



UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLAS DE  
HIDALGO



FACULTAD DE QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

**“Participación de la Toxina PumA codificada por el  
plásmido PUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* en la  
fibrosis pulmonar”**

TESIS

Para obtener el título de:

Licenciatura en Quimicofarmacobiología.

Presenta:

Fabiola Lemus Vázquez.

Asesores:

D.C. Víctor Meza Carmen  
D.C. Martha Isela Ramírez Díaz

Morelia, Michoacán. Enero 2021

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi mentor en este trabajo, al D.C. Víctor Meza Carmen quien fue una persona muy importante en el trayecto de mi carrera profesional, al D.C. Rafael Ortiz Alvarado quien resolvió siempre mis dudas y estuvo siempre en la mejor disposición para ayudar en el desarrollo de este trabajo, también quiero agradecer al D.C. Marco Iván Valle Maldonado gracias a este proyecto tuvimos una maravillosa amistad. Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de la Q.F.B Karen Cecilia Hernández Ramírez, D.C. Martha Isela Ramírez Díaz, Q.F.B. Verónica Gómez Ruiz entre otras personas sumamente importantes, además quiero agradecer infinitamente a mi familia en especial a mi abuelita Elena quien me ha apoyado hasta la culminación de mi carrera, a mi novio Cesar Ramírez por estar las incontables noches de desvelo a mi lado, pero sobre todo este trabajo está dirigido a mi abuelito Juan Lemus León, quien desde el cielo sé que esta orgulloso de tener a su “científica” .

## Resumen

La fibrosis pulmonar es un problema de salud a nivel mundial, las causas son de diversa etiología. Se produce cuando se daña el tejido pulmonar, en dichas lesiones se deposita de manera descontrolada colágeno el cual genera cicatrices. Este tejido cicatrizado es rígido haciendo difícil la función pulmonar de manera correcta. A medida que la fibrosis pulmonar empeora, empeora la capacidad respiratoria. La proteína codificada por el orf123 del plásmido pUM505 aislado de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa*, es capaz de incrementar la virulencia bacteriana en ratones y en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, cuyo efecto es neutralizado por el producto del orf124. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista frecuentemente aislado de pulmones de pacientes con fibrosis quística. En este estudio administramos mediante vía intranasal bleomicina o las proteínas codificadas por los Orfs 123 y 124. Posteriormente se obtuvieron cortes de pulmones de los ratones y las muestras del tejido fueron teñidos con la técnica de tricrómica de Masson. El tejido mostró una mayor acumulación de colágeno en el tejido pulmonar de ratones a los que les fue administrada la bleomicina, así como también, pero en menor grado aquellos con la proteína Orf123, respecto a los otros tratamientos, sugiriendo que la proteína Orf123 ocasiona la degeneración del tejido pulmonar. Además, se determinaron los niveles de RNAm del gen que codifica a la subunidad alfa del colágeno tipo I mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real, encontrando que la bleomicina y la proteína Orf123 (en menor grado) generaron la mayor acumulación de RNAm en comparación con el tejido de ratones que fueron administrados con la proteína Orf124. Estos datos, aunque preliminares, apuntan a la posible participación de la

proteína Orf123 en un proceso de degeneración del tejido pulmonar y quizás en la génesis y/o progresión de la fibrosis pulmonar.

## **Abstract**

Pulmonary fibrosis is a global health problem, the causes are of diverse etiology. It occurs when the lung tissue is damaged, in these injuries collagen is deposited in an uncontrolled way which generates scars. This scar tissue is rigid making it difficult for the lungs to function. As pulmonary fibrosis worsens, as well the respiratory capacity. The protein encoded by the orf123 of the plasmid pUM505 isolated from a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*, is capable of increasing bacterial virulence in mice and in the nematode *Caenorhabditis elegans*, whose effect is neutralized by the product of orf124. *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen frequently isolated from the lungs of patients with cystic fibrosis. In this study, we administered bleomycin or the proteins encoded by Orfs 123 and 124 by intranasal route. Subsequently, sections of the lungs of the mice were obtained and the tissue samples were stained with the Masson trichrome technique. The tissue showed a greater accumulation of collagen in the lung tissue of mice to which bleomycin was administered, as well as, but to a lesser extent, those with the Orf123 protein, compared to the other treatments, suggesting that the Orf123 protein causes the degeneration of lung tissue. In addition, mRNA levels were determined of the gene that encodes the alpha subunit of type I collagen real-time RT-PCR technique, finding that bleomycin and the Orf123 protein- encoding gene (to a lesser degree) generated the highest accumulation of mRNA compared to the tissue from mice that were administered with the Orf124 protein. These data, although preliminary, point

to the possible participation of the Orf123 protein in a process of degeneration of lung tissue and perhaps in the genesis and / or progression of pulmonary fibrosis.

**PALABRAS CLAVE**

*pseudomonas aeruginosa*, Toxina, Antitoxina, Fibrosis, Orf123.

## A. ÍNDICE

<b>A.-Índice.....</b>	<b>6</b>
<b>B.- Índice de figuras.....</b>	<b>8</b>
<b>C.- Índice de tablas.....</b>	<b>8</b>
<b>I.- Introducción.....</b>	<b>9</b>
1.1.1-Generalidades de la fibrosis.....	9
1.1.2.- Tipos de fibrosis.....	9
1.1.3.-Fibrosis pulmonar.....	12
1.1.4- Posibles factores de riesgo para el establecimiento de la fibrosis pulmonar idiopática FPI.....	15
1.1.5.- Factores ambientales y ocupacionales relacionados con la fibrosis pulmonar idiopática.....	16
1.1.6.- Reflujo gastroesofágico en la fibrosis pulmonar idiopática.....	17
1.1.7.- Infecciones víricas y fibrosis pulmonar idiopática.....	17
1.1.8.- Autoinmunidad y fibrosis pulmonar idiopática.....	18
1.1.9.- Diabetes y fibrosis pulmonar idiopática.....	19
1.2.- Fibrosis Quística.....	20
1.2.1.-Agentes microbianos asociados a fibrosis quística.....	21
1.2.2 <i>Pseudomona aeuroginosa</i> .....	25
1.2.3.- Factores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i> .....	27
1.2.4.- <i>P. aeuroginosa</i> en fibrosis quística pulmonar.....	29

<b>II.- ANTECEDENTES</b> .....	31
2.1.1- Sistema Toxina Antitoxina (PumA-PumB) del plásmido PUM505 de <i>P. aeruginosa</i> .....	31
<b>III.- Justificación</b> .....	34
<b>IV.- Hipotesis</b> .....	34
<b>V.- Objetivo General</b> .....	34
5.1.1.- Objetivos específicos.....	34
<b>VI.-Materiales y Metodos</b> .....	35
6.1.1- Manipulación de ratones.....	35
6.1.2.- Purificación de proteínas recombinantes PumA-His y PumB-His.....	35
6.1.3.- Inoculación a ratones de bleomicina y con las proteínas recombinantes por vía intranasal.....	35
6.1.4.- Análisis de RT-PCR en tiempo Real.....	36
6.1.5.- Análisis de cortes histológicos de ratón mediante la técnica tricrómica de Masson.....	37
<b>VII.- Resultados</b> .....	38
7.1.1.- Evaluación del peso de los ratones tratados.....	38
7.1.2.- La antitoxina induce acumulación de colágeno en el tejido pulmonar... 40	
7.1.3.- La antitoxina induce un incremento en los niveles de RNAm de la cadena alfa del colágeno de tipo I.....	43
<b>VIII.- Discusión</b> .....	50
<b>IX.- Referencias</b> .....	53

## B. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Daño alveolar por fibrosis pulmonar idiopática.....	14
Figura 2. Contexto genético general de loci TA.....	32
Figura 3. Cambios en el peso de los ratones.....	41
Figura 4. Análisis histológico mediante la técnica tricrómica de Masson.....	42
Figura 5. Determinación de la acumulación del RNAm.....	44
Figura 6. Marco de lectura abierto del gen <i>actB</i> que codifica a la actina □□ de <i>Mus musculus</i> .....	45
Figura 7. Determinación de la acumulación del RNAm del gen que codifica a la cadena alfa colágeno tipo I en los tejidos pulmonares de ratón.....	46

## C. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Factores de riesgo para la generación de FPI.....	20
Tabla 2. taxones principales en microbiomas de fibrosis quística.....	25
Tabla 3. Sondas de hidrólisis usadas para análisis de cuantificación de RNAm.....	37
Tabla 4. Registro del peso de los ratones durante la administración por vía intranasal de las dosis al 100% de bleomicina, toxina, antitoxina y Buffer D...	39
Tabla 5. Administración de diferentes concentraciones de la toxina (PumA) o antitoxina (PumB) en presencia de bleomicina al 20 %.....	48
Tabla 6. Registro de pesos de los ratones durante la administración por vía intranasal de bleomicina al 20%.....	49

## **I.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.1. GENERALIDADES DE LA FIBROSIS**

La fibrosis es un desarrollo patológico de un tejido sano a un estado fibrotico, es decir, el tejido sano empieza a aumentar la síntesis y acumulación de matriz extracelular generando una disfunción celular (Zeisberg y Kalluri, 2013).

Esta degeneración celular se forma a partir de una inflamación crónica o de un problema circulatorio que provoca un incremento de la producción de colágeno por parte de las células de un tejido determinado. Debido a la fibrosis, la estructura del tejido aumenta de grosor ya que el tejido conectivo, llamado fibrótico, crece (Pérez y Merino, 2017). La progresión de enfermedades crónicas en órganos parenquimatosos como el hígado, los riñones, el corazón y los pulmones se asocian con fibrosis (Zeisberg y Kalluri, 2013).

### **1.1.2. TIPOS DE FIBROSIS ACORDE AL LUGAR ANATOMICO**

#### **Fibrosis del hígado**

La fibrosis hepática en sí no causa síntomas, pero una cicatrización extendida puede dar lugar a una cirrosis, la cual sí puede causar síntomas. La fibrosis se desarrolla cuando el hígado sufre un daño de forma repetida o continua, en donde las células hepáticas intentan reparar el daño, pero los intentos dan lugar a tejido cicatricial. La fibrosis aparece más rápidamente cuando su causa es una obstrucción de las vías biliares. Esta condición es causada generalmente por el alcoholismo, la enfermedad del hígado graso, hepatitis B o hepatitis C (Domínguez y col., 2019).

### **Fibrosis del corazón**

La fibrosis en el corazón o también llamada endomiocárdica es una causa frecuente de miocardiopatía restrictiva. Está presente en la región del África ecuatorial, esta enfermedad se caracteriza por el engrosamiento fibroso del endocardio que de manera ocasional se extiende al miocardio subyacente, localizado fundamentalmente en el ápex y el tracto de entrada y que afecta a veces a los músculos papilares y a las cuerdas tendinosas, lo que conduce a una función cardíaca disminuida y en casos graves la muerte del paciente (Douglas, 2019).

### **Fibrosis mediastínica**

Esta enfermedad es poco frecuente y se caracteriza por la proliferación de tejido fibroso en la región del mediastino. Existen formas focales y difusas, los síntomas se producen por compresión de estructuras adyacentes: esófago, tráquea, nervio recurrente y vena cava superior, provocando en este último caso el síndrome de la vena cava superior, el cual es el conjunto de signos y síntomas derivados de la obstrucción de la vena cava superior que ocasiona un aumento de la presión venosa en la parte superior del cuerpo, en los casos más graves produce edema (hinchazón) de los miembros inferiores y ascitis (acumulación de líquidos en la región abdominal) (Wilson y col., 2007).

La causa es desconocida en la mayoría de las ocasiones. A veces, puede ser consecuencia de otros procesos como histoplasmosis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, algunos fármacos como la metisergida, alfametildopa,

hidralacina, bromocriptina, y determinados medicamentos antineoplásicos (Pérez y Merino, 2017).

### **Fibrosis retroperitoneal idiopática**

La fibrosis retroperitoneal idiopática (FRI) es una entidad clínica de presentación poco frecuente que suele cursar con uropatía obstructiva. El tejido fibroso de la FRI está formado por un infiltrado inflamatorio caracterizado por miofibroblastos, que se dispone de manera perivascular y contiene linfocitos, macrófagos, células plasmáticas y eosinófilos. Los uréteres suelen quedar atrapados en ese tejido fibroso, siendo la causa de la uropatía obstructiva y de la consiguiente pielonefritis crónica ascendente. En la última década parece haber mejorado el pronóstico de esta enfermedad con distintos tratamientos ensayados y con los procedimientos derivados de las vías urinarias (Rodríguez y col., 2009).

### **Fibrosis de la médula**

La mielofibrosis (MF) pertenece a un grupo de tipos de cáncer de la sangre estrechamente relacionados, conocidos como “neoplasmas mieloproliferativos” (MPN, por sus siglas en inglés), en los que las células de la médula ósea productoras de células sanguíneas del cuerpo se desarrollan y funcionan de forma anormal. El resultado es la formación de tejido fibroso (cicatricial) excesivo en la médula ósea, que puede provocar anemia seria, debilidad, fatiga e inflamación del bazo y del hígado (Pettit y odenike, 2017).

## **Fibrosis pulmonar**

La fibrosis pulmonar es una enfermedad en donde el tejido pulmonar cicatriza excesivamente y, por lo tanto, se vuelve grueso y duro. Esto produce dificultades para respirar y es posible que la sangre no reciba suficiente oxígeno.

Los análisis de la función pulmonar, por espirometría, puede encontrar una disfunción pulmonares y alteraciones en el intercambio de gases. Aunque aún hay lagunas en el conocimiento del por qué se genera esta enfermedad, existen ciertos riesgos que correlacionan con la aparición de esta enfermedad, por ejemplo, el tabaco. el riesgo de padecer fibrosis pulmonar. Al parecer depende de los cigarrillos y el tiempo del uso del mismo por parte del fumador(a). También se ha encontrado relación con algunos medicamentos comunes, como los antidepresivos. El reflujo del ácido gástrico va hacia la vía respiratoria de forma crónica (Sánchez, 2004).

### **1.1.3. FIBROSIS PULMONAR**

El síndrome clásico de una fibrosis pulmonar difusa y progresiva que irremediablemente conduce a la muerte por insuficiencia respiratoria fue descrito en 1944 por Hamman y Rich. Aunque existen casos de evolución benigna que pueden durar hasta 15 y 20 años, la gran mayoría de los casos posee una evolución muy severa con un promedio de supervivencia de 3-5 años, luego de comenzar la disnea y a pesar del tratamiento médico (Olson y col., 2003).

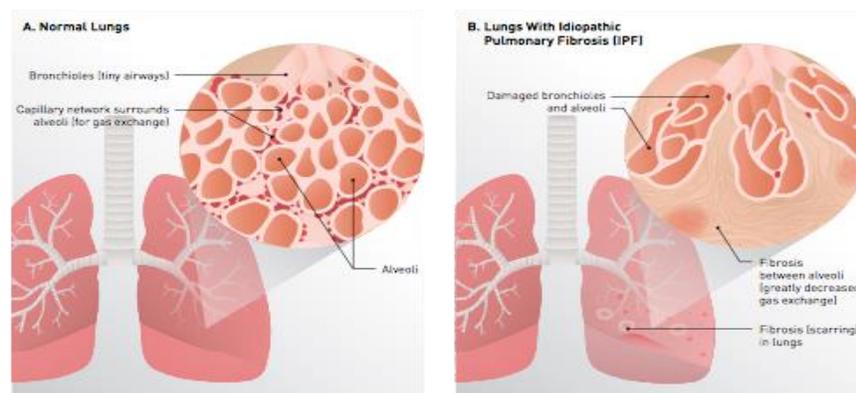
Dentro de los tipos de fibrosis pulmonar tenemos a la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la cual es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de una respuesta fibroproliferativa pulmonar difusa con pocos signos de inflamación y que conduce a una rápida destrucción del parénquima neumónico; esta pertenece a una familia de aproximadamente 200 enfermedades relacionadas, denominada como enfermedades pulmonares intersticiales (EPI), que tienen características similares y pueden ocasionar cicatrización, siendo la FPI la que presenta mayor mortalidad pues la mitad de los pacientes fallecen a los cinco años de su diagnóstico. Esta enfermedad es conocida igualmente como alveolitis fibrosante criptógena (Sánchez, 2004).

En el 2011, la Sociedad Americana Torácica / Sociedad Respiratoria Europea emitió un nuevo esquema de clasificación en el que definieron a la FPI como una forma específica de neumonía intersticial brocante progresiva crónica de etiología desconocida, que ocurre principalmente en adultos mayores y se asocia con enfermedades radiológicas y / o el patrón histopatológico de neumonía intersticial habitual (UIP) (Raghu y col., 2011).

Algunas veces, la fibrosis pulmonar puede relacionarse con situaciones como exposición a agentes físicos, químicos o biológicos, como son el polvo metálico, polvo de madera, gases o humos, quimioterapia o radioterapia, infección residual, enfermedades del tejido conectivo, como lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide. Sin embargo, en la mayoría de los casos de fibrosis pulmonar no puede establecerse una causa conocida. Cuando la fibrosis pulmonar no tiene causa conocida, se denomina "fibrosis pulmonar idiopática" o FPI, el término "idiopático" significa "de causa desconocida". La FPI lleva consigo un patrón histopatológico

específico, que constituye el perfil clásico de la biopsia pulmonar en casos de fibrosis idiopática. El análisis del tejido observado al microscopio muestra ser un tejido es heterogéneo, mostrando alternancias de zonas de tejido pulmonar normal y otras de inflamación intersticial, fibrosis y aspecto de “panal” (Figura 1).

La inflamación intersticial corresponde a un infiltrado de los septos alveolares por linfocitos, células plasmáticas e histiocitos, acompañado de hiperplasia de los neumocitos tipo II. Las zonas fibróticas aparecen compuestas, sobre todo de colágeno acelular denso, aunque se pueden observar focos aislados de proliferación fibroblástica (área de enfermedad inicial activa) especialmente intra alveolar. Las regiones de pulmón en panal corresponden a espacios aéreos fibróticos quísticos, revestido con frecuencia por epitelio bronquiolar y rellenos de moco con acumulación de neutrófilos. En las zonas de fibrosis y panal que suele observar hiperplasia del músculo liso. La distribución paraseptal y subpleural en forma de “parche” y la heterogeneidad temporal resultan muy útiles para diagnosticar una neumonía intersticial habitual (Figura 1) (Sánchez, 2004).



**Figura 1.** Daño alveolar por fibrosis pulmonar idiopática (tomado de Glassberg, 2019).

#### 1.1.4. POSIBLES FACTORES DE RIESGO DE FIBROSIS PULMONAR

##### IDIOPATICA (FPI)

###### **Factores genéticos en la fibrosis pulmonar idiopática**

Recientes estudios han identificado variantes genéticas asociadas con formas de fibrosis pulmonar esporádicas y familiares, con al menos un tercio del riesgo de desarrollar fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Los loci genéticos asociados con FPI están implicados en diversos procesos biológicos, incluyendo la estabilidad alveolar, defensas del huésped, barreras entre células y envejecimiento celular (Kaur y col., 2017).

La predisposición genética se fundamenta en que existen formas familiares de FPI (>5 % de los casos), en las cuales se han demostrado mutaciones genéticas. También se han encontrado diversas alteraciones genéticas con una posible relación con los casos esporádicos.

Las alteraciones genéticas más importantes son las siguientes (Kaur y col., 2017):

- Mutaciones en los genes que codifican a la telomerasa (*TERT*, *TERC*, *DKC1*, *TINF2*). Estas mutaciones originan telómeros cortos.
- Mutaciones en los genes de la proteína C y A2 del surfactante, las que generan alteración del tráfico vesicular y alteración de la proteólisis, aumentan el estrés del retículo endoplásmico (ER).
- Mutaciones en el activador del gen que codifica la mucina B (*MUC5B*), la sobreexpresión de *MUC5B* en la FPI, genera disfunción mucociliar, retención de

partículas, estrés del RE y la interrupción de los mecanismos reparadores y regenerativos normales en el pulmón distal.

- Alteraciones en los *locus* *FAM13A* (4q22) (Transducción de señales), *DSP* (6p24) (uniones estrechas entre células), *OBFC1* (10q24) (estimula la actividad de la ADN polimerasa-alfa-primasa), *ATP11A* (13q34) (Translocación de fosfolípidos), *DPP9* (19p13) (adhesiones célula-célula), la cuales participan en la génesis de la FPI.

Sin embargo, a pesar de este conocimiento, aún permanece elusivo la participación exacta a nivel molecular de cómo estos factores genéticos participan en la génesis de la FPI.

### **1.1.5. Factores ambientales y ocupacionales relacionados con la fibrosis pulmonar idiopática**

Existen diversos posibles factores medioambientales e infecciosos de riesgo para la generación de la FPI. El tabaco es un factor de riesgo claramente relacionado con la FPI, sobre todo, en fumadores de más de 20 paquetes al año (Ley y collard, 2013; Macneal y Schwartz, 2012; Lee, 2011). Parece que el riesgo persiste incluso después de haber dejado de fumar (Lee, 2011).

Por otro lado, muchos factores ambientales han demostrado aumentar el riesgo de sufrir FPI. Algunos de ellos son el polvo de diversos metales (como el latón, el plomo, el sílice o el acero) y el polvo de madera, así como ciertas actividades laborales (ganadería, agricultura, peluquería). En la Tabla 1 se muestran los principales factores de riesgo ambientales relacionados con la FPI. No obstante,

(Raghu y col., 2011) advierten de las limitaciones y sesgos inherentes a los estudios epidemiológicos sobre factores de riesgo ambientales, por lo que recomiendan precaución a la hora de interpretar los resultados.

#### **1.1.6. Reflujo gastroesofágico en la fibrosis pulmonar idiopática**

El reflujo gastroesofágico (RGE) es muy prevalente en los pacientes con FPI (entre un 30% y un 88%) y es posible que juegue un papel en su patogenia y progresión, debido a que provoca micro aspiraciones repetidas del contenido gástrico, tanto ácido como alcalino, que dañan el epitelio alveolar (Lee, 2014). El RGE suele ser asintomático en los pacientes con FPI, por lo que el cuadro clínico típico (pirosis, regurgitación) no es útil para identificar su presencia (Macneal y Schwartz, 2012; Lee, 2014).

Por otro lado, aunque algunos estudios sugieren que el tratamiento del RGE (tanto médico como quirúrgico) puede enlentecer la progresión de la FPI y mejorar su supervivencia, las pruebas no son concluyentes y son necesarias más investigaciones (Raghu y col., 2015). De hecho, las guías de práctica clínica de la Sociedad Americana del Torax / Sociedad Respiratoria Europea entre otras (Xaubet y col., 2013), reconocen que la calidad de los tratamientos para tratar el RGE en los pacientes con FPI es baja. A pesar de ello, recomiendan tratarlo, pues el coste es razonable y los efectos secundarios escasos.

#### **1.1.7. Infecciones víricas y fibrosis pulmonar idiopática**

Se han realizado muchas investigaciones para determinar el papel de las infecciones víricas en la etiología de la FPI. Los más estudiados han sido los

herpesvirus (virus de Epstein-Barr y citomegalovirus, entre otros) y el virus de la hepatitis C. Por ejemplo, el virus Epstein-Barr (EBV) está enriquecido en el líquido de lavado broncoalveolar (BAL) y el tejido de biopsia pulmonar de pacientes con FPI en comparación con controles sanos y se cree que actúa a través de regulación positiva de la expresión de TGF $\beta$ 1 e induce propiedades mesenquimales en células epiteliales pulmonares (Desai y col., 2018).

A pesar de que algunos trabajos han reportado una asociación entre estos virus y la FPI, no existen pruebas suficientes para afirmar que sean factores etiológicos en la génesis de la FPI (Talmadge, 2018; Ley y Collard, 2013). Aunque como en el caso de aquellas personas que sufren de FPI, las infecciones de tipo viral pueden incrementar la mortalidad en dichos pacientes como se ha descrito la alta mortalidad en pacientes con PFI ante la infección por el virus SARS-COV-2 (George y col., 2020).

#### **1.1.8. Autoinmunidad y fibrosis pulmonar idiopática**

La contribución del sistema inmune a la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) sigue siendo poco conocida. Si bien la mayoría de las fuentes están de acuerdo en que IPF, no es el resultado de un mecanismo inmunopatogénico primario, la evidencia obtenida de modelos animales y estudios en humanos sugiere que los procesos inmunes innatos y adaptativos pueden orquestar la respuesta fibrótica existente (Desai y col., 2018). Debido a que el patrón histológico y radiológico de la neumonía intersticial usual se asocia a enfermedades del tejido conectivo (en especial, a la artritis reumatoide), se ha propuesto un posible origen autoinmune de la FPI, aunque

estos datos están aún sin confirmar (Oldham y Collard, 2017).

Se han detectado autoanticuerpos en pacientes con FPI, como en el caso de aquellos contra la proteína periplakina (proteína que forma parte de los desmosomas, quienes permiten la unión entre células), estando presentes en el 40% de los pacientes, aunque dichos autoanticuerpos correlacionan con la severidad de la enfermedad más no con la mortalidad. Por lo tanto, estos autoanticuerpos podrían ser desencadenantes de la enfermedad, contribuir a la patogénesis de la enfermedad, o simplemente son epifenómenos quedando por determinar su papel en la enfermedad o como biomarcadores de pronóstico clínico (Feghali-Bostwick y Wilkes, 2011).

#### **1.1.9. Diabetes y fibrosis pulmonar idiopática**

Algunas investigaciones sugieren que la diabetes es un factor de riesgo para la FPI. A nivel tisular, se ha descubierto que la diabetes induce varios cambios patológicos, incluso en la inflamación y la fibrosis. La diabetes induce cambios fibróticos en el pulmón a través de la activación de la vía, de señalización de TGF- $\beta$ , la activación de TGF- $\beta$ 1 desencadena el programa EMT (transición epitelial a mesenquimal) en células epiteliales, lo que conduce a la producción de fibroblastos y la acumulación de proteínas ECM en el tejido (Talakatta y col., 2018).

**Tabla 1. Factores de riesgo para la generación de Fibrosis Pulmonar Ideopática (FPI).**

MUTACIONES GENÉTICAS	FACTORES AMBIENTALES Y OCUPACIONALES	INFECCIONES VIRICAS	OTROS
<b>Genes de la telomerasa (<i>TERT, TERC, DKC1, TINF2</i>)</b>	Tabaco	Virus Epstein-Barr	Reflujo gastroesofágico
<b>Genes de la proteína C y A2 del surfactante</b>	Polvo de madera	Citomegalovirus	Diabetes mellitus
<b>Activador del gen que codifica la mucina B (<i>MUC5B</i>)</b>	Agricultura	Herpesvirus humanos 7 y 8	autoinmunidad
<b>Locus <i>FAM13A</i> (4q22), <i>DSP</i> (6p24), <i>OBFC1</i> (10q24), <i>ATP11A</i> (13q34), <i>DPP9</i> (19p13)</b>	Crianza de aves	Virus de la hepatitis C	
<b>Regiones cromosómicas 7q22 y 15q14-15</b>	Polvos textiles		
	Ganadería		
	Polvo de metales		

Esta información fue tomada y adaptada de (Zeisberg y Kalluri, 2013).

## 1.2 FIBROSIS QUÍSTICA.

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad recesiva autosómica más común en la población caucásica, que ocurre en aproximadamente 1 en 3500 nacimientos (Pérez y Merino, 2017). La mayoría de los pacientes se vuelven sintomáticos al nacer o poco después del nacimiento y las infecciones respiratorias y el aumento de peso deficiente son la presentación más frecuente. La FQ es una enfermedad monogénica que implica mutaciones de ambas copias del gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que se hereda de manera autosómica recesiva. El gen *CFTR* se conoce desde hace más de 30 años y la detección de mutaciones para la FQ ahora es una técnica de rutina (Françoise y Héry-Arnaud, 2020). El diagnóstico por lo general involucra una prueba del sudor. Una concentración de cloruro en el sudor superior

a 60 mmol/L es diagnóstico de FQ. Otras manifestaciones de la enfermedad clásicas son la pérdida excesiva de sal a través del sudor y la infertilidad masculina. Las enfermedades respiratorias son la manifestación más grave y la causa más frecuente de muerte o trasplante de pulmón en la edad adulta temprana. También incluyen infecciones pulmonares crónicas con patógenos específicos y la inflamación excesiva que conduce a bronquiectasias, la disminución de la función pulmonar e insuficiencia respiratoria, finalmente (Douglas, 2019). Los patógenos de FQ prevalentes incluyen *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Mehta y col., 2010; Boeck y col., 2017.; Goetz y Ren, 2019).

Según la Fundación de Fibrosis Quística, hay aproximadamente 30,000 personas que viven con FQ en los Estados Unidos y más de 70,000 en todo el mundo. (Boeck, 2017). En México, 400 personas nacen anualmente con esa enfermedad, pero solamente el 15% de ellos son diagnosticados en vida, según datos de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ).

### **1.2.1. AGENTES MICROBIANOS ASOCIADOS A FIBROSIS QUISTICA**

#### **Hongos**

##### ***Aspergillus spp.***

*Aspergillus spp.* se encuentran entre los hongos filamentosos más extendidos en el medio ambiente, especialmente en áreas con alta humedad (Raghu y col., 2015). En pacientes con FQ, la especie aislada con mayor frecuencia es *Aspergillus fumigatus*, que representa el 67%-73% de los cultivos de esputo positivo de

*Aspergillus* (Xaubet y col., 2013). El aislamiento de otras especies como como *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* es menos frecuente pero no raro (siendo de 4%, 4% y 2% de los cultivos de esputo *Aspergillus*-positivo, respectivamente) (Xaubet y col., 2013). Notablemente, la prevalencia de aislamiento de *Aspergillus spp.* de los cultivos de esputo en pacientes con FQ aumenta con la edad, posiblemente alcanzando 46%-78% en pacientes adultos con FQ, aunque con una importante variabilidad interregional y entre centros (Oldham y Collard, 2017; Boeck y col., 2017).

### ***Lomentospora prolificans***

Anteriormente conocido como *Scedosporium prolificans*, este hongo tiene mucho en común con sus ex-coespecies, en términos de epidemiología y patogenicidad, aunque difiere mucho en términos de susceptibilidad antifúngica, siendo resistente a la anfotericina B, flucitosina, la mayoría de los azoles y equinocandinas. Este hongo tiene cierta distribución geográfica, siendo aislado con mayor frecuencia en Australia, el norte de España y en los Estados Unidos, aunque también se ha informado de su aislamiento del tracto respiratorio de la FQ en otros países como Alemania. Como se observó para otros, *Lomentospora prolificans* generalmente causa colonización transitoria o permanente del tracto respiratorio de pacientes con FQ, pero puede desarrollarse una enfermedad invasiva con alta mortalidad (> 65%) en un estado de inmunosupresión severa, y algunos centros consideran el aislamiento de *L. prolificans* como una posible contraindicación para el trasplante, debido a su perfil resistente a múltiples fármacos. Se han utilizado diversos regímenes con antifúngicos disponibles en pacientes con infección invasiva por *L. prolificans*, con frecuencia con resultados insatisfactorios, por lo que en la

actualidad, se están estudiando nuevos antifúngicos con posible actividad contra *L. Prolificans* (Rammaert y col., 2019).

### ***Candida spp.***

La prevalencia del aislamiento de levaduras de *Candida* del tracto respiratorio de pacientes adultos con FQ puede ser hasta del 93%, lo que lo convierte en el hongo más comúnmente aislado en esta población. El uso prolongado de la terapia con antibióticos parece ser uno de los principales factores asociados con *Candida spp.* *C. albicans* es la especie aislada más común en pacientes con FQ, aunque también se han reportado frecuencias no despreciables de *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Delfino, 2019).

### **Bacterias**

La superficie epitelial del tracto respiratorio, que antes se consideraba un ambiente estéril, se ha demostrado mediante el uso de técnicas de secuenciación del rRNA 16S la presencia de ADN bacteriano en el 95,7% de las muestras de lavado broncoalveolar (BAL) de personas sanas en comparación con las técnicas de cultivo convencionales, que detectaron bacterias en el 39,1% de las muestras de BAL (Fastrès y col., 2017). Las comunidades bacterianas de pulmones sanos se parecen mucho a las de la boca, con una carga microbiana de dos o cuatro veces más bajas. Los cuatro phyla más representados en las vías respiratorias normales son Bacteroidetes (incluido el género *Prevotella sp.*), Firmicutes (incluidos los géneros de *Streptococcus sp.* y *Veillonella sp.*) y, en menor medida, Proteobacteria y Actinobacteria (Fastrès y col., 2017).

Se sospecha que el microbioma desempeña un papel en la patología de la FPI. De hecho, las bacterias pueden causar lesiones alveolares epiteliales por sí solas, pero también pueden activar una respuesta inmune en cascada debido a su presencia, seguido de cascadas proinflamatorias y profibróticas resultando en alteraciones de la arquitectura pulmonar. El microbioma de los pacientes con FPI es distinto del de los individuos sanos: su carga bacteriana es en general más alta y los géneros *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria* y *Veillonella sp.* son más abundantes en pacientes con FPI en comparación con los controles (Fastrés y col., 2017).

Dentro de los patógenos bacterianos más notables en la fibrosis quística se incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y el complejo *Burkholderia cepacia* (Tabla 2) (Françoise y Héry-Arnaud, 2020).

**Tabla 2. taxones principales en microbiomas de fibrosis quística (CF), presentados de acuerdo con la taxonomía bacteriana**

	Dominio	Filo	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
FQ microbioma pulmonar	bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidea	Bacteroidales	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	<i>P. denticola</i>
						<i>Porphyromonas</i>	<i>P. catoniae</i>
		Firmicutes	Bacilo	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>S. oralis</i>
						<i>Granulicatella</i>	<i>G. adiacens</i>
						<i>Gemella</i>	<i>G.</i>
						<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolysans</i>
<i>Veillonella</i>	<i>S. aureus</i> <i>V. parvula</i>						
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
				<i>Burkholderia</i>	<i>S. maltophilis</i>		
				<i>Achimobacter</i>	<i>B. cenocepacia</i>		
				<i>Stenotrophomonas</i>	<i>A. xylooxidans</i>		
				<i>Neisseria</i>	<i>N. mucosa</i>		
<i>Haemophilus</i>	<i>H. influenzae</i>						
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i>	<i>A. odontolyticus</i>		
				<i>Rothia Atopobium</i>	<i>R.</i> <i>mucilaginoso</i> <i>A. parvulum</i>		
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i>		

(Tomada de Françoise y Héry-Arnaud, 2020).

### 1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria aerobia gram negativa/anaerobia facultativa perteneciente a la rama de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias, la cual que se encuentra ubicuamente en el suelo y en los ambientes acuáticos (Pace, 1997).

Metabólicamente, *P. aeruginosa* es oxidasa positiva (es decir, prefiere crecer en entornos aeróbicos o microaerobios) y fermentación sin lactosa, pero también es

capaz de usar nitrito o nitrato como un receptor terminal de electrones en condiciones anóxicas (Sankalp y col., 2019). Es una bacteria con un mínimo de requerimiento nutrimental y puede crecer a temperaturas por encima de los 42°C (Pier, 2005), además, es capaz de prosperar en múltiples nichos. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de aviones, soluciones de clorhexidina y el jabón (Hardalo y Edberg, 1997).

*P. aeruginosa* puede infectar a diferentes organismos, incluyendo levaduras (Hogan y Kolter, 2002), al nematodo *Caenorhabditis elegans* (Mahajan-Miklos y col., 1999), insectos (Jander y col., 2000), plantas (Elrod y Braun, 1942; Rahme y col., 1995) y mamíferos (Glazebrook y col., 1978; Hammer y col., 2003). Además, es capaz de resistir a varios antibióticos y desinfectantes. Así mismo, se ha descrito que esta bacteria emplea los mismos determinantes de virulencia para infectar diferentes hospederos, desde plantas hasta humanos (Fajardo y col., 2008). Es el patógeno más comúnmente asociado con la mortalidad de pacientes con fibrosis quística (Battle y col., 2008).

*P. aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas más importantes en humanos. Pertenece al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.*), que es un grupo de bacterias resistentes a los antibióticos que son causas comunes de infecciones nosocomiales potencialmente mortales (Pendleton y col., 2013). Los pacientes con enfermedades crónicas o sistemas inmunes comprometidos debido a inmunodeficiencia o quemaduras tienen un mayor riesgo de infección por *P. aeruginosa* (Quick y col., 2014). El éxito de las infecciones por

*P. aeruginosa* se debe en gran medida a la producción de factores de virulencia para provocar enfermedades tanto en plantas como en animales y su capacidad para formar biopelículas (Rahme y col., 2000). La producción de varios factores de virulencia en *P. aeruginosa* se controla según la densidad celular a través de dos sistemas de detección de quórum sensing (QS).

En el 2000, se obtuvo la secuencia completa del genoma de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, que fue aislada de un paciente con otitis media. Esta secuencia ya se encuentra disponible en internet ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) y su análisis fue publicado (Stover y col., 2000). El tamaño aproximado del único cromosoma circular que forma el genoma de esta bacteria es de cerca de 6.3 millones de pares de bases y un total de 5570 marcos de lectura abiertos. PAO1 es una cepa estándar del laboratorio y es ampliamente usada en estudios de investigación básica (Holloway, 1955). Cuando fue secuenciado el genoma de esta cepa se reveló que este posee un gran número de genes que están involucrados en la regulación, catabolismo, transporte y expulsión de factores de virulencia, además de codificar proteínas de membrana involucradas en adhesión, motilidad y eflujo de antibióticos, al igual que varios sistemas putativos de quimiotaxis (Stover y col., 2000).

### **1.2.3. Factores de virulencia en *P. aeruginosa***

Los patógenos bacterianos infectan una amplia variedad de hospederos, en todos los casos, los patógenos pueden tener la habilidad para reconocer, asociarse con la explotación de la reserva de nutrientes y combatir las respuestas de defensas de su hospedero específico (Rahme y col., 2000), para acoplarse a estas tareas, los patógenos usan un arsenal extenso de factores relacionados a virulencia. Las bacterias a lo largo de la evolución han adquirido características que les permiten

invadir el ambiente del hospedero, expresar receptores superficiales especializados para su adhesión (Meylan y col., 2006), permanecer en estos sitios a través de procesos de colonización, evadir al sistema inmune (Diacovich y Gorvel, 2010) y finalmente causar daño tisular con el fin de lograr acceso a fuentes de nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción. Por lo que el factor o determinante de virulencia es un componente microbiano que favorece el crecimiento o sobrevivencia durante la infección (Tortora y col., 2007; Wu y col., 2008).

Usando a la cepa de *P. aeruginosa* PA14 se evidenció que ésta bacteria usa un subconjunto de factores de virulencia para provocar la enfermedad tanto en plantas (*Arabidopsis thaliana*), como en animales (Ratones) (Rahme y col., 1995; He y col., 2004), en el nematodo *C. elegans* (Mahajan-Miklos y col., 1999; Tan y col., 1999; Tan y Ausubel, 2000) y en el insecto *Galleria melonella* (Jander y col., 2000), así como en *Drosophila melanogaster* (Lutter y col., 2012). Los factores de virulencia de *P. aeruginosa* facilitan la invasión de tejidos y la propagación, en la que se incluyen al pilus, al flagelo, endotoxinas, exotoxinas, factores de permeabilidad vascular, y una variedad de enzimas secretadas (Ben y col., 2011). Las proteasas de *P. aeruginosa* degradan una gran variedad de proteínas del hospedero y tienen un efecto destructivo directo en los tejidos (Kawaharajo y col., 1975; Holder y Neely, 1991), un ejemplo es la elastasa (LasB), una proteína metaloproteasa con baja especificidad de sustrato, que degrada las proteínas del hospedero, tales como elastina, colágeno, transferinas e inmunoglobulinas (Galloway, 1991). La elastasa actúa de acuerdo con las proteasas LasA y las proteasas alcalinas que causan una elastolisis eficiente, la cual es requerida para el daño del tejido asociado con la patogénesis de *P. aeruginosa* (Peters y Galloway, 1990). Otro ejemplo de factor de

virulencia es la cápsula de alginato de *P. aeruginosa*, la cual juega un rol esencial en la infección pulmonar crónica en pacientes con fibrosis quística (Ohman y col., 1980; Zielinski y col., 1991).

Algunos de los factores de virulencia son regulados por factores externos o internos de la célula, por ejemplo, la fosfolipasa C es regulada por la disponibilidad de fosfato (Pritchard y Vasil, 1986; Shortridge y col., 1992), mientras que la exotoxina A y la elastasa son reguladas por la concentración de hierro en el medio de crecimiento (Grant y vasil, 1986). Además, la producción de un gran número de exoproductos, incluyendo elastasa, proteasa alcalina, la proteasa LasA, hemolisina, piocianina y ramnolipidos son dependientes de la densidad celular y son regulados por la llamada cascada de quorum-sensing (Pesci y Iglewski, 1997), esta cascada es mediada por homoserina lactonas de baja masa molecular que son sintetizadas por los productos de los genes *lasI* y *rhII*, así regulando la producción de una variedad de factores específicos relacionados a virulencia, involucrando al quorum-sensing en la diferenciación de biofilms en *P. aeruginosa* (McLean y col., 1997; Davies y col., 1998). Otro factor de virulencia regulado por quorum sensing es la piocianina, una fenazina color azul verdoso (Fuqua y col., 1994; Pesci y Iglewski, 1997), este metabolito secundario tiene actividad microbiana en contra de varias especies de bacterias, hongos y protozoarios, teniendo como cualidad atribuida la de potencial activo redox (Hassan y Fridovich, 1980; Sorensen y col., 1983).

#### **1.2.4. *P. aeruginosa* en fibrosis quística pulmonar**

La colonización por *P. aeruginosa* de las vías aéreas y la infección siguen siendo el contribuyente más importante a la morbilidad y mortalidad por FQ. En última

instancia, más del 80% de los pacientes con FQ sucumben a insuficiencia respiratoria provocada por una infección bacteriana crónica y una inflamación concomitante de las vías respiratorias. *P. aeruginosa* es capaz de formar un consorcio bacteriano bien organizado conocido como biopelícula en el huésped. En la FQ, donde la respuesta inmune del huésped está comprometida, *P. aeruginosa* se presenta como una amenaza terrible y conduce a una disminución progresiva de la función pulmonar.

Aunque todavía hay poca claridad con respecto a la adquisición de *Pseudomonas* en la FQ. Estudios anteriores apuntaban a exposiciones clínicas e interacción social como zonas para la adquisición de *P. aeruginosa*. Estos estudios sugirieron que *P. aeruginosa* se propaga por infección cruzada. Los otros factores de riesgo identificados en la adquisición de *P. aeruginosa* incluyen el género, y las mujeres tienen más predilección que los hombres. En un estudio, se encontró que el riesgo de muerte a los 8 años era 2.6 veces mayor en los pacientes con *P. aeruginosa* que en los que no la tenían.

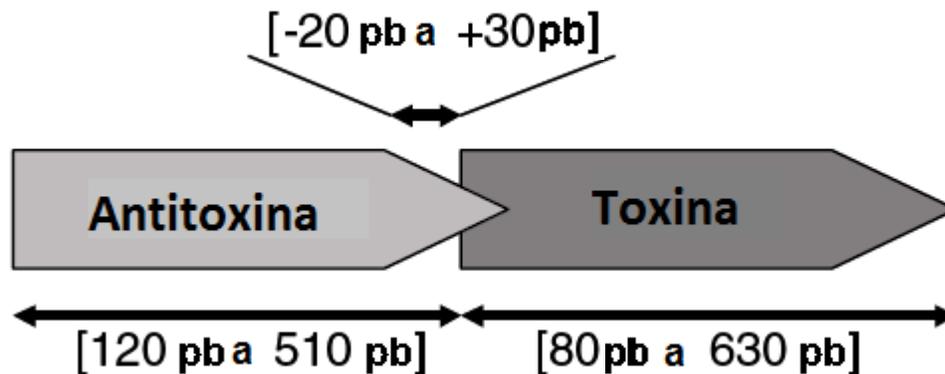
La fase logarítmica está marcada por la expresión de genes formadores de biopelículas en *P. aeruginosa* y la aparición de biomarcadores del huésped, como los anticuerpos contra *P. aeruginosa*, un aumento de los leucocitos polimorfonucleares [PMN] y un aumento de las serina proteinasas (Oliver y col., 2009).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1.1. Sistema Toxina Antitoxina (PumA-PumB) del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*

Los sistemas Toxina-Antitoxina (TA) son elementos genéticos pequeños compuestos de un gen que codifica a una toxina y un gen que codifica a una antitoxina. Se encuentran en elementos genéticos móviles bacterianos y en cromosomas bacterianos, actualmente se agrupan en los seis tipos de sistemas TA (Leplae y col., 2011; Page y Peti, 2016). Los sistemas TA son codificados por genes que forman un operón, el espaciador rara vez se extiende más allá de 30 pares de bases (pb), y un pequeño solapamiento (1 a 20 pb en general) es la estructura más común. El orden de los dos genes también está bien conservado, con la antitoxina río arriba (Figura 1), esta disposición contribuye a una alta proporción de antitoxina a toxina y asegura que la toxina se inactive en condiciones sin estrés (revisado en Sofos y col., 2015). Aunque hay una excepción, en el *loci higBA* el gen de la toxina está localizado río arriba del de la antitoxina (Tian y col., 1996). En estos casos, tales diferencias en el orden de los genes podrían ejercer un efecto sutil sobre la proporción de toxina a antitoxina en la célula, que a su vez regula la función de la toxina (Yamaguchi y col., 2011). Por lo general, la transcripción de operones TA está regulada por la unión de la antitoxina o por un complejo formado por proteínas de toxina y antitoxina (Brzozowska y Zielenkiewicz, 2013). Todos los genes TA analizados son pequeños, su tamaño puede variar entre 120pb y 630 pb (Sevin y Barloy- Hubler, 2007). Según (Pandey y Gerdes., 2005), las antitoxinas presentan de 41 a 206 aminoácidos (aa) de longitud y las toxinas de 31 a 204 aa; también en

este caso hay una excepción: la toxina del sistema HipBA es de 440 aa. Las antitoxinas son generalmente más cortas que sus toxinas asociadas (Korch y Hill, 2006).



**Figura 2. Contexto genético general de loci TA.** Se muestra la organización típica de loci TA con tamaños y perfiles de distancia (Adaptada de Sevin y Barloy- Hubler, 2007).

Las toxinas de los sistemas TA son proteínas, mientras que las antitoxinas son proteínas o RNAs de tamaño pequeño (sRNA) (Unterholzner y col., 2013). Las toxinas de los sistemas TA se consideran moléculas dañinas para las células debido a sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular, lo que lleva a la estasis de crecimiento en condiciones estresantes (Park y col., 2013). Las antitoxinas son más lábiles y se degradan más fácilmente en condiciones de estrés que las toxinas, lo que permite que las toxinas ejerzan sus efectos tóxicos (Yamaguchi y col., 2011).

El primer sistema TA, *ccdA/ccdB*, fue descrito hace 30 años como un módulo de mejora de la estabilidad del plásmido F de *E. coli*. Los sistemas TA codificados por plásmidos también se llaman módulos de adicción (Yarmolinsky, 1995), ya que esta propiedad hace que la célula sea “adicta” o requiera la producción de antitoxina y

por lo tanto a los genes TA. La amplia difusión de los sistemas TA en los genomas de bacterias es una consecuencia de su capacidad de moverse por la transferencia horizontal de genes (Pandey y Gerdes, 2005; Koonin y Wolf, 2008). Los sistemas TA han sido descritos también en los cromosomas, especialmente en islas genómicas, donde a menudo se encuentran en varias copias. Estos sistemas codificados cromosómicamente se han asociado con la virulencia de patógenos bacterianos (Hayes y Van Melderren, 2011; Unterholzner y col., 2013; De la Cruz y col., 2013).

El plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* posee una isla de patogenicidad que contiene los genes pumAB que codifican productos con una secuencia similar a los módulos de ToxineAntitoxin (TA), cuyos transcrito consiste en un RNA mensajero bicistrónico, lo que sugiere que forman un operón. La sobreexpresión de la proteína PumA en la cepa de E. coli BL21 dio como resultado una inhibición del crecimiento significativa, mientras que BL21 que coexpresaba las proteínas PumA y PumB no mostró inhibición del crecimiento. Estos resultados indican que los genes pumAB codifican un sistema TA donde la proteína PumB contrarresta los efectos tóxicos de la toxina PumA. Además, los transformantes de *P. aeruginosa* PAO1 con el gen pumA aumentaron la tasa de mortalidad del nemátodo *Caenorhabditis elegans* y de ratón y mejoraron la invasión de órganos de ratón, efectos neutralizados por la proteína PumB. Además, la proteína His-PumA recombinante purificada disminuyó la viabilidad de *C. elegans*, lo que indica que la proteína PumA podría actuar como una toxina. Estos resultados indican que PumA tiene el potencial de promover la virulencia de PAO1 contra *C. elegans* y ratones cuando se expresa en ausencia de PumB.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La fibrosis pulmonar es una enfermedad de evolución rápida en detrimento del estado de salud del paciente, la cual cursa con infecciones bacterianas asociadas a esta patología. *Pseudomonas aeruginosa* es un agente etiológico importante y prevalente en fibrosis quística pulmonar.

Recientemente se ha descrito a la toxina PumA, codificada por el sistema TA PumAB del plásmido pUM505 como un elemento crucial en la virulencia de *P. aeruginosa*, por lo que es relevante describir el posible papel de dicha toxina en la progresión de la fibrosis pulmonar en modelo murino.

### **IV. HIPÓTESIS**

La toxina PumA del sistema TA PumAB, codificada por el plásmido pUM505, incrementa la fibrosis pulmonar en ratón.

### **V. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que la presencia de la toxina PumA exacerba la fibrosis pulmonar en ratón.

#### **5.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Generar un modelo murino de fibrosis pulmonar
2. Determinar el efecto de la administración de la toxina PumA en el modelo murino de fibrosis pulmonar

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1.1. Manipulación de ratones**

Se utilizaron ratones machos Balb/c sanos (no inmunocomprometidos) de aproximadamente 12 semanas. Los animales se alimentaron durante todo el periodo *ad-libitum* y se mantuvieron en observación por post- inoculación. Se realizó cada ensayo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, tanto en su cuidado como en su manejo. Se reportó el peso de los animales, así como su fallecimiento (en horas) durante todo el transcurso del experimento.

### **6.1.2. Purificación de proteínas recombinantes PumA-His y PumB-His**

Las proteínas recombinantes PumA-His (Toxina) y PumB-His (Antitoxina), fueron proporcionadas por la Dra. Martha Isela Ramírez Díaz. Las proteínas recombinantes puras fueron obtenidas siguiendo el protocolo descrito anteriormente por Hernández-Ramírez y col. (2017).

### **6.1.3. Inoculación de ratones con bleomicina o con las proteínas recombinantes PumA-His y PumB-His por vía intranasal**

Se emplearon cuatro grupos de ratones los cuales fueron inoculados por vía intranasal con un volumen total de 40  $\mu$ l de Buffer D (Fosfato de sodio 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, NaCl 25mM, B-mercaptoetanol 10mM, imidazol 250mM, glicerol 10%). Este buffer fue usado para resuspender las proteínas recombinantes conteniendo cada uno de los siguientes compuestos:

1. Bleomicina 120  $\mu$ g totales (Considerado como 100%)
2. PumA-His 40  $\mu$ g totales (Considerado como 100%)

3. PumB-His 40  $\mu$ g totales (Considerado como 100%)

La concentración total de bleomicina o de las proteínas recombinantes indicada para cada grupo se realizó a través de 4 inoculaciones cada una de ellas aplicada con lapso de una semana de diferencia. Como control negativo del experimento un grupo de ratones fue inoculado con el Buffer D.

#### **6.1.4. Análisis de RT-qPCR en tiempo Real**

Para aislar el RNA total de los diversos órganos obtenidos post-inoculación de *Mus musculus*, se realizó la remoción de cada uno de los tejidos (pulmones e hígado). Se realizó la lisis del tejido (30 mg aproximadamente de cada uno) usando perlas (MagNA Lyser Green Breads-Roche), a las cuales les fue adicionado 700  $\mu$ l de buffer de elución. Los tubos fueron colocados en MagNA Lyser Instrument (Roche) y procesados por 40 seg a 6 500 rpm, a fin de lograr la lisis celular. Las muestras fueron centrifugadas por 1 min a 20 000  $\times g$  en una centrifuga modelo 5417 (Eppendorf) y el sobrenadante fue usado para aislamiento de RNA siguiendo el protocolo del Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche). Las muestras fueron cuantificadas usando un NanoPhotometer Pearl spectrophotometer (IMPLEN). La sonda de hidrolisis correspondiente al gen *Col12a* que codifica a la cadena alfa del colágeno tipo I de *M. musculus* (Tabla 3) fue usada en los ensayos de expresión relativa al gen  $\beta$ -Actina, siguiendo los cálculos de expresión anteriormente descritos (Valle-Maldonado y col., 2015).

### 6.1.5. Análisis de cortes histológicos de ratón mediante la técnica tricrómica de Masson

Los ratones fueron inoculados intranasalmente con los distintos tratamientos (bleomicina o proteínas recombinantes), posteriormente fueron sacrificados al finalizar el tratamiento (por lo general 1 mes o 1 mes y medio después de la primera inoculación). Posteriormente, se removieron los pulmones los cuales fueron fijados con paraformaldehído al 3%. Posteriormente se embebieron en parafina y los tejidos se seccionaron con un micrótopo en cortes de 3 micras de espesor de, finalmente se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) o con la técnica tricrómica de Masson. Los cortes fueron observados en un microscopio Leica Modelo DM750 a 100x y se tomaron imágenes representativas utilizando una cámara Leica Mod. DFC295, con el software Leica Application Suite (Versión 3.8.5.).

**Tabla 3. Sondas de hidrólisis usadas para análisis de cuantificación de RNAm.**

Secuencia (Numero ID Genebank*)	Oligonucleotide Directo (5'-3') Oligonucleotido Reverso (5'-3') Sonda (5'-3') FAM-BHQ1	Tm (°C) / GC (%)	Eficiencia Amplificación (%)	Tamaño Amplicon (bp)
<i>ActB</i> (NM_007393.5)	TGACAGGATGCAGAAGGAGAT GCGCTCAGGAGGAGCAAT ACTGCTCTGGCTCCTAGCACCAT	65.48 / 47.62 66.96 / 61.11 70.37 / 56.62	92	76
<i>Col12a</i> (BC042503)	CCAACCGTGCTTCTCAGAACA GCTGCCCGTCTCCTCATC TCACCTACCACTGCAAGAACAGCA	66.1 / 52.3 64.2 / 47.83 70.9 / 60.87	90	70

- Genebank del National Center of Biotechnology Information-NIH

## VII. RESULTADOS

### 7.1.1. Evaluación del peso de los ratones tratados

Los ratones fueron inoculados intranasalmente administrando 4 dosis de bleomicina, de la toxina (PumA-His) o de la antitoxina (PumB-His), de manera independiente, hasta alcanzar una concentración total de inóculo de 120  $\mu\text{g}$  (para la bleomicina) o 40  $\mu\text{g}$  (para cada una de las proteínas). Cabe hacer mención que la bleomicina ha sido usada en ratones para inducir la fibrosis pulmonar y de otros tejidos (Dianne M. y Steven R, 2008), por lo que este tratamiento es un control positivo del desarrollo de fibrosis pulmonar.

La administración de cada dosis en cada tratamiento se realizó con 1 semana de separación entre las mismas, además durante el curso de los tratamientos se registró el peso de los ratones (ver tabla 4). Posteriormente a los diez días después de la última administración los animales fueron sacrificados.

Se pudo observar que los ratones que más perdieron peso con respecto a los ratones control fueron aquellos a los que se les administró la bleomicina (Figura 3). Sin embargo, los datos mostraron que la administración de la toxina también ocasiono la disminución en el peso de los ratones (Figura 3A), observando valores similares de disminución similar al de los ratones tratados con bleomicina (Figura 3B). Si bien los ratones tratados con la antitoxina también mostraron una disminución en el peso con respecto al control (Figura 3A), este cambio no fue tan dramático como lo observado para el tratamiento con la toxina (Figura 3B). Esto indica que la administración de la antitoxina ocasiona una respuesta negativa en la salud del ratón, sugiriendo que la toxina podría generar un efecto nocivo similar a la

**Tabla 4.** Registro del peso de los ratones durante la administración por vía intranasal de las dosis al 100% de bleomicina, toxina, antitoxina y Buffer D

Tratamiento de Ratones	1er		2da		3a		4ta		
TOXINA	30/08	02/09	05/09	08/09	11/09	14/09	17/09	20/09	23/09
R1	21.2	19.5	21	20	20.5	21	20	19.5	19
R2	21.5	19.5	21	21	20.3	21	19.8	20.1	20
R3	21	19.5	21	20.5	20.3	21	20	19	19.2
R4	20	17.7	19.5	19.8	19.6	19.8	19	20	19.9
R5	20.5	18.7	20	19.5	19.2	19	19.5	20	Deceso
<b>ANTITOXINA</b>									
R1	19	16.2	18.3	18.3	19	19	19	19	19
R2	17	15.1	17	17.2	17	18.5	19	19.3	Deceso
R3	17.5	15.8	17.5	17.5	17.5	18	18.5	19	18.5
R4	17.5	16.4	17.7	18	18	18.5	20	19.8	19
R5	16	16.3	18	18.2	18.8	19.2	19.5	19	
<b>BLEOMICINA</b>									
R1	18.5	20	18.5	16.1	15.5	13.8	13	13.5	Deceso
R2	17.5	17	17.8	18.1	18	17	17.5	17	17.1
R3	19	19	deceso						
R4	20.5	21	19.4	18	19.4	17.9	18	18.3	18
R5	19	18.5	17.5	17.5	18.1	17g	16.8	17.5	18
<b>BUFFER D</b>									
R1	29.5	31.8	33	37	43	39.8	36	39.5	Deceso
R2	27.5	28.5	28	28.5	29	29.5	30	30.5	31.5
R3	33	33.4	32.7	33.5	33.7	34.1	34.5	36	34.5
R4	31	36.5	35	35.5	deceso				
R5	28	28	28	29	28.5	28	28.2	28	28

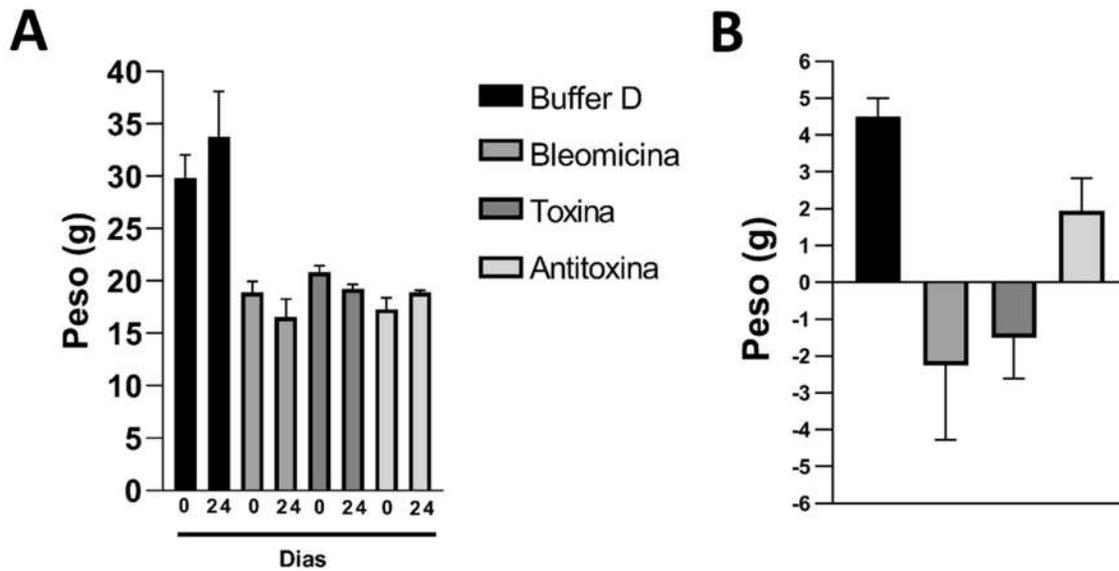
Las fechas mostradas indican la fecha del año 2019 en que se registró el peso de los ratones (expresados en gramos) hasta su sacrificio (la última fecha indicada).

1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> representa a las 4 administraciones independientes de cada uno de los tratamientos.

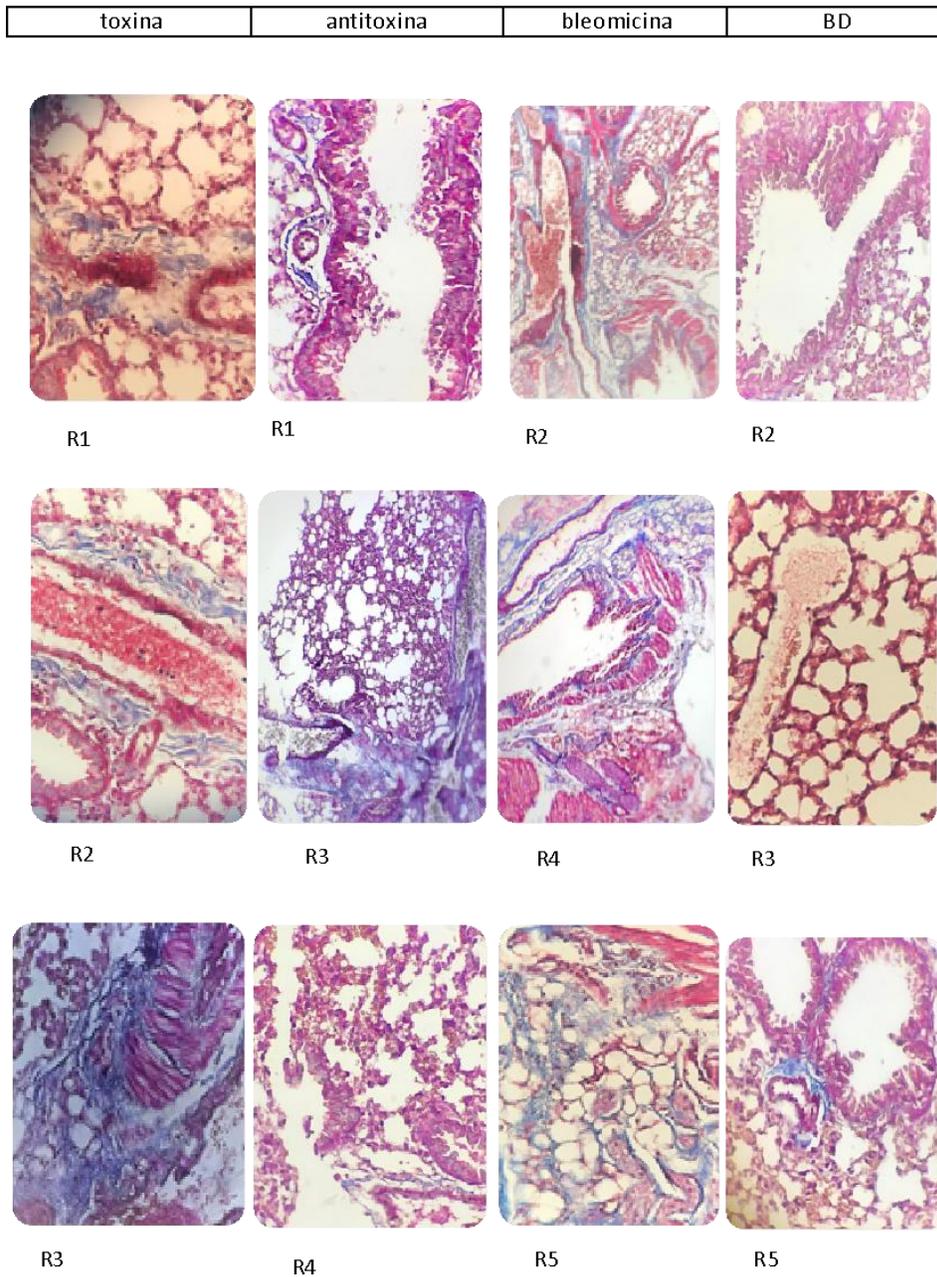
bleomicina afectando negativamente al estado general de los ratones a los cuales les fue administrada dichas moléculas, dado a que los animales no ganaron el peso que fue observado en los ratones tratados con el control (Buffer) (Figura 3).

### **7.1.2. La antitoxina induce acumulación de colágeno en el tejido pulmonar**

Con el propósito de determinar si la pérdida en el peso de los ratones correlacionaba con un daño en los tejidos pulmonares por la administración de la toxina, se obtuvieron cortes histológicos correspondiente a los tejidos de los pulmones de los ratones. Dado a que la bleomicina ocasiona daño en los pulmones al inducir la acumulación de colágeno, los cortes de tejido fueron teñidos con la técnica tricrómica de Masson, como se describió en materiales y métodos, con el fin de evaluar la presencia del colágeno en dichos tejidos. Nuestros datos revelaron que los pulmones aislados de los ratones tratados con bleomicina fueron los que acumularon mayor cantidad de colágeno, un resultado esperado ya que como se indicó la bleomicina induce fibrosis pulmonar (**Figura 4**). Interesantemente los pulmones de los ratones tratados con la toxina (PumA-His) mostraron la acumulación de colágeno en cantidad similar a la inducida por el tratamiento con bleomicina, y en mucho menor grado los tejidos de los ratones tratados con la antitoxina (PumB-His) o con el Buffer D (**Figura 4**). Estos datos indican que en ratones la inoculación de la toxina PumA induce visualmente un efecto similar en la acumulación de colágeno que el tratamiento con bleomicina. Lo que sugiere que la antitoxina podría estar relacionada con el establecimiento de fibrosis.



**Figura 3. Variación en el peso de los ratones durante el tratamiento.** Cambios en el peso de los ratones posterior a la administración de los distintos tratamientos. A. Pesos en gramos (ganancia o pérdida) de cada uno de los 4 grupos de ratones (Buffer D, Bleomicina, Toxina y antitoxina) al inicio 0 y al final 24 días del experimento. B. Representación de la variación de peso de cada uno de los grupos los ratones al final del experimento respecto al tiempo inicial. Cada grupo de ratones comprenden 6 individuos (n=6).



**Figura 4. Análisis histológico de los tejidos.** Análisis histológico de las muestras de tejido mediante la técnica tricrómica de masson de los tejidos pulmonares de los ratones posterior a la administración de los distintos tratamientos.

### 7.1.3. La antitoxina induce un incremento en los niveles de RNAm de la cadena alfa del colágeno de tipo I

Se ha descrito que los genes que codifican a la colagenasa tipo I son mayormente expresados en tejidos pulmonares de ratones tratados con bleomicina (referencia). Lo que sugiere que alguno de estos genes podría ser empleados como marcadores moleculares al determinar su nivel de transcripción (acumulación de este RNAm) en tejidos fibróticos inducidos por bleomicina. Por lo que se decidió usar el gen que codifica a la cadena 2 alfa del colágeno tipo I (*Col12a*, al cual nos referiremos como colágeno) como marcador molecular que refleja la acumulación de colágeno en los ratones tratados. En las **figuras 5 y 6** se muestran las posiciones de las sondas y oligonucleótidos en los marcos de lectura abierto del gen que codifican al colágeno (*Col12a*) y el gen de actina (*Actb*), respectivamente.

Nuestros resultados indican que los tejidos pulmonares de los ratones tratados con bleomicina acumularon en mayor cantidad de RNAm del gen del colágeno (Figura 5), lo cual es un resultado esperado y en concordancia a lo descrito. Los resultados mostraron que las muestras de los ratones tratados con la toxina presentan menor nivel de transcrito en comparación con los tejidos obtenidos del tratamiento de bleomicina; sin embargo, estos acumularon 3 veces más transcrito de *Col12a* en comparación los tejidos de ratones tratados con el buffer o la antitoxina, sugiriendo que aunque si bien es cierto la toxina por sí sola no genera niveles de acumulación de RNAm similares a las tejidos inducidos con bleomicina, estos niveles si fueron mayores al tratamiento con el buffer o de otra proteína similar denominada antitoxina (**Figura 7**).

```

1   ATGCTCAGC TTTGTGGATA CGCGGACTCT GTTGTGCTT GCAGTAACTT CGTGCCTAGC AACATGCCAA TATTTGCAAT CGGGATCAGT
90  ACGAAAGGGC CCCACTGGAG ACAGAGGACC ACGTGGACAA AGGGGTCCCG CAGGTCCCGG AGGCAGAGAT GGTGTTGATG GTCCCATGGG
180 CCCTCCTGGT CCCCTGGCTC CCCCTGGTCC TCCC GGCTCC CCTGCCCCCT CTGGTCTTAC TGGGAACTTT GCTGCTCAGT ATTCTGACAA
AGGAGTTTCA TCTGGCCCTG GACCAATGGG TTTAATGGGA CCCAGAGGCC CTCCTGGTGC TGTGGAGGCC CCTGGCCCTC AAGGTTTCCA
AGGACCTGCT GGTGAACCTG GTGAGCCTGG TCAAACGGGT CCTGCAGGTC CCCGTGGTCC AGCTGGCTCT CCTGGCAAGG CTGGTGAGGA
TGGTCACCTT GGA AAAACCCG GAAGACCTGG GGAGAGAGGA GTCGTTGGAC CACAGGGTGC TCGTGGTTTC CCCGGGACTC CTGGACTTCC
TGGCTTCAAA GCGCTGAAAG GACACAGTGG TATGGATGGA TTA AAGGGAC AGCCTGGTGC ACAGGGTGTG AAGGGTGAAC CCGGTGCCCC
TGGAGAGAAAT GGA AACTCCAG GTCAAGCAGG AGCCCGAGGG CTTCTGGTG AGAGAGGGCG TGTCCGAGCT CCTGGTCCAG CTGGTGCCCG
AGGCAGTGAT GGAAGCGTTG GCCCGCTCGG CCCTGCTGGT CCCATTGGGT CTGCTGGACC CCCTGGTTTC CCAGGTGCTC CTGGTCCCAA
GGGTGAACCT GGGCCCGTTG GTAACCTGG CCCTGCTGGT CCTGCTGGTC CCCGTGGTGA AGTGGGTCTT CCAGGTCTTT CTGGCCTGTG
TGGACCTCCT GGAACCCCTG GAACAATGG GCTCACTGGC GCCAAGGGTG CTA CTGGACT CCCTGGTGTG GCTGGGGCTC CCGGTCTCC
TGGCCCCCGT GGTATTCTGT GCCCGCTGG TGCTGCTGGT GCTACAGGTG CCAGAGGACT TGTGGTGAG CCTGGTCTGT CTGGTCCCAA
AGGAGAAATC GGTAAACAAG GTGAGCCTGG CTCTGTTGGA GCCCAAGGTC CTCCTGGTCC CAGCGGTGAA GAAGGAAAGA GAGGGTCTCC
CGGAGAAGCT GATCTGCTG GCCCTGCAGG GCCTCCAGGG CTTAGAGGCA GCCCTGGTTC TCGAGGTCTT CCTGGAGCTG ATGGCAGAGC
TGGTGTAATG GGTCTCTCTG GCAATCGTGG TTAACCGGGC CCTGCTGGAA TCCGAGGTCC TAATGGAGAT GCCGGTGCAG CTGGGGAACC
TGGTCTCATG GGACCCAGAG GTCTCTCTGG GTCTCTCTGA AATGTTGGCC CATCTGGTAA AGAAGGCCCT GTGGGTCTCC CTGGCATTGA
TGGCAGACCT GGCCCAATCG GCCCAGCTGG ACCAAGAGGT GAAGCTGGCA ACATTGGATT CCCTGGACC AAAGGCCCTC CTGGTATCC
TGGCAAACTT GGTGAGAGAG GACACCCCGG TCTTGCTGGT GCTCGGGGAG CTCAGGACC CGATGGCAAC AATGGAGCTC AGGGCCCCC
TGGACCCAG GGTGTTCAAG GTGGCAAAGG TGAACAAGGC CCTGCTGGTC CTCCTGGCTT CCAGGTCTC CCAGGTCTC CAGGCTAC
TGGAGAAGTT GGAAGCCCGG GAGAAAGGG TCTTCTGGT GAATTCGGTC TCCTGGTCC TGTGGTCCA AGAGGAGAAC GTGGTACCC
GGGTGAGAGT GGAGCTGCTG GCCCTTCTGG TCCTATTGGA AGCCGAGGTC CCAGTGGAGC CCCAGGGCTC GATGGAACA AGGGTGAAGC
TGGTGCAGTC GGTGCTCCAG GCAGTCTGG TGCCCTGGG CCTGGTGGC TCCAGGAGA GAGGGGTGCT GTGGCATACT CTGGGGCAA
AGGAGAAAAG GGTGAAACTG GTCTCCGAGG TGACTCTGGC AACACTGGTA GAGATGGTGC TCGTGGCATT CCTGGTCTGT TAGGTCCCC
TGGTCTCTGT GGGGCCCTCAG GTGACCGGGG TGAAGCTGGT GCTGCCGGTC CTTCTGGCCC AGCTGGTCTT CGGGGTAGCC CTGGTGAACG
TGGTGAAGTT GGGCCCTGCTG GCCCAATGG ATTTGCTGGT CCTGCTGGTG CTGCTGGCCA ACCCGGTGCT AAAGGAGAGA AGGGAACCAA
AGGCCTAAG GGTGAAAATG GCATTGTTGG TCCAACCGGG TCTGTTGGAG CTGCTGGCCC ATCTGGTCTT AATGGCCCACT CTGGTCTGT
TGGAAAGTCT GGTGATGGAG GGCCCCCTGG TATGACTGGC TTCCTGGTG CTGCTGGACG GACTGGTCCC CCCGGACCCA GTGGTATTG
TGGCCCCCCT GGGCCCCCTG GTGCTGCTGG AAAGGAAGGG ATTCTGGTGC CCCGTGGCGA CCAAGGTCCA GTTGGCCGAA CTGGAGAAAC
AGGTGCATCT GGACCCCTGT GATTTGTTGG TGA AAGGGT CCTCTGGAG AACCTGGTAC CGCAGGAGCC CCTGGTACCG CAGGTCTCA
GGGTCTTCTT GGTGCTCCCC GTATTCTGGG TCTCCCTGGC TCTAGAGGTG AACGTGGTCT GCCAGGTATT GCTGGTCTC TGGGTGAACC
TGGTCCCTGT GGCATCTCAG GCCTCTCTGG TGCCCGTGGT CCCCTGGTG CTGTGGGCGA CCCTGGAGTT AATGGTGCCC CTGGTGAAGC
TGGTCGTGAT GGTAAACCTG GCAGCGATGG TCCCCAGGT CGTGATGGTC AGCCTGGACA CAAGGGAGAG CGTGGTTACC CTGGCAGCAT
TGGTCCGACT GGTGCTGCAG GTGCCCTGG TCCTCACGGT TCTGTGGGTC CTGCTGGGAA ACATGGAAC CGAGGTGAAC CTGGTCTGC
CGTTCTGTG GTCCCTGTTG GTGCTGTTGG TCCAAGAGGT CTAAGTGGTC CTC AAGGCAT CCGAGGTGAC AAAGGAGAAC CTGGTGATAA
AGGGCACAGG GGTCTTCTGT GCTTAAAAGG ATACAGTGGG TTGAGGGTTC TTCTGGTCT TGTGGCCCTA CATGGTGACC AAGGAGCTCC
TGGTCCCTGT GGTCCCTGCT GTCCCAGGG TCCTGCTGGG CCTTCTGGAC CCGTTGGCAA AGATGGTAGA TCTGGGCAAC CTGGCCAGT
CGGCCCTGCT GGTGTTCTGT GTTCTCAGG TAGCCAAGT CCCCTGGTG CCCCTGGACT CCCTGGACCT CCCTGGACCT CTGGTCTCAG
CGGAGGTGGC TATGACTTTG GTTTTGAAGG AGACTTCTAC AGGGCTGACC AGCCTCGTC CCAGCTTCA CTCAGACCCA AGGACTATGA
AGTTGATGCA ACTCTGAAAT CTCTCAATAA CCAGATTGAG ACCCTTCTCA CTCCTGAAG CTCTAGAAG AACCTGTCT GCACGTGCCG
GGACTTAAGA CTCAGCCACC CAGAGTGGAA CAGCGATTAC TACTGGATTG ACCCTAACCA AGGATGTACT ATGGATGATA TCAAAGTGTG
CTGTGATTTCT TCTACTGGTG AAACCTGCAT CCAGGCCAA CCTGTAACA CCCAGCGAA GAACTCATA AGCCCGCCCT AGGCCAACAA
GCATGCTGTT TTAGGAGAGA CTATCAATGG TGGCAGCCAG TTTGAATACA ACGTGAAGG GGTGTCTCTC AAGGAAATGG CAACTCAGCT
CGCCTTATG CGCTGCTAG CCAACCGTGC TTCTCAGAAC ATCACCTACC ACTGCAAGAA CAGCA TTGCG TACCTGBATG AGGAGACGGG
CAGTTGAAAC AAGGCTGTGC TTCTGCAGGG TTCCAACGAT GTTGAACCTG TTGCTGAGGG CAACAGCAGG TTCACCTACT CTGTCTAGT
CGATGGCTGC TCCAAAAGA CAAATGAATG GGGCAAGACA ATCATTGAAT ACAAAACAA TAAGCCATCT GCCTGCCGT TCCTTGACAT
TGCACCTCTG GACATTGTG

```

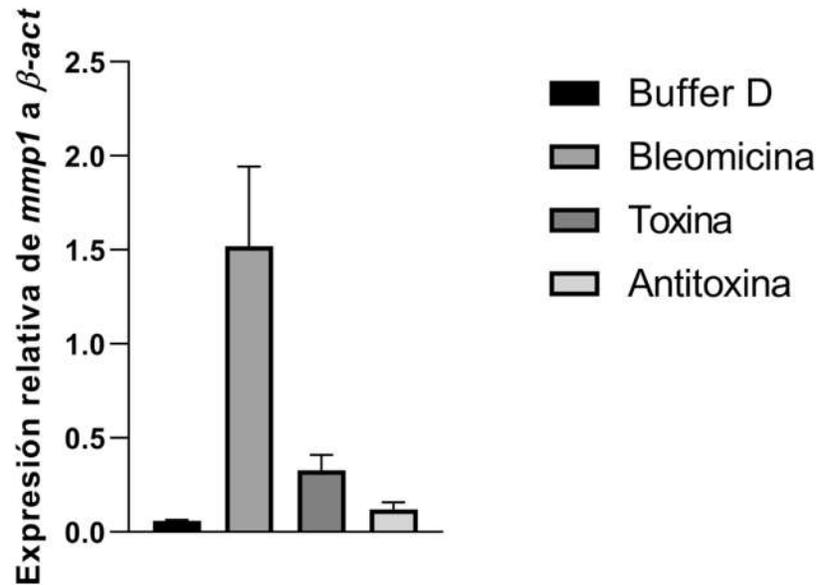
**Figura 5. Marco de lectura abierto del gen *Col12a* que codifica a la cadena alfa de la colagenasa tipo 2 de *Mus musculus*.** La región codificante del gen *Col12a* de *M. Musculus* abarcan 4010 nucleótidos. El codón de inicio (ATG) y el codón de paro (GTG) de la traducción se resaltan en negritas. Los oligonucleótidos directo y el reverso, se muestran en amarillo y azul respectivamente, mientras que en rojo se señala la sonda.

```

1
12 TATCGCTGCG CTGGTCGTCG ACAACGGCTC CGGCATGTGC AAAGCCGGCT TCGCGGGCGA
72 CGATGCTCCC CGGGCTGTAT TCCCCTCCAT CGTGGGCCGC CCTAGGCACC AGGGTGTGAT
132 GGTGGGAATG GGTGAGAAGG ACTCCTATGT GGGTGACGAG GCCCAGAGCA AGAGAGGTAT
192 CCTGACCCTG AAGTACCCCA TTGAACATGG CATTGTTACC AACTGGGACG ACATGGAGAA
252 GATCTGGCAC CACACCTTCT ACAATGAGCT GCGTGTGGCC CCTGAGGAGC ACCCTGTGCT
312 GCTCACCGAG GCCCCCCTGA ACCCTAAGGC CAACCGTGAA AAGATGACCC AGATCATGTT
372 TGAGACCTTC AACACCCAG CCATGTACGT AGCCATCCAG GCTGTGCTGT CCGTGTATGC
432 CTCTGGTCGT ACCACAGGCA TTGTGATGGA CTCCGGAGAC GGGGTCACCC AACTGTGTC
492 CATCTACGAG GGCTATGCTC TCCCTCAGC CATCTGCGT CTGGACCTGG CTGGCCGGGA
552 CCTGACAGAC TACCTCATGA AGATCCTGAC CGAGCGTGGC TACAGCTTCA CCACCACAGC
612 TGAGAGGGAA ATCGTGCCTG ACATCAAAGA GAAGCTGTGC TATGTTGCTC TAGACTTCGA
672 GCAGGAGATG GCCACTGCCG CATCCTCTTC CTCCCTGGAG AAGAGCTATG AGCTGCCTGA
732 CGGCCAGGTC ATCACTATTG GCAACGAGCG GTTCCGATGC CCTGAGGCTC TTTTCCAGCC
792 TTCTTCTTGG GTATGGAAT CCTGTGGCAT CCATGAAACT ACATCAATT CCATCATGAA
852 GTGTGACGTT GACATCCGTA AAGACCTCTA TGCCAACACA GTGCTGTCTG GTGGTACCAC
912 CATGTACCCA GGCATTGCTG ACAGGATGCA GAAGGAGATT ACTGCTCTGG CTCCTAGCAC
972 CATGAAGATC AAGATCATTG CTCTCTCTGA GCGCAAGTAC TCTGTGTGGA TCGGTGGCTC
1032 CATCTGGCC TCCTGTCCA CCTTCCAGCA GATGTGGATC AGCAAGCAGG AGTACGATGA
1068 GTCCGGCCCC TCCATCGTGC ACCGCAAGTG CTTCTAG

```

**Figura 6. Marco de lectura abierto del gen *actB* que codifica a la actina  $\beta$  de *Mus musculus*.** La región codificante del gen *actB* de *M. Musculus* abarcan 1608 nucleótidos. El codón de inicio (ATG) y el codón de paro (TAG) de la traducción se resaltan en negritas. Los oligonucleótidos directo y el reverso, se muestran en amarillo y azul respectivamente, mientras que en rojo se señala la sonda.



**Figura 7. Determinación de la acumulación del RNAm del gen que codifica a la cadena alfa colágeno tipo I en los tejidos pulmonares de ratón.** Los tejidos de los ratones tratados con los diferentes tratamientos fueron removidos posterior al sacrificio de los animales y procesados para la obtención de RNA total, posteriormente la cuantificación del RNAm del gen que codifica a la cadena alfa de la colagenasa I (col12a) fue determinado en relación al gen de referencia b-actina, mediante análisis DcT. Los experimentos fueron realizados por triplicado, las barras representan la desviación estándar de los datos.

Con el propósito de determinar si la toxina exacerba establecimiento de la fibrosis en tejido con cierto nivel de daño, un grupo de ratones fueron tratados previamente con 20% de Bleomicina y posteriormente tratados con diferentes concentraciones de la antitoxina. Primeramente, se observó que el tratamiento con 20% de bleomicina no es capaz de inducir daño en los ratones (evaluado como pérdida de peso) durante el tiempo que duro el ensayo ya que los ratones aumentaron en promedio 38% de peso (**Tabla 6**). Los ratones inoculados con 20% de bleomicina más 100% de la toxina PumA solo aumentaron 23% de peso en promedio, si bien los ratones aumentaron de peso, la ganancia no fue la misma que los ratones solo tratados con bleomicina (**Tabla 5**). Al inocular a los ratones con 50 o 25% de PumA los ratones ganaron en promedio 34 y 35% de peso, que es menor (aunque poco) con lo ganado con el tratamiento únicamente de bleomicina. esto podría indicar que la predisposición al daño generado por la bleomicina genera un efecto más drástico a la inoculación con la toxina. Además, la inoculación con 100 o 25% de la antitoxina ocasiono un incrementó de 54 a 83%, respectivamente en el peso de los ratones (**Tabla 5**). No tenemos una explicación para esto, pero es probable que la presencia de la antitoxina de alguna manera neutralice los efectos nocivos de la bleomicina en el tejido.

**Tabla 5.** Administración de diferentes concentraciones de la toxina (PumA ) o antitoxina (PumB) en presencia de bleomicina al 20 %.

Tratamiento de ratones			Peso (g)				
<b>Bleomicina 20% pumA 100%</b>	<b>1ra 08/01</b>			<b>2da 27/01</b>			<b>3ra 03/0</b>
		<b>22/01</b>	<b>24/01</b>		<b>29/01</b>	<b>31/01</b>	
R1	25.5	27.8	29	30.2	27	28	25
R2	23	23.5	24.5	25.7	24.5	28.5	23.5
R3	23.5	24	25.5	24.8	24.5	29	23
R4	25	26.3	27	30.6	26.5	32	26
<b>05/02</b>	<b>07/02</b>	<b>4ta 10/02</b>	<b>12/01</b>	<b>14/02</b>	<b>16/02</b>	<b>19/02</b>	<b>21/02</b>
19	24	26	26	28	30	34	34
19	24	26	25	28.5	33	32	34
18	23.5	27	26.8	29	33	34	33
26.5	26.5	28	28	32	35	36	36
<b>Bleomicina 20% pumA 50 %</b>	<b>1ra 08/01</b>			<b>2da 27/01</b>			<b>3ra 03/0</b>
		<b>22/01</b>	<b>24/01</b>		<b>29/01</b>	<b>31/01</b>	
R1	28	28.6	30	31.5	33	35	35
R2	27	28	29	30.4	33	34	35
R3	26.5	26.9	27	30	31.5	33	31.5
R4	26	27.1	28	28.6	31.5	32	31.5
<b>05/02</b>	<b>07/02</b>	<b>4ta 10/02</b>	<b>12/01</b>	<b>14/02</b>	<b>16/02</b>	<b>19/02</b>	<b>21/02</b>
35.5	36	38	35.5	36.5	37.5	38	36
35	38	38	38	40	40.5	35	35
34	34.5	36	38	37	35	38	36.5
32	32.5	33	32.5	34	38	41	42
<b>Bleomicina 20% pumA 25%</b>	<b>1ra 08/01</b>			<b>2da 27/01</b>			<b>3ra 03/0</b>
		<b>22/01</b>	<b>24/01</b>		<b>29/01</b>	<b>31/01</b>	
R1	25	26.5	27.5	31.5	33	35	35
R2	24.5	25	26.5	28.6	30.5	32	33
R3	26.2	27	20	30.5	31.5	31.3	30.5
R4	26.8	28	30	32	33	34	34.5
<b>05/02</b>	<b>07/02</b>	<b>4ta 10/02</b>	<b>12/01</b>	<b>14/02</b>	<b>16/02</b>	<b>19/02</b>	<b>21/02</b>
38	38.5	39	38.5	39	40.5	41	38.5
33	33	33	33	30.5	32.5	30	31
31.5	32	33	32.5	33.5	35	35.5	36
34.5	35	36	36	36.5	38	36	35
<b>Bleomicina 20% pumB 100%</b>	<b>1ra 08/01</b>			<b>2da 27/01</b>			<b>3ra 03/0</b>
		<b>22/01</b>	<b>24/01</b>		<b>29/01</b>	<b>31/01</b>	
R1	21.1	22.5	23.5	26.6	29	30	28.7
R2	21.5	22	24.5	22.6	30.5	31.5	31.8
R3	23	25	28	29.8	30.5	32.5	32
R4	20.5	20	21	20.9	27	26.5	26.2
<b>05/02</b>	<b>07/02</b>	<b>4ta 10/02</b>	<b>12/01</b>	<b>14/02</b>	<b>16/02</b>	<b>19/02</b>	<b>21/02</b>
29	30.2	30.5	30.5	32	33.5	32.5	30
31.8	33.5	34.5	34	35.5	37.5	37	37.5
32.5	36	35.5	35.5	37	37.5	38.5	35.5
27.5	29	30.5	31	33.5	34.5	33	29.8
<b>Bleomicina 20% pumB 50%</b>	<b>1ra 08/01</b>			<b>2da 27/01</b>			<b>3ra 03/0</b>
		<b>22/01</b>	<b>24/01</b>		<b>29/01</b>	<b>31/01</b>	

R1	23	24.3	25.5	28.2	30	29.5	29
R2	23.2	24	24	26.4	28	28.5	29
R3	22	22.5	23.5	25.1	28	27.5	29
R4	24.5	25.5	27.5	30.4	29.5	30.5	30.8
<b>05/02</b>	<b>07/02</b>	<b>4ta 10/02</b>	<b>12/01</b>	<b>14/02</b>	<b>16/02</b>	<b>19/02</b>	<b>21/02</b>
30	29.2	28	28	27.5	28	deceso	
29.5	28	27.5	27	27.5	28.5	26	26.5
30	28.2	28	27	28	28	28.5	deceso
31.5	32.5	30	30.5	30	31	30.5	31
<b>Bleomicina 20% pumB 25%</b>	<b>1ra 08/01</b>	<b>22/01</b>	<b>24/01</b>	<b>2da 27/01</b>	<b>29/01</b>	<b>31/01</b>	<b>3ra 03/0</b>
R1	15	15	13.5	13	13.5	16.8	20
R2	16.5	16.7	16.5	15.2	15.5	20	22.5
R3	16.5	16	16	14.4	15	16	23
R4	15.5	16.2	16	13.7	13	15.9	23
<b>05/02</b>	<b>07/02</b>	<b>4ta 10/02</b>	<b>12/01</b>	<b>14/02</b>	<b>16/02</b>	<b>19/02</b>	<b>21/02</b>
22.5	22.5	22	24	21.5	23	28	30
25.5	25	27	28.5	26	27	29	31
29	29	30	31	27.5	29	32	31
28	30.5	33	33	30	31	34.5	35

Las fechas mostradas indican la fecha del año 2020 en que se registro el peso (expresado en gramos) de los ratones hasta su sacrificio (la ultima fecha indicada).

1ª, 2da, 3ra y 4ta significa las 4 administraciones independientes de cada uno de los tratamientos

**Tabla 6.** Registro de pesos de los ratones durante la administración por vía intranasal de bleomicina al 20%

<b>Tratamiento</b>						
<b>Bleomicina 20%</b>	<b>1ra 27/11</b>	<b>29/11</b>	<b>2da 31/11</b>	<b>02/12</b>	<b>04/12</b>	<b>06/12</b>
R1	18	17	15	17.5	18.5	23
R2	27	24.7	27.5	27	30	31
R3	23	23.5	23.8	23.5	24.5	27
R4	21	20	18	21	23	27
R5	20	18	16	18	22.5	23
	<b>3ra 08/12</b>	<b>10/12</b>	<b>4ta 12/12</b>	<b>14/12</b>	<b>16/12</b>	
R1	23	23.5	25.1	25	25.5	NR
R2	31	29.5	30.5	31	30.5	NR
R3	27	33	31.5	34	34	NR
R4	27	30	26	31.5	30	NR
R5	23	24.5	26	26	27	NR

Las fechas mostradas indican la fecha del año 2019 en que se registró el peso de los ratones (expresados en gramos) hasta su sacrificio (la última fecha indicada).

1ª, 2da, 3ra y 4ta significa las 4 administraciones independientes de cada uno de los tratamientos  
NR. No registrado

## VIII. Discusión

*P. aeruginosa* causa la colonización e infecciones persistentes en pacientes con FQ y es el agente infeccioso más frecuente en pacientes con FQ, que incluso les puede producir la muerte (Wu y col., 2015). El genoma de *P. aeruginosa* codifica una amplia gama de diferentes enzimas metabólicas, lo que confiere a la bacteria una gran versatilidad nutricional (WU y col., 2015).

El efecto toxico de la toxina PumA fue descrito previamente, en donde la presencia del gen que codifica a dicha toxina en *P. Aeruginosa* provoco una mayor letalidad e invasión respecto a la antitoxina. E incluso la toxina PumA purificada genero una mayor toxicidad respecto a la antitoxina (Hernandez-Ramirez y col. 2017).

Este trabajo aporta conocimiento nuevo respecto a una posible función nociva de la toxina PumA en tejidos pulmonares de mamíferos. Aunque aún no conocemos todos los detalles moleculares al respecto, la toxina induce una mayor acumulación del transcrito del gen que codifica a la cadena alfa del colágeno tipo I (*Col12a*) respecto a la antitoxina o al buffer que se usó como vehículo de ambas proteínas. Lo cual sugiere un papel de la toxina PumA en la contribución al deterioro celular en los pulmones. Aunado a que los pulmones de animales a los que se les administro la toxina PumA acumularon más colágeno en corte de tejidos de dichos pulmonares respecto a aquellos animales que les fue administrado el buffer o la antitoxina.

Estos datos, aunque muy interesantes dado a que sugieren que la antitoxina PumA pudiera estar involucrada en la génesis de la fibrosis, los niveles de colágeno depositado en los tejidos del pulmón o el transcrito del gen del colágeno tipo I (*Col12a*) en dicho tejido no alcanzó niveles similares al de los tejidos de animales tratados con bleomicina, el cual es un fármaco antineoplásico que en altas dosis genera como efecto secundario fibrosis. Es

decir, la toxina PumA es menos agresiva respecto a la bleomicina. Pero un aspecto fisiopatológico que un patógeno ejerce en la enfermedad de fibrosis no es la génesis de esta enfermedad, si no un agravamiento de la enfermedad, por lo que exigir en un sistema experimental cantidades mayores de toxina para poder revelar el mayor daño en tejido pulmonar escapa de un contexto fisiopatológico, es decir una persona es muy poco probable que sea expuesto a cantidades masivas de toxina para causarle una degeneración fibrótica de sus pulmones. Por lo que aun esta por ser evaluado si la administración de la toxina PumA a ratones tratados previamente con cantidades mucho menores de bleomicina es decir un 20% de la cantidad inicial que se probó, logra contribuir a exacerbar el daño en los pulmones. Esto tratando de simular un cuadro fisiopatológico más cercano a la realidad, en donde pacientes con inicios de fibrosis en presencia de la toxina PumA pudiese degenerar más rápido el tejido pulmonar.

Las toxinas bacterianas juegan un papel clave en la patogenia de la enfermedad pulmonar. Basado en su estructura y propiedades funcionales, emplean diversas estrategias para modular la función de la barrera pulmonar y para perjudicar la defensa del huésped para promover la infección. Aunque en general, estas toxinas se dirigen a Vías de señalización celular y compartimentos del huésped, también se han observado efectos específicos de toxinas y células. Las toxinas pueden afectar las células pulmonares residentes involucradas en la depuración del líquido alveolar (AFC) y la función de barrera a través de la alteración del transporte vectorial de  $\text{Na}^+$  y a través del colapso citoesquelético, como tal, destruye las adherencias célula-célula. La pérdida resultante de la integridad de la barrera alveolar-capilar y La capacidad de depuración de líquidos inducirá una fuga capilar y fomentará la formación de edema, que a su vez perjudican el intercambio de gases y ponen en peligro la supervivencia del huésped. Las toxinas modulan o neutralizan mecanismos protectores de la célula huésped de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa durante una infección crónica (Lucas y col., 2020).

Cuando una infección aguda se convierte en persistente, pueden surgir enfermedades pulmonares, como bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis pulmonar (Lucas y col., 2020).

La fibrosis pulmonar es una enfermedad crónica y la toxina PumA pudiera tener el potencial de contribuir a su progresión en la degeneración del tejido.

Este estudio, aunque muy preliminar, apunta a que la presencia de la toxina aumenta la degeneración del tejido pulmonar.

## IX. Referencias

Bhagirath, A.Y., Li, Y., Somayajula, D., Dadashi, M., Badr, S. y Duan, K. (2016). Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. doi: 10.1186/s12890-016-0339-5., 16(1): 174.

Delfino, E., Del Puente, F., Briano, F., Sepulcri, C., y Giacobbe, D.R. (2019). Respiratory Fungal Diseases in Adult Patients with Cystic Fibrosis. *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, 13, 1-6.

Desai, O., Winkler, J., Minasyan, M. and Herzog, E.L. (2018) The Role of Immune and Inflammatory Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front. Med.* 5:43. doi: 10.3389/fmed.2018.00043

Domínguez, M., Colmenero, J.R. y Bataller, R. (2019). Tratamientos de la fibrosis hepática. *Gastroenterología y Hepatología*, vol. 32, 627-632.

Douglas, Z. (2015). Miocardiopatías y miocarditis. *Enfermedad Endomiocárdica* (1564-1567). México: McGraw-Hill Interamericana.

Fingerlin, T.E., Murphy, E. y Zhang, W. (2013). Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nature Genetics* Diciembre 28, 2019. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3677861/>

Feghali-Bostwick, C. A., & Wilkes, D. S. (2011). Autoimmunity in idiopathic pulmonary fibrosis: are circulating autoantibodies pathogenic or epiphenomena. *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 6, 692–693. <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1727ED>

Françoise, A., & Héry-Arnaud, G. (2020). The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes*, 11(5), E536. <https://doi.org/10.3390/genes11050536>

Fastrès, A., Felice, F., Roels, E., Moermans, C., Corhay, J. L., Bureau, F., Louis, R., Clercx, C., & Guiot, J. (2017). The Lung Microbiome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Promising Approach for Targeted Therapies. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2735.

Goetz, D. y Ren, C.L. (2019). Review of Cystic Fibrosis. *The Journal of Pediatrics*, 48, 154–61.

Glassberg M. K. (2019). Overview of idiopathic pulmonary fibrosis, evidence-based guidelines, and recent developments in the treatment landscape. *The American journal of managed care*, 25(11 Suppl), S195–S203.

Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S. Y Lory, S. (2004) Una red de señalización regula recíprocamente genes asociados con infección aguda y persistencia crónica en *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*. 7(5), 745–754.

George, P. M., Wells, A. U., & Jenkins, R. G. (2020). Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. *The Lancet. Respiratory medicine*, S2213-2600(20)30225-3. Advance online publication.

[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30225-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30225-3)

Hernández-Ramírez, K. C., Chávez-Jacobo, V. M., Valle-Maldonado, M. I., Patiño-Medina, J. A., Díaz-Pérez, S. P., Jácome-Galarza, I. E., Ortiz-Alvarado, R., Meza-Carmen, V., & Ramírez-Díaz, M. I. (2017). Plasmid pUM505 encodes a Toxin-Antitoxin system conferring plasmid stability and increased *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microbial pathogenesis*, 112, 259–268.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.060>

Hudson, V.L., Wielinski, C.L. y Regelman, W.E. (1993). Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *The journal of pediatrics*. 122(6): 854-860.

Julián Pérez Porto y María Merino. (2017). Fibrosis. *News Medical*, (1), 6-9.

Kaur, A., Mathai, S. K., & Schwartz, D. A. (2017). Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment. *Frontiers in medicine*, 4, 154. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00154>

Ley, B. y Collard, H.R. (2013). Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical Epidemiology* 5, 483-492. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3848422/>.

Lee, J.S., Ryu, J.H., Elicker, B.M., Lydell, C.P., Jones, K.D., Wolters, P.J., Talmadge E. and Collard, H.R. (2011). Gastroesophageal Reflux Therapy Is Associated with Longer Survival in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 184, 1-5.

Lee J. S. (2014). The Role of Gastroesophageal Reflux and Microaspiration in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Clinical pulmonary medicine*, 21(2), 81–85. <https://doi.org/10.1097/cpm.0000000000000031>

Lucas, R., Hadizamani, Y., Gonzales, J., Gorshkov, B., Bodmer, T., Berthiaume, Y., Moehrlen, U., Lode, H., Huwer, H., Hudel, M., Mraheil, M. A., Toque, H., Chakraborty, T., & Hamacher, J. (2020). Impact of Bacterial Toxins in the Lungs. *Toxins*, 12(4), 223. <https://doi.org/10.3390/toxins12040223>

Macneal, K., Schwartz, D.A. (2012). The Genetic and Environmental Causes of Pulmonary Fibrosis. *proceedings of the american thoracic society vol 9* (3):120-125. Recuperado de: <https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1513/pats.201112-055AW>

Mehta, G., Macek, M. y Mehta, A. (2010). Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries. *Journal of cystic fibrosis*. 9(2): 5–21.

Oliver, A., Alarcón, T., Caballero, E., & Cantón, R. (2009). Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística [Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 89–104. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.05.004>

Oldham, J. M., & Collard, H. R. (2017). Comorbid Conditions in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Recognition and Management. *Frontiers in medicine*, 4, 123. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00123>

Olson AL, Swigris JJ, Lezotte DC, Norris JM, Wilson CG, Brown KK. Mortality from pulmonary brosis increased in the United States from 1992 to 2003. *american journal of respiratory and critical care medicine*. vol. 176(3):277–84. doi:10.1164/rccm.200701-044OC

Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K. et al. (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American Thoracic Society Documents*, 183(6):788–824. doi:10.1164/rccm.2009-040GL

Raghu, G., Rochweg, B. y Zhang, Y., García, C. et al. (2015). An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *American Thoracic Society Documents*, vol. 192, 3-19.

Rammaert, B., Puyade, M., Cornely, O. A., Seidel, D., Grossi, P., Husain, S., Picard, C., Lass-Flörl, C., Manuel, O., Le Pavec, J., Lortholary, O., & SCEDO-LUNG collaborative group (2019). Perspectives on *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in lung transplantation: Results of an international practice survey from ESCMID fungal infection study group and study group for infections in compromised hosts, and European Confederation of Medical Mycology. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 21(5), e13141.

Rodríguez, A., Jornet, A., Javier, F., Navarro, A., Orellana, R., Ibeas, J. y García, M. (2009, agosto 4). Idiopathic retroperitoneal fibrosis: clinico-pathological characteristics. *Revista nefrología*, Vol. 29, 285-378.

Sánchez, R., (2004). bases de la neumología clínica. caracas Venezuela., *consejo de desarrollo científico y humanístico*.

Sankalp, M., Don Hayes, Jr.y Wozniakb, D.J.. (2019). Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: The Host-Microbe Interface. *Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology*, vol. 32, 00138-18.

Talakatta, G., Sarikhani, M., Muhamed, J., Dhanya, K., Somashekar, B. S., Mahesh, P. A., Sundaresan, N., & Ravindra, P. V. (2018). Diabetes induces fibrotic changes in the lung through the activation of TGF- $\beta$  signaling pathways. *Scientific reports*, 8(1), 11920. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30449-y>

Talmadge, E.K. (2018). Clinical manifestations and diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *UpToDate*.

Wilson LD, Detterbeck FC, Yahalom J. (2007). Superior vena cava syndrome with malignant causes. *The new England Journal of Medicine*, 358(18), 1862-1869.

Xaubet A, Ancochea J, Molina-Molina M. (2017). Fibrosis pulmonar idiopática. *Medicina Clinica*. 148(4):170-175. DOI: 10.1016/j.medcli.2016.11.004

Xaubet, A., Ancochea, J., Bollo, E., Fernández-Fabrellas, E., Franquet, T., Molina, M., Montero, M. y Mollar, A. (2013). Normativa sobre el diagnóstico y tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. *Archivos de Bronconeumología*, vol. 49(8), 343-353.

Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American journal of physiology. Cell physiology*, 304(3), 216–225. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00328.2012>