubiquitin-proteasome system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Aug 17;118(33):e2107321118. doi: 10.1073/pnas.2107321118. PMID: 34385323; PMCID: PMC8379982.

Giese M. Introduction to Molecular Vaccinology. Suiza: Springer Cham; 2016. 28 p.

Guo XG, Ji TX, Xia Y, Ma YY. Autophagy protects type II alveolar epithelial cells from Mycobacterium tuberculosis infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2013; 432(2): 308-313.

Hamblin M, Prosch H, Vašáková M. Diagnosis, course and management of hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir Rev.* 2022 Feb 9;31(163):210169. doi: 10.1183/16000617.0169-2021. PMID: 35140104; PMCID: PMC9488722.

Han T, Guo M, Gan M, Yu B, Tian X, Wang JB. TRIM59 regulates autophagy through modulating both the transcription and the ubiquitination of BECN1. *Autophagy.* 2018;14(12):2035-2048. doi: 10.1080/15548627.2018.1491493. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30231667; PMCID: PMC6984771.

Hewitt G, Carroll B, Sarallah R, Correia-Melo C, Ogrodnik M, Nelson G, Otten E, Manni D, Antrobus R, Morgan BA, Von Zglinicki T, Jurk D, Seluanov A, Gorbunova V, Johansen T, Passos J, Korolchuk V. SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair, *Autophagy*. 2016; 12(10): 1917-1930.

Hill C, Li J, Liu D, Conforti F, Brereton C, Yao L, Zhou Y, Alzetani A, Chee SJ, Marshall BG, Fletcher SV, Hancock D, Ottensmeier CH, Steele AJ, Downward J, Richeldi L, Lu X, Davies DE, Jones MG, Wang Y. Autophagy inhibition-mediated epithelial–mesenchymal transition augments local myofibroblast differentiation in pulmonary fibrosis. *Cell Death Dis*. 2019; 10(591).

Hoffmann GR, Laterza AM, Sylvia KE, Tartaglione JP. Potentiation of the mutagenicity and recombinogenicity of bleomycin in yeast by unconventional intercalating agents. *Environ Mol Mutagen*. 2011 Mar;52(2):130-44. doi: 10.1002/em.20592. PMID: 20839230.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013 Oct;13(10):714-26. doi: 10.1038/nrc3599. PMID: 24060863.

Huff RD, Carlsten C, Hirota JA. An update on immunologic mechanisms in the respiratory mucosa in response to air pollutants. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 Jun;143(6):1989-2001.

Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, McMahon M, Hayes JD, Johansen T. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem*. 2010 Jul 16;285(29):22576-91. doi: 10.1074/jbc.M110.118976. Epub 2010 May 7. PMID: 20452972; PMCID: PMC2903417.

Ji CH, Kwon YT. Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Mol Cells*. 2017 Jul 31;40(7):441-449.

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

Jin H, Yoo Y, Kim Y, Kim Y, Cho J, Lee YS. Radiation-Induced Lung Fibrosis: Preclinical Animal Models and Therapeutic Strategies. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 12;12(6):1561. doi: 10.3390/cancers12061561. PMID: 32545674; PMCID: PMC7352529.

Jobe AH, Whitsett JA, Abman SH. Fetal and neonatal lung development. *Clinical Correlates and Technologies for the Future*. Nueva York, EUA. Cambridge University Press. 2016. 34 p.

Katzen J, Beers MF. Contributions of alveolar epithelial cell quality control to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2020 Oct 1;130(10):5088-5099. doi: 10.1172/JCI139519. PMID: 32870817; PMCID: PMC7524463.

Kciuk M, Marciniak B, Mojzych M, Kontek R. Focus on UV-Induced DNA Damage and Repair-Disease Relevance and Protective Strategies. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 1;21(19):7264. doi: 10.3390/ijms21197264. PMID: 33019598; PMCID: PMC7582305.

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol*. 2011; 13: 132–141.

Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 2015; 125: 25–32.

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012 Apr;8(4):445-544. doi: 10.4161/auto.19496. PMID: 22966490; PMCID: PMC3404883.

Komlósi ZI, van de Veen W, Kovács N, Szűcs G, Sokolowska M, O'Mahony L, Akdis M, Akdis CA. Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma. *Mol Aspects Med*. 2022 Jun;85:100995.

Kumar AV, Mills J, Lapierre LR. Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Feb 14;10:793328. doi: 10.3389/fcell.2022.793328. PMID: 35237597; PMCID: PMC8883344.

Lakey PS, Berkemeier T, Tong H, Arangio AM, Lucas K, Pöschl U, Shiraiwa M. Chemical exposure-response relationship between air pollutants and reactive oxygen species in the human respiratory tract. *Sci Rep*. 2016 Sep 8;6:32916.

Larsen BD, Benada J, Yung PYK, Bell RAV, Pappas G, Urban V, Ahlskog JK, Kuo TT, Janscak P, Megeney LA, Elsässer SJ, Bartek J, Sørensen CS. Cancer cells use self-inflicted DNA breaks to evade growth limits imposed by genotoxic stress. *Science*. 2022 Apr 29;376(6592):476-483.

Lee YS, Doonan BB, Wu JM, Hsieh TC. Combined metformin and resveratrol confers protection against UVC-induced DNA damage in A549 lung cancer cells via modulation of cell cycle checkpoints and DNA repair. *Oncol Rep*. 2016 Jun;35(6):3735-41.

Lederer DJ, Martínez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*. 2018; 378(19): 1811–1823.

Leung CC, Yu ITS, Chen W. Silicosis. *The Lancet*. 2012; 379(9830): 2008-2018.

Li P, Shi J, He Q, Hu Q, Wang YY, Zhang LJ, Chan WT, Chen WX. Streptococcus pneumoniae induces autophagy through the inhibition of the PI3K-I/Akt/mTOR pathway and ROS hypergeneration in A549 cells. *PLoS One*. 2015; 10: e0122753.

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 Aug 1; 313(2): L207-L217.

Lippai M, Lów P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:832704.

Liu L, Han C, Yu H, Zhu W, Cui H, Zheng L, Zhang C, Yue L. Chloroquine inhibits cell growth in human A549 lung cancer cells by blocking autophagy and inducing mitochondrial mediated apoptosis. *Oncol Rep*. 2018 Jun;39(6):2807-2816. doi: 10.3892/or.2018.6363. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29658606.

Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein

degradation. *Cell Mol Biol Lett*. 2016 Dec 13;21:29. doi: 10.1186/s11658-016-0031-z. PMID: 28536631; PMCID: PMC5415757.

López-Rodríguez E, Pérez-Gil J. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1832(6): 1568-1585.

Maciel M, Hernández-Barrientos D, Herrera I, Selman M, Pardo A, Cabrera S. Impaired autophagic activity and ATG4B deficiency are associated with increased endoplasmic reticulum stress-induced lung injury. *Aging (Albany NY)*. 2018 Aug 27; 10(8): 2098–2112.

Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell*. 2011 Oct 21;44(2):279-89. doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.039. PMID: 22017874.

Morell F, Villar A, Montero MA, et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis in patients diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective case-cohort study. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 685–694.

Muciño-Hernández G, Acevo-Rodríguez PS, Cabrera-Benitez S, Guerrero AO, Merchant-Larios H, Castro-Obregón S. Nucleophagy contributes to genome stability through degradation of type II topoisomerases A and B and nucleolar components. *J Cell Sci*. 2023 Jan 1;136(1):jcs260563.

Mukhopadhyay S. Usual interstitial pneumonia (UIP): a clinically significant pathologic diagnosis. *Mod Pathol*. 2022 May;35(5):580-588. doi: 10.1038/s41379-022-01053-3. Epub 2022 Feb 28. PMID: 35228663.

Murray V, Chen JK, Chung LH. The Interaction of the Metallo-Glycopeptide Anti-Tumour Drug Bleomycin with DNA. *Int J Mol Sci*. 2018 May 4;19(5):1372. doi: 10.3390/ijms19051372. PMID: 29734689; PMCID: PMC5983701.

Münz C. The macroautophagy machinery in endo and exocytosis. *Journal of molecular biology*. 2017; 429(4): 473-485.

Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, Rosas IO, Morse D. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Plos One*. 2012; 7:e41394.

Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem.* 2010 Feb 19;285(8):5941-53. doi: 10.1074/jbc.M109.039925. Epub 2009 Dec 15. PMID: 20018885; PMCID: PMC2820819.

Paul TT. DNA damage and regulation of protein homeostasis. *DNA Repair (Amst).* 2021 Sep;105:103155. doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103155. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34116476; PMCID: PMC8364502.

Peden DB. The "envirome" and what the practitioner needs to know about it. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019 Dec;123(6):542-549.

Pham DL, Ban GY, Kim SH, Shin YS, Ye YM, Chwae YJ, Park HS. Neutrophil autophagy and extracellular DNA traps contribute to airway inflammation in severe asthma. *Clin Exp Allergy.* 2017 Jan;47(1):57-70.

Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science.* 2019 Nov 15;366(6467):818-822. doi: 10.1126/science.aax3769. Epub 2019 Nov 14. PMID: 31727826.

Reinhardt HC, Yaffe MB. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Apr;21(2):245-55. doi: 10.1016/j.ceb.2009.01.018. Epub 2009 Feb 21. PMID: 19230643; PMCID: PMC2699687.

Riches DW, Martin TR. Overview of Innate Lung Immunity and Inflammation. *Methods Mol. Biol.* 2018;1809:17-30.

Riffelmacher T, Richter FC, Simon AK. Autophagy dictates metabolism and differentiation of inflammatory immune cells. *Autophagy.* 2018;14(2):199-206

Rhodes CE, Denault D, Varacallo M. Physiology, Oxygen Transport. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538336/>

Rockx DA, Mason R, van Hoffen A, Barton MC, Citterio E, Bregman DB, van Zeeland AA, Vrieling H, Mullenders LH. UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S*

A. 2000 Sep 12;97(19):10503-8. doi: 10.1073/pnas.180169797. PMID: 10973477; PMCID: PMC27054.

Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.* 2014 Jan 23;53(2):167-78. doi: 10.1016/j.molcel.2013.12.014. PMID: 24462201.

Rosmark O, Kadefors M, Dellgren G, Karlsson C, Ericsson A, Lindstedt S, Malmström J, Hallgren O, Larsson-Callerfelt AK, Westergren-Thorsson G. Alveolar epithelial cells are competent producers of interstitial extracellular matrix with disease relevant plasticity in a human in vitro 3D model. *Sci Rep.* 2023 May 31;13(1):8801.

Ross MH, Pawlina W. *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology.* Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins. 2018.

Stanzione N, Fishbein GA. (2022). Hypersensitivity Pneumonitis Versus Usual Interstitial Pneumonia. In: Xu, H., Ricciotti, R.W., Mantilla, J.G. (eds) *Practical Lung Pathology. Practical Anatomic Pathology.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-14402-8_39

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000 Feb;45(3):528-37. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00384-3. PMID: 10728374.

Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res.* 2002;3(1):3. doi: 10.1186/rr175. Epub 2001 Oct 11. PMID: 11806838; PMCID: PMC64814.

Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Jun;3(4):364-72. doi: 10.1513/pats.200601-003TK. PMID: 16738202.

Selman M, Pardo A. The leading role of epithelial cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Signal.* 2020 Feb;66:109482.

Selman M, Pardo A. From pulmonary fibrosis to progressive pulmonary fibrosis: a lethal pathobiological jump. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2021 Sep 1;321(3): L600-L607.

Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol*. 2004 Sep;24(18):8055-68. doi: 10.1128/MCB.24.18.8055-8068.2004. PMID: 15340068; PMCID: PMC515032.

Sharma P, Alizadeh J, Juarez M, Samali A, Halayko AJ, Kenyon NJ, Ghavami S, Zeki AA. Autophagy, Apoptosis, the Unfolded Protein Response, and Lung Function in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Cells*. 2021 Jun 30;10(7):1642.

Shi X, Wei W, Wang N. Tremella polysaccharides inhibit cellular apoptosis and autophagy induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in A549 cells through sirtuin 1 activation. *Oncology Letters*. 2018; 15(6): 9609-9616.

Shin J. P62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism. *Arch Pharm Res*. 1998 Dec;21(6):629-33. doi: 10.1007/BF02976748. PMID: 9868528.

Sinha RP, Häder DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 2002 Apr;1(4):225-36. doi: 10.1039/b201230h. PMID: 12661961.

Stock CJW, Hoyles RK, Daccord C, Kokosi M, Visca D, De Lauretis A, Alfieri V, Kouranos V, Margaritopoulos G, George PM, Molyneaux PL, Chua F, Maher TM, Abraham DJ, Ong V, Donovan J, Sestini P, Denton CP, Wells AU, Renzoni EA. Serum markers of pulmonary epithelial damage in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease and disease progression. *Respirology*. 2021 May;26(5):461-468

Tata PR, Rajagopal J. Plasticity in the lung: making and breaking cell identity. *Development*. 2017; 144: 755-766.

Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, Chang S, Conley SD, Mori Y, Seita J, Berry GJ, Shrager JB, Metzger RJ, Kuo CS, Neff N, Weissman IL, Quake SR, Krasnow MA. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature*. 2020 Nov;587(7835):619-625.

Trigo MM, Jato V, Fernández D, Galán C. Atlas aeropalínológico de España. España: Universidad de León; 2008. 95 p.

Tsukui T, Sun KH, Wetter JB, Wilson-Kanamori JR, Hazelwood LA, Henderson NC, Adams TS, Schupp JC, Poli SD, Rosas IO, Kaminski N, Matthay MA, Wolters PJ, Sheppard D. Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat Commun.* 2020 Apr 21; 11(1): 1920.

Vasakova M, Selman M, Morell F, Sterclova M, Molina-Molina M, Raghu G. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts of pathogenesis and potential targets for treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2019; 200(3): 301-308.

Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, Subramanian IM, Martinez FJ, Toews GB, Thannickal VJ. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J.* 2005 May;19(7):854-6. doi: 10.1096/fj.04-2882fje. Epub 2005 Feb 16. PMID: 15857893.

Wang K, Zhang T, Lei X, Li J, Jiang J, Lan J, Liu Y, Chen H, Gao W, Xie N, Chen Q, Zhu X, Liu X, Kie K, Peng Y, Nice EC, Wu M, Huang C, Wei Y. Identification of ANXA2 (annexin A2) as a specific bleomycin target to induce pulmonary fibrosis by impeding TFEB-mediated autophagic flux. *Autophagy.* 2018; 14(2): 269-282.

Wang L, Howell MEA, Sparks-Wallace A, Hawkins C, Nicksic C, Kohne C, Hall KH, Moorman JP, Yao ZQ, Ning S. p62-mediated Selective autophagy endows virus-transformed cells with insusceptibility to DNA damage under oxidative stress. *PLoS Pathogens.* 2019; 15(4):e1007541.

Wang Y, Lin Z, Huang H, He H, Yang L, Chen T, Yang T, Ren N, Jiang Y, Xu W, Kamp DW, Liu T, Liu G. AMPK is required for PM2.5-induced autophagy in human lung epithelial A549 cells. *International journal of clinical and experimental medicine.* 2015; 8(1): 58-72.

Wang Y, Zhang N, Zhang L, Li R, Fu W, Ma K, Li X, Wang L, Wang J, Zhang H, Gu W, Zhu WG, Zhao Y. Autophagy Regulates Chromatin Ubiquitination in DNA Damage Response through Elimination of SQSTM1/p62. *Mol Cell.* 2016 Jul 7; 63(1): 34-48.

Wikenheiser KA, Vorbroker DK, Rice WR, Clark JC, Bachurski CJ, Oie HK, Whitsett JA. Production of immortalized distal respiratory epithelial cell lines from surfactant protein C/simian virus 40 large tumor antigen transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 1;90(23):11029-33. doi: 10.1073/pnas.90.23.11029. PMID: 8248207; PMCID: PMC47915.

White ES. Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Mar;12 Suppl 1(Suppl 1): S30-33.

Whitsett J, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol.* 2015; 16:27–35.

Wijsenbeek M, Suzuki A, Maher TM. Interstitial lung diseases. *Lancet.* 2022 Sep 3;400(10354):769-786.

Yue YL, Zhang MY, Liu JY, Fang LJ, Qu YQ. The role of autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis: from mechanisms to therapies. *Ther Adv Respir Dis.* 2022 Jan-Dec;16:17534666221140972. doi: 10.1177/17534666221140972. PMID: 36468453; PMCID: PMC9726854.

Zarcone MC, Duistermaat E, Alblas MJ, van Schadewijk A, Ninaber DK, Clarijs V, Moerman MM, Vaessen D, Hiemstra PS, Kooter IM. Effect of diesel exhaust generated by a city bus engine on stress responses and innate immunity in primary bronchial epithelial cell cultures. *Toxicol In Vitro.* 2018 Apr;48:221-231.

Zhang Y, Mun SR, Linares JF, Ahn J, Towers CG, Ji CH, Fitzwalter BE, Holden MR, Mi W, Shi X, Moscat J, Thorburn A, Diaz-Meco MT, Kwon YT, Kutateladze TG. ZZ-dependent regulation of p62/SQSTM1 in autophagy. *Nat Commun.* 2018 Oct 22;9(1):4373.