

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



EVALUACION DEL ÁCIDO NIFLÚMICO COMO INHIBIDOR DE LA SECRECIÓN PATOLÓGICA DE MOCO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE NEUMONÍA POR PNEUMOCYSTIS

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Farmacología por:

FRANCISCO JAVIER PÉREZ BLANCO

Director de Tesis: Dr. Sergio Vargas Munita

Co-Directora de Tesis: Prof. María Eugenia Letelier (Q.E.P.D)

Santiago-CHILE

Octubre 2019

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

FRANCISCO JAVIER PÉREZ BLANCO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dr. Sergio Vargas Munita _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Juan Diego Maya Arango _____

Dra. Patricia Díaz Amor _____

Dr. Remigio López Solís _____

Dr. Manuel Oyarzún Gómez _____

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Vargas, por guiarme con dedicación e infinita paciencia durante todos estos años, por constituirse como un actor trascendente en mi proceso de formación y crecimiento científico, profesional y personal. Muchas gracias por su confianza y por nunca perder su fe en mí.

A la Prof. María Eugenia Letelier (QEPD), por acogerme como uno más de sus niños, por transmitirme su alegría y ganas de vivir. Por enseñarme que con empeño podemos lograr lo que nos proponemos.

Al Dr. Kurt Schalper, por darme la oportunidad de seguir creciendo científica y profesionalmente, por incentivar me a ser más y mejor, brindándome el impulso que necesitaba en las últimas etapas de este proceso.

A Don Nelson Ponce, por su invaluable ayuda, apoyo, compañía e inagotable ánimo durante el trabajo con animales de experimentación. Gracias por sus enseñanzas e interminables conversaciones durante las agotadoras jornadas de trabajo, en donde arreglábamos el mundo.

A mis compañeros del laboratorio de Infecciones Respiratorias: Carolina Ponce, Rebeca Bustamante, Patricia Pizarro, Andrea Araya, Katherine Rojas, Pablo Iturra, Ignacio Arce, Paula Bonilla y Andrea Méndez. Gracias por su compañía, apoyo, confianza y buena onda durante tanto tiempo.

A mis padres Mario y Patricia, por su inmenso amor e inagotable apoyo, por constituir mi refugio, por estar siempre ahí, presentes. Por su infinita paciencia y comprensión ante mis largas ausencias.

A Marcela, por llegar en el momento que más necesitaba, por renovar mis fuerzas con su amor, comprensión, sabiduría, risas y ridiculez. Por creer en mí y darme nuevos bríos para ser yo.

A Dios, por brindarme la oportunidad de vivir y darme las herramientas para desempeñarme como científico. Por regalarme las cualidades y defectos que me permiten ser la persona que soy. Por su infinito amor, sabiduría y compañía, especialmente en los momentos más oscuros.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis de Doctorado fue realizada bajo la dirección del Dr. Sergio Vargas Munita en el Laboratorio de Infecciones Respiratorias del Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y contó con las siguientes fuentes de financiamiento:

- Proyecto Fondecyt N° 1100225, Investigador Responsable Dr. Sergio Vargas Munita.
- Proyecto Fondecyt N° 1140412, Investigador Responsable Dr. Sergio Vargas Munita.
- Beca CONICYT de Doctorado Nacional, Becario Francisco Pérez Blanco.

PRODUCTIVIDAD

Presentaciones en congresos

- George C., Giordano M., Giraudo F., González S., Pérez F., Vargas S. “Estandarización de una técnica de necropsia y fijación pulmonar para la evaluaciónn histológica de la vía aérea”. VI Jornada de Ayudantes Alumnos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Octubre 2010; Santiago, Chile.
- Bonilla P., Pérez F., Astorga J., Ponce C., Bustamante R., Iturra P., Ponce N., Vargas S.L. “La fijación intravascular de pulmón in situ permite evidenciar remodelación del epitelio respiratorio en ratas que cursan infección primaria por *Pneumocystis*”. I Encuentro Científico Internacional para la Optimización de Modelos Murinos en Investigación. Enero 2012; Valdivia, Chile.
- Pérez F., Iturra P., Ponce C.A., Vargas S.L. “La neumonía por *Pneumocystis* incrementa el peso pulmonar y genera acumulación de líquido en pulmones de ratas”. II Congreso Ciencia Joven, ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile. Septiembre 2012; Santiago, Chile.
- Pérez F., Iturra P.A., Ponce C.A., Vargas S.L. “*Pneumocystis* induce edema pulmonar en ratas que cursan PcP”. XXXIV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. Noviembre 2012; Villarrica, Chile.

- Pérez F., Iturra P., Ponce C.A., Vargas S.L. “La neumonía por *Pneumocystis* (PcP) induce edema pulmonar en ratas”. XVI Congreso Panamericano de Infectología y XXX Congreso Chileno de Infectología. Mayo 2013; Santiago, Chile.
- Pérez F., Ponce N., Rojas D., Ponce C.A., Iturra P.A., Bustamante R.I., Gallo M., Hananias K., Vargas S.L. “Relative contribution of viruses and Ca⁺²-activated Cl⁻ channel 1 to *Pneumocystis*-associated increased expression of MUC5AC in autopsied infant lungs”. XIII International Congress on Pediatric Pulmonology. Junio 2014; Brujas, Bélgica.

Publicaciones

- Vargas S.L., Ponce C.A., Gallo M., Pérez F., Astorga J.F., Bustamante R., Chabé M., Durand-Joly I., Iturra P., Miller R.F., Aliouat El.M., Dei-Cas E. “Near-Universal Prevalence of *Pneumocystis* and Associated Increase in Mucus in the Lungs of Infants With Sudden Unexpected Death”. *Clinical Infectious Diseases* 2013; 56: 171-179.
- Pérez F., Méndez G., Lagos A., Vargas S.L. “Dinámica y patología del barrido mucociliar como mecanismo defensivo del pulmón y alternativas farmacológicas de tratamiento”. *Revista Médica de Chile* 2014; 142: 606-615.

- Pérez F.J., Ponce C.A., Rojas D.A., Iturra P.A., Bustamante R.I., Gallo M., Hananias K., Vargas S.L. “Fungal colonization with *Pneumocystis* correlates to increasing chloride channel accessory 1 (hCLCA1) suggesting a pathway for up-regulation of airway mucus responses, in infant lungs”. Results in Immunology 2014; 4: 58-61.
- Pérez F.J., Iturra PA, Ponce CA, Magne F, Garcia-Angulo V, Vargas SL. “Niflumic Acid Reverses Airway Mucus Excess and Improves Survival in the Rat Model of Steroid-Induced *Pneumocystis* Pneumonia.” Front Microbiol. 2019 Jul 5;10:1522. doi: 10.3389/fmicb.2019.01522.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ABREVIACIONES	xv
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxii
INTRODUCCIÓN	1
La neumonía por <i>Pneumocystis</i> (PcP)	1
Colonización por <i>Pneumocystis</i>	1
PcP en el hospedero inmunocomprometido	2
Respuesta inmune en PcP	2
Tratamiento de PcP y epidemiología	3
Generalidades del epitelio respiratorio	3
Factores que alteran la producción de moco	4
<i>Pneumocystis</i> y sobreproducción de moco	5
Ácido niflúmico y sobreproducción de moco	6
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Animales	10

Inducción de PcP	11
Administración de ácido niflúmico	12
Obtención de muestras	13
Muestras histológicas	14
Muestras de pulmón fresco	15
Análisis de las muestras	15
Histología y mediciones morfométricas	15
Tinción G-G	16
Tinción H-E	17
Tinción AB/PAS	18
Evaluación gravimétrica de agua pulmonar	19
Evaluación de toxicidad renal y hepática	19
Homogeneización de tejido pulmonar	20
Extracción de ARN y proteínas	20
Evaluación de expresión de Muc5ac y mClca3 por PCR	21
Evaluación de producción de MUC5AC y mCLCA3 por WB	24
Análisis estadístico	26
RESULTADOS	27
Estandarización del modelo de PcP, evaluación de sobrevida y acumulación de líquido pulmonar	27
Modelo de inducción de PcP	27
Evaluación del peso corporal durante PcP	28

Evaluación de la sobrevida a PcP	29
Evaluación de la intensidad de PcP	30
Evaluación de la acumulación de líquido pulmonar en PcP	31
Cuantificación de cambios inflamatorios y moco durante PcP	32
Evaluación de la intensidad de PcP	32
Evaluación histológica de la inflamación	34
Evaluación histológica de la producción de moco	36
Evaluación de la expresión de Muc5ac y mClca3 por PCR	38
Evaluación de la producción de MUC5AC y mCLCA3 por WB	39
Evaluación de la administración del ácido niflúmico	40
Evaluación del peso corporal	41
Evaluación de toxicidad renal y hepática	42
Evaluación del efecto del ácido niflúmico en la sobrevida, inflamación y moco durante PcP	43
Modelo de inducción de PcP y sacrificios	43
Evaluación de la intensidad de PcP	44
Evaluación histológica de la inflamación	45
Evaluación histológica de la producción de moco	47
Evaluación de la expresión de Muc5ac y mClca3 por PCR	49
Evaluación de la producción de MUC5AC y mCLCA3 por WB	50
Evaluación de la sobrevida a PcP	52
Evaluación del esquema de tratamiento con AN	53

DISCUSIÓN	54
Modelo de PcP inducida por corticoides	54
Evolución del epitelio a fenotipo hipersecretor de moco y relación con inflamación	56
Sobreproducción de moco inducida por <i>Pneumocystis</i>	57
CLCA y modulación de la producción de moco pulmonar	59
mCLCA3 como inhibidor de la producción de moco pulmonar	60
Regulación de la producción de moco mediada por IL-13	61
Modelo hipotético de la sobreproducción de moco en PcP	62
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de inducción experimental de PcP mediante administración de esteroides.....	27
Figura 2: Evolución del peso corporal de ratas durante el modelo de inducción de PcP.....	28
Figura 3: Evaluación de la sobrevivida de ratas durante el modelo de inducción de PcP.....	29
Figura 4: Evaluación histológica de quistes de <i>Pneumocystis</i> durante PcP.....	30
Figura 5: Evaluación gravimétrica del líquido pulmonar durante PcP.....	31
Figura 6: Evaluación histológica de quistes de <i>Pneumocystis</i> durante PcP.....	32
Figura 7: Progresión de la respuesta inflamatoria durante PcP.....	34
Figura 8: Cuantificación de cambios inflamatorios alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos durante PcP.....	35
Figura 9: Progresión de la producción de moco durante PcP.....	36
Figura 10: Cuantificación de cambios en la producción de moco en el epitelio respiratorio y en el lumen bronquiolar durante PcP.....	37
Figura 11: Cuantificación de cambios en la expresión de Muc5ac y mClca3 durante PcP.....	38

Figura 12: Cuantificación de cambios en la producción de MUC5AC y mCLCA3 durante PcP.....	39
Figura 13: Evolución del peso corporal de ratas sanas durante el tratamiento con ácido niflúmico.....	41
Figura 14: Evaluación de la toxicidad del tratamiento con ácido niflúmico.....	42
Figura 15: Modelo de inducción de PcP por administración de esteroides y evaluación del efecto del ácido niflúmico.....	43
Figura 16: Evaluación histológica de quistes de <i>Pneumocystis</i> durante el tratamiento con ácido niflúmico.....	44
Figura 17: Efecto del ácido niflúmico en la respuesta inflamatoria durante PcP.....	45
Figura 18: Cuantificación del efecto del ácido niflúmico sobre los cambios inflamatorios alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos durante PcP.....	46
Figura 19: Efecto del ácido niflúmico en la producción de moco durante PcP.....	47
Figura 20: Cuantificación del efecto del ácido niflúmico en la producción de moco en el epitelio respiratorio y en el lumen bronquiolar durante PcP.....	48
Figura 21: Cuantificación del efecto del ácido niflúmico en la expresión de Muc5ac y mClca3 durante PcP.....	49

Figura 22: Cuantificación del efecto del ácido niflúmico en la producción de MUC5AC y mCLCA3 durante PcP.....	50
Figura 23: Efecto del ácido niflúmico en la sobrevida de ratas con PcP.....	52
Figura 24: Efecto del ácido niflúmico en la sobrevida de ratas con PcP, al usar un esquema alternativo de tratamiento.....	55
Figura 25: Modelo hipotético de sobreproducción de moco inducida por <i>Pneumocystis</i> durante PcP y posibles niveles de acción del ácido niflúmico.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Evaluación de la carga de quistes de <i>Pneumocystis</i> en improntas de pulmón de animales sanos e inmunosuprimidos por 8 semanas.....	30
Tabla 2: Evaluación de la carga de quistes de <i>Pneumocystis</i> en improntas de pulmón de animales inmunosuprimidos sin profilaxis (PcP) e inmunosuprimidos con profilaxis (TMS) luego de 8 semanas de inmunosupresión.....	33
Tabla 3: Evaluación de la carga de quistes de <i>Pneumocystis</i> en improntas de pulmón de animales inmunosuprimidos que recibieron solución vehículo o ácido niflúmico (AN).....	44

ABREVIACIONES

°C	: Grados Celsius
µm	: Micrómetro
µM	: Micromolar
AB/PAS	: Azul de alcian/ Ácido peryódico de Schiff
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
ALKP	: Fosfatasa alcalina
ALT	: Alanino aminotransferasa
AN	: Ácido niflúmico
ANOVA	: Análisis de varianza
ARN	: Ácido ribonucleico
ARNm	: Ácido ribonucleico mensajero
AST	: Aspartato aminotransferasa
CCSP	: Proteína secretora de la célula club
CD4	: Cúmulo de diferenciación 4
CLCA	: Canal de cloruro activado por calcio
COX-2	: Ciclooxygenasa 2
CREA	: Creatinina
DBIL	: Bilirrubina directa
DIDS	: Ácido 4,4`-Diisotiocianostilbeno 2,2`-disulfónico
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DPC	: Ácido carboxílico 2-difenilamina

DTT	: Ditioneitol
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EPOC	: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FOXA2	: Proteína forkhead box A2
Fw	: Partidor hacia adelante (orientación 5'-3')
g	: Gramo
G	: Fuerza centrífuga relativa
G-G	: Gomori-grocott
GGT	: Gamma glutamil transpeptidasa
HCl	: Ácido clorhídrico
H-E	: Hematoxilina-eosina
HEPA	: Aire particulado de alta eficiencia
HRP	: Peroxidasa de rábano
IgE	: Inmunoglobulina E
IgG	: Inmunoglobulina G
IgM	: Inmunoglobulina M
IL-4	: Interleuquina 4
IL-13	: Interleuquina 13
IL-4R α	: Subunidad alfa del receptor de interleuquina 4
IL-13R α 1	: Subunidad alfa 1 del receptor de interleuquina 13
JAK	: Quinasa de Janus
Kg	: Kilogramo

KCl	: Cloruro de potasio
KH_2PO_4	: Fosfato de potasio monobásico
L	: Litro
LPS	: Lipopolisacárido
mg	: Miligramo
mL	: Mililitro
mM	: Milimolar
M	: Concentración molar
MUC	: Mucina
N	: Concentración normal
NaHCO_3	: Bicarbonato de sodio
NaCl	: Cloruro de sodio
Na_2HPO_4	: Fosfato de sodio dibásico
NP-40	: Nonilfenoxipolietoxietanol
pH	: Potencial de hidrógeno
PcP	: Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i>
PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	: Buffer fosfato salino
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	: Fluoruro de polivinilideno
qPCR	: Reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa

Rv	: Partidor reverso (orientación 3´-5´)
RIPA	: Ensayo de radio inmunoprecipitación
RPM	: Revoluciones por minuto
RT	: Transcripción reversa
RT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
spp	: Especies de un mismo género
SCIDS	: Síndrome de inmunodeficiencia combinada severa
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SIDA	: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIDS	: Síndrome de muerte súbita infantil
SPDEF	: Factor de transcripción ETS con dominio SAM
STAT6	: Transductor de señal y activador de la transcripción 6
Th2	: Respuesta inmune mediada por linfocitos T colaboradores tipo 2
Tris	: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TAE	: Buffer tris-acetato-EDTA
TBIL	: Bilirrubina total
TBS	: Buffer salino con tris
TEMED	: Tetrametiletilendiamina
TMS	: Trimetoprim sulfametoxazol
TNF-a	: Factor de necrosis tumoral alfa
UREA	: Nitrógeno ureico
VIH	: Virus de la inmunodeficiencia humana

VRS : Virus respiratorio sincial

RESUMEN

Pneumocystis es un microhongo extracelular, oportunista y hospedero específico, capaz de producir cuadros de neumonía (PcP) con elevada mortalidad en mamíferos inmunodeprimidos. El tratamiento actual de la infección se basa en eliminar el microorganismo mediante la administración de antibióticos como trimetoprim sulfametoxazol (TMS). Sin embargo, los efectos secundarios son frecuentes y su eficacia terapéutica es limitada, justificando la búsqueda de nuevas y mejores estrategias de tratamiento. *Pneumocystis* no es cultivable microbiológicamente y los mecanismos patogénicos de la infección han sido pobremente caracterizados, dificultando así la identificación de nuevos blancos terapéuticos y haciendo necesario el desarrollo de modelos experimentales de infección en animales para su estudio.

Se ha demostrado que la infección por *Pneumocystis* se asocia a incremento en la producción de moco pulmonar en lactantes y a sobreexpresión de genes asociados a hipersecreción de moco en modelos de infección en animales inmunocompetentes, sugiriendo que el microorganismo es capaz de alterar el sistema productor y secretor de moco en el epitelio respiratorio. No obstante, los mecanismos involucrados en estos cambios y en su posible modulación no han sido evaluados.

En este trabajo se evaluó el potencial de modular el curso y los efectos de la neumonía por *Pneumocystis* en el pulmón mediante la inhibición farmacológica de una de las vías responsables de la producción de moco del epitelio

respiratorio, caracterizando primero los cambios inflamatorios, la acumulación de líquido y la sobreproducción de moco durante la infección, identificando luego un posible blanco de modulación de la secreción patológica de moco y finalmente evaluando los efectos de su inhibición. Para ello se utilizó un modelo animal de inducción de neumonía por *Pneumocystis* a través de la administración de esteroides y ácido niflúmico como inhibidor farmacológico de la sobreproducción de moco pulmonar.

Los resultados evidencian que *Pneumocystis* induce inflamación peribronquial y perivascular, acumulación de líquido, sobreproducción de moco e incrementos en la expresión de MUC5AC y mCLCA3 en el epitelio respiratorio de ratas con PcP. Además, evidencian que el tratamiento con ácido niflúmico detiene y revierte la sobreproducción de moco inducida por el patógeno, mejorando significativamente la supervivencia de los animales a la infección. La disminución de la producción de moco podría ser mediada, al menos en parte, por la disminución de la expresión de mCLCA3 y MUC5AC. Estos resultados permiten comprender de mejor manera la sobreproducción de moco como mecanismo patogénico en la infección por *Pneumocystis* y el rol de mCLCA3 como vía de modulación de la secreción patológica de moco pulmonar.

ABSTRACT

Pneumocystis is an extracellular opportunistic and host-specific microfungus capable of producing pneumonia (PcP) with high mortality rates in immunosuppressed mammals. Current treatment of the infection is based on remove the microorganism using antibiotics such as trimethoprim sulfamethoxazole (TMS). However, side effects are frequent and therapeutic efficacy is limited, justifying the search for better treatment strategies. *Pneumocystis* is microbiologically not cultivable and the pathogenic mechanisms of the infection have been poorly characterized, making it difficult to identify new therapeutic targets and leading necessary the development of animal-based experimental models of infection for its study.

It has been shown that *Pneumocystis* infection is associated with increased mucus production in lungs of infants and overexpression of mucus-associated genes on infection models using immunocompetent animals, suggesting that the microorganism is capable of disturbing the mucus producing and secreting system in the respiratory epithelium. However, the mechanisms involved in these changes and their possible modulation have not been evaluated.

In this work we evaluated the potential of modulating the course of the infection and *Pneumocystis* effects in rat lungs by pharmacological inhibition of one of the responsible pathways of mucus production in the respiratory epithelium, characterizing the inflammatory, fluid accumulation and mucus overproduction changes first, identifying a possible modulation target of mucus hypersecretion

later and evaluating the effects of its inhibition finally. To this end we used a corticoid-induced *Pneumocystis pneumonia* animal model and niflumic acid was administered as pharmacological inhibitor of overproduction of pulmonary mucus. Results show that *Pneumocystis* induces peribronchial and perivascular inflammation, fluid accumulation, mucus overproduction and increased expression of MUC5AC and mCLCA3 in the respiratory epithelium of rats that undergo pneumonia. They also demonstrate that niflumic acid treatment effectively stops and decreases *Pneumocystis*-induced mucus overproduction and significantly improves animal survival to the infection. Mucus production decrease would be mediated, at least in part, by reduction in mCLCA3 and MUC5AC expression. Results improve our understanding of mucus hypersecretion as a pathogenic mechanism in *Pneumocystis* pneumonia and the role of mCLCA3 as a susceptible pathway for modulation of pathologic lung mucus.

INTRODUCCIÓN

La neumonía por *Pneumocystis* (PcP del inglés "*Pneumocystis Pneumonia*") es una infección pulmonar que afecta a una gama de mamíferos durante estados de inmunodepresión (Vargas S.L, 2013). El agente etiológico es *Pneumocystis* spp., reconocido en la actualidad como un microhongo extracelular. El patógeno es hospedero-específico, siendo esta especificidad muy particular y no ha sido descrita en otros hongos (Durand-Joly et al., 2002). En el caso del ser humano, el agente etiológico de PcP es reconocido como *Pneumocystis jirovecii* (Stringer et al., 2009), mientras que el nombre *Pneumocystis carinii* (Pc) se ha reservado para el microorganismo aislado de rata, especie en la que se describió inicialmente (Vargas S.L, 2013). La carencia de un método reproducible de cultivo microbiológico para *Pneumocystis* ha limitado el estudio de su ciclo de vida y ha enlentecido la comprensión de sus características. Sin embargo, se reconocen dos formas biológicas: quiste (ascus) y trofozoito (Thomas and Limper, 2004). Técnicas avanzadas de diagnóstico han permitido la detección de formas de infección por *Pneumocystis* en la población general (no inmunodeprimida). Estos estados infectivos han sido denominados "colonización", "infección asintomática" o "portación" (Morris et al., 2008) y son mucho más frecuentes que los casos de PcP encontrados en inmunocomprometidos (Medrano et al., 2005; Morris et al., 2004, 2008; O'Donnell et al., 1998; Ponce et al., 2010). La infección más estudiada es la infección primaria, que es asintomática y que se adquiere precozmente en la vida (Vargas et al., 1999). En efecto, es posible la detección

del microorganismo en pulmones del 100% de los lactantes fallecidos entre los 2 y 5 meses de edad y cuyas autopsias no detectaron ningún sustrato anatomopatológico que explique la causa de muerte (Vargas et al., 1999, 2002). La neumonía por *Pneumocystis* sólo se presenta en el hospedero inmunocomprometido. El principal factor predisponente es una disminución o alteración funcional de los linfocitos T. Humanos adultos desarrollan riesgo de PcP cuando sus recuentos de linfocitos T CD4+ caen bajo 300 - 200 células/mm³ (Thomas and Limper, 2004). Tal disminución de linfocitos ocurre, generalmente, en forma secundaria a una infección por VIH o a la administración de una terapia inmunosupresora (Mansharamani et al., 2000). Existen también defectos genéticos del sistema inmune que pueden predisponer a PcP, entre ellos el síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SCIDS), síndrome de hiper-IgE y síndrome de hiper-IgM ligado a cromosoma X (Vargas S.L, 2013). Independientemente de la causa de la inmunodepresión, la infección se inicia cuando *Pneumocystis* ingresa al pulmón y se restringe a este órgano salvo casos muy excepcionales de diseminación descritos en pacientes con defectos de inmunidad celular severos y avanzados (Vargas S.L, 2013).

El éxito de la respuesta inmune contra *Pneumocystis* requiere de una acción coordinada de células epiteliales alveolares, linfocitos, macrófagos, neutrófilos, citoquinas y otros mediadores solubles (Gigliotti and Wright, 2005; Pop et al., 2006; Steele et al., 2005). Pacientes severamente inmunocomprometidos, por ejemplo con SIDA, tienen mejor respuesta y sobrevida al tratamiento anti-

Pneumocystis que pacientes menos inmunocomprometidos, como pacientes oncológicos o reumáticos (Gigliotti and Wright, 2005; Mansharamani et al., 2000). Esta relación entre severidad de respuesta inmune y resultado del proceso infeccioso, en términos de gravedad clínica y sobrevida, podría ser explicada por la magnitud de la respuesta inmune desarrollada por el hospedero más que por las características patogénicas del microorganismo (Gigliotti and Wright, 2005). El tratamiento actual de la infección se basa en eliminar el microorganismo mediante la administración de antibióticos como trimetoprim sulfametoxazol (TMS) (Calderón et al., 2010). Sin embargo, los frecuentes efectos secundarios, la limitada eficacia terapéutica y la emergencia de resistencias al tratamiento, hacen necesaria la búsqueda de nuevas y mejores estrategias para tratar la enfermedad (Huang et al., 2017). Más aún, a pesar que la epidemiología de PcP ha cambiado a través del tiempo, en la actualidad continúa siendo la infección oportunista severa más frecuente en pacientes con SIDA, con una tasa de mortalidad entre el 10 al 20% (Morris et al., 2004; Thomas and Limper, 2004). Pacientes con PcP en ausencia de SIDA presentan una mortalidad entre el 30 al 60% (Thomas and Limper, 2004).

El rol desempeñado por el epitelio respiratorio en la predisposición y gravedad de patologías respiratorias es fundamental. Además de ser una barrera física que detiene y remueve partículas inhaladas como microorganismos, polvo y otros irritantes, contribuye al reconocimiento de patógenos y secreta una gran variedad de mediadores proinflamatorios y con capacidad antimicrobiana, incluyendo

citoquinas, quimioquinas y defensinas (Bals and Hiemstra, 2004). A nivel celular el epitelio está formado por células ciliadas y células secretoras, presentes en similar número conformando un mosaico. Las células secretoras se clasifican en células club (club cells), que secretan surfactantes secretores (proteínas surfactantes A, B y D) y otras proteínas específicas como la proteína secretora de la célula club (CCSP); células caliciformes (goblet), que secretan moco; y células serosas (Bals and Hiemstra, 2004; Vareille et al., 2011). Sobre la superficie del epitelio se encuentran dos capas. Una capa de líquido periciliar, que provee de un medio que permite el movimiento de los cilios, y una capa mucosa (moco), compuesta por agua y proteínas altamente glicosiladas (mucinas), que le confieren viscosidad y adherencia. De esta manera, las partículas que ingresan en el aire inspirado se “pegan” en el moco, para luego ser expulsadas hacia la orofaringe mediante el movimiento de los cilios. Así, cerca del 90% de las partículas inhaladas son transportadas por el moco desde la vía aérea inferior hacia la tráquea, en donde son deglutidas o expectoradas, constituyendo un sistema de defensa que es parte de la inmunidad innata conocido como “barrido mucociliar” (Pérez B. et al., 2014). El moco saludable contiene alrededor de un 3% de sólidos, siendo MUC5AC y MUC5B las principales mucinas secretadas que conforman el gel mucoso que es barrido hacia el exterior por los cilios del epitelio (Fahy and Dickey, 2010; Thornton et al., 2008). Diversos estímulos son capaces de alterar la producción y secreción de moco, afectando la función respiratoria y llevando, en condiciones patológicas, a

la formación de tapones mucosos y bloqueo de la vía aérea (Burgel et al., 2007). Incrementos en la expresión de MUC5AC han sido evidenciados luego del tratamiento de células epiteliales humanas y murinas con lipopolisacárido (LPS), ARN de doble hebra, citoquinas proinflamatorias, elastasa de neutrófilos, infección por virus respiratorio sincicial (VRS) (Tadaki et al., 2009; Voynow et al., 2017; Yanagihara et al., 2001) y, más recientemente, en pulmones de lactantes fallecidos súbitamente e infectados por *Pneumocystis* (Vargas et al., 2013). Sin embargo, la sobreproducción de moco como una característica patológica en PcP no ha sido estudiada.

En ratones inmunocompetentes se ha evidenciado un incremento en la expresión de mClca3 asociado a la infección primaria por *Pneumocystis* (Hernandez-Novoa et al., 2008). mClca3 es miembro de una familia de canales de cloruro activados por calcio (CLCA), expresado selectivamente en células caliciformes del epitelio respiratorio y ha sido relacionado directamente con incrementos en la expresión de MUC5AC y sobreproducción de moco (Nakanishi et al., 2001; Thai et al., 2005). La expresión de su homólogo humano (hCLCA1) se ha visto incrementada en células de la vía aérea de pacientes con asma, EPOC y bronquitis crónica, todas ellas patologías bien conocidas que involucran alteraciones en el sistema productor y secretor de moco pulmonar (Fujimoto et al., 2002; Hauber et al., 2005a; Hoshino et al., 2002). Asimismo, nuestro grupo evidenció aumento de hCLCA1 asociado a *Pneumocystis* en pulmones de lactantes fallecidos súbitamente (Pérez et al., 2014). En conjunto, estas evidencias sugieren que el

moco podría constituir un factor patológico relacionado a la infección por *Pneumocystis* y que sus vías de producción podrían constituir blancos susceptibles de modulación.

El ácido niflúmico (AN) es un antiinflamatorio no esterooidal selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Famaey, 1997), con capacidad de modular la actividad de varios tipos de canales iónicos, siendo reconocido como un potente inhibidor de CLCA (Ledoux, 2004). Estudios evidencian que el AN reduce la expresión de hCLCA1 y MUC5AC, así como también, disminuye la hiperplasia de células caliciformes luego de la estimulación del epitelio respiratorio con diversos estímulos (Yasuo et al., 2006). También se ha demostrado que la expresión de mCLCA3, pero no la de otros CLCA, es inducida por la administración local de IL-13 en ratones y que el ácido niflúmico inhibe los efectos generados por la interleuquina en el epitelio pulmonar (Nakano et al., 2006). Similares resultados han sido descritos mediante la estimulación del epitelio respiratorio con histamina (Kim et al., 2007), humo de cigarrillo (Hegab et al., 2007) y TNF- α (Hauber et al., 2005b), subrayando así la importancia del AN como fármaco capaz de modular la respuesta secretora de moco pulmonar.

Los antecedentes expuestos nos permiten hipotetizar que *Pneumocystis* estimula una respuesta inmune innata mediada por mCLCA3 en el epitelio respiratorio, llevando a la sobreproducción patológica de moco. Para caracterizar los cambios en la producción de moco seleccionamos un modelo animal de PcP inducida por esteroides y posteriormente realizamos un experimento inhibiendo mCLCA3

mediante la administración de ácido niflúmico para evaluar el rol de esta proteína en la patología. Evidenciar un efecto del AN en la disminución de la sobreproducción de moco inducida por *Pnemocystis* podría llevar a la evaluación de fármacos anti-CLCA1 como tratamientos adyuvantes en PcP.

HIPÓTESIS

La inhibición de mCLCA3 mediante la administración de ácido niflúmico disminuye la sobreproducción patológica de moco inducida por *Pneumocystis* en el epitelio respiratorio de ratas durante PcP

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del ácido niflúmico como inhibidor de mCLCA3 en la progresión de la sobreproducción patológica de moco estimulada *Pneumocystis* en el epitelio respiratorio de ratas, en un modelo animal de PcP inducida por esteroides

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar un modelo animal de PcP inducida por inmunosupresión, evaluar la sobrevida a la infección y la acumulación de líquido pulmonar como factor patológico.
2. Cuantificar la progresión de cambios inflamatorios y moco en pulmones de rata durante el desarrollo de PcP.
3. Evaluar vía de administración, dosis y toxicidad sistémica del ácido niflúmico, un inhibidor farmacológico de mCLCA3.
4. Evaluar el efecto del ácido niflúmico en la sobrevida de ratas con PcP inducida por corticoides y en la progresión de cambios inflamatorios y moco en sus pulmones.

MATERIALES Y MÉTODOS

• Animales

Se utilizaron ratas hembra Sprague Dawley con un peso entre 180 y 200 gramos. En todos los experimentos se procuró que los ejemplares provinieran de una misma colonia y sólo una vez alcanzado el peso estipulado fueron seleccionados y aleatorizados a los grupos experimentales. Los animales fueron obtenidos y mantenidos en dependencias no aisladas del bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y tanto el alimento como el agua permanecieron a libre disposición.

En los experimentos con aire controlado, los animales fueron transferidos al interior de un rack de aislamiento de ventilación positiva, compuesto por jaulas con aire tratado por filtros de partículas de alta eficiencia (HEPA, sistema One Cage 2100, LabProducts Inc.). Toda la manipulación de estos ejemplares fue realizada al interior de un gabinete de bioseguridad y recibieron agua, comida y lecho esterilizados, los que fueron cambiados por insumos frescos tres veces a la semana.

Los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (protocolo N° CBA#0634), cumpliendo con la legislación nacional (Ley 20.380) y con directrices internacionales expresadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Institute for Laboratory Animal Research, 2011), siguiendo estas

recomendaciones para reducir tanto el número de animales utilizados como su sufrimiento.

- **Inducción de la neumonía por *Pneumocystis***

Los animales fueron tratados durante 21 días previos al inicio de la inmunosupresión con oxitetraciclina (0,4 mg/mL), administrada en el agua de beber con el objeto de reducir la presencia de patógenos distintos de *Pneumocystis* que pudiesen producir infecciones respiratorias, especialmente *Mycoplasma pulmonis* (Banerjee et al., 1987). Luego, fueron inmunosuprimidos mediante la administración de betametasona (3 mg/L) en el agua de beber y se mantuvo la administración de oxitetraciclina (0,4 mg/mL) de manera concomitante. Como animales control (sin infección) se utilizaron ratas inmunosuprimidas que recibieron adicionalmente trimetoprim (50 mg/Kg) sulfametoxazol (250 mg/Kg) (TMS) administrado en el agua de beber. Este fármaco es reconocido como el más efectivo para la profilaxis y el tratamiento de la infección por *Pneumocystis* (Hughes et al., 1974). La dosis de TMS fue calculada al inicio de cada experimento de acuerdo con el promedio del peso corporal de los animales en los grupos seleccionados a profilaxis y no fue modificada posteriormente pese a las fluctuaciones en el peso de los ejemplares. Luego de 14 días (2 semanas) de tratamiento inmunosupresor, se seleccionaron aleatoriamente 2 animales por grupo experimental, se extrajeron sus pulmones y se evaluó la presencia de quistes de *Pneumocystis* en improntas de tejido

pulmonar teñidas con tinción argéntica de Gomori-Grocott (GG). Una vez comprobada la infección, y su ausencia en los animales control, todos los ejemplares fueron transferidos a dependencias con aire controlado (One Cage 2100, LabProducts Inc.) y se continuó la inmunosupresión por 42 días adicionales, totalizando 56 días de tratamiento (8 semanas).

- **Administración de ácido niflúmico**

El tratamiento con ácido niflúmico se realizó utilizando soluciones preparadas diariamente y como solución vehículo se utilizó NaHCO_3 0,4 M en glucosa 5%, pH 7,5 (Parai and Tabrizchi, 2002). La solución de ácido niflúmico se preparó disolviendo 30 mg de ácido niflúmico (Sigma-Aldrich) en 10 ml de solución vehículo y manteniendo en agitador magnético por 30 minutos hasta la total disolución. Las soluciones de ácido niflúmico y vehículo fueron ajustadas a pH 7,5 con HCl y filtradas a través de filtros de $0,22 \mu\text{m}$ justo antes de su utilización. La administración de las soluciones se realizó por vía intraperitoneal. Para ello se pesaron los animales y se calculó el volumen de solución necesario a inyectar para obtener la dosificación deseada (3, 6 ó 12 mg/Kg/día). Las dosis y la duración del tratamiento fueron seleccionadas en base a trabajos previos (Hegab et al., 2007; Nakano et al., 2006; Parai and Tabrizchi, 2002). Animales control recibieron un volumen equivalente de vehículo. Para la inyección intraperitoneal los ejemplares se inmovilizaron por la espalda mediante sujeción a la altura de los hombros y con los dedos alrededor del tórax. Se levantaron y se expuso y

limpió el abdomen con etanol 70%. Luego se inyectó el volumen de solución en la cavidad peritoneal usando jeringas de tuberculina de 1 ml, procurando introducirlas con un ángulo de 30°, ligeramente a izquierda o derecha de la línea media del ombligo y a medio camino entre la sínfisis pubiana y el apéndice xifoides. Se alternó la administración de las soluciones entre los costados izquierdo y derechos del abdomen en cada día de tratamiento. Para reducir al máximo posible el estrés en los animales, el procedimiento completo de administración intraperitoneal no superó los 3 minutos de manipulación por cada ejemplar.

- **Obtención de muestras**

Los animales fueron pesados y luego anestesiados mediante la administración intraperitoneal de xilacina (10 mg/Kg) y ketamina (100 mg/Kg). Una vez sedados y comprobada la ausencia de reflejo ante un estímulo doloroso, se procedió a abrir el abdomen y a exponer los grandes vasos abdominales. En los puntos de sacrificio en que se realizaron evaluaciones histológicas y moleculares se seleccionó aleatoriamente la mitad de los ejemplares para perfusión intravascular de formalina para la obtención de pulmones fijados in-situ (muestras histológicas) y la otra mitad se destinó a la obtención de pulmones frescos (evaluaciones moleculares).

Muestras histológicas

Para conservar de mejor manera la arquitectura pulmonar y evitar el desplazamiento del moco debido al colapso del pulmón al abrir el tórax, se diseñó un procedimiento de fijación pulmonar vascular *in situ* (en el interior del tórax). Para ello se canuló la vena cava inferior y se perfundió una solución de fijación compuesta por formalina al 3,7% en buffer fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,2) por microgoteo rápido (120 microgotas/minuto) a una presión de perfusión de 25 centímetros de altura. 5 segundos después de iniciado el flujo de solución fijadora, se seccionó el hígado para evitar la hipervolemia y se continuó la perfusión de fijador hasta la administración de un volumen total de 20 mL. Con este procedimiento el corazón del animal deja de latir en aproximadamente 1 minuto desde el inicio de la perfusión del fijador. Luego los ejemplares fueron colocados en una bandeja plástica, se cubrieron los abdómenes con gasa estéril, se humedecieron con solución fijadora y fueron mantenidos por 12 horas a temperatura ambiente para permitir la fijación de los pulmones en el interior del tórax (*in-situ*). Una vez transcurrido el tiempo de fijación *in situ* se abrió el tórax, se extrajeron los pulmones y se mantuvieron a temperatura ambiente por 12 horas adicionales, sumergidos en solución fijadora. Finalmente se seleccionó el lóbulo superior derecho, el que fue incluido en parafina para la posterior realización de cortes histológicos.

Muestras de pulmón fresco

Para las determinaciones moleculares se utilizaron muestras sin fijar. Para ello los animales fueron sedados y luego exanguinados mediante sección quirúrgica de la aorta abdominal. Después se abrió el tórax, se extrajeron los pulmones, se lavaron brevemente con PBS frío (4 °C), se seleccionó el lóbulo superior derecho, se cortó el tejido en trozos pequeños, se envolvieron en gasa estéril y se mantuvieron sumergidos en solución preservadora RNAlater (QIAGEN) por 24 horas. Luego se eliminó la solución y se guardó el tejido a -80 °C hasta su utilización.

Para las determinaciones del contenido de agua pulmonar los animales fueron sedados y luego decapitados mediante guillotina. Una vez exanguinados, se abrió el tórax y se extrajeron los pulmones, los que se limpiaron cuidadosamente eliminando todo el tejido anexo.

• Análisis de las muestras

Histología y mediciones morfométricas

Bloques de parafina conteniendo el lóbulo superior derecho de cada pulmón fueron orientados con su cara dorsal hacia arriba para la realización de cortes histológicos longitudinales seriados de 5 µm de espesor. Luego los cortes fueron desparafinados, rehidratados y teñidos como a continuación se detalla:

Tinción argéntica de Gomori-Grocott (G-G): Se realizó esta tinción para evidenciar la presencia de quistes de *Pneumocystis* mediante la observación microscópica del microorganismo. Para ello los cortes fueron incubados en solución de ácido crómico 5% a 65 °C durante 1 minuto, se lavaron con agua destilada, se incubaron en solución de bisulfito de sodio 1% por 1 minuto y se lavaron con agua destilada. Luego se sumergieron en solución de plata (25 mL solución stock [100 mL de metamina 3%; 5 mL de nitrato de plata 3%]; 25 mL agua destilada; 2 mL de borato de sodio; 15 mL de DMSO) y se incubaron en microondas hasta alcanzar una temperatura de 65 °C. Se lavaron con agua destilada y se limpió el exceso de plata de los portaobjetos. Después se incubaron en solución de cloruro de oro 0,2% por 1 minuto, se lavaron con agua destilada, se sumergieron en solución de tiosulfato de sodio 2% por 1 minuto y se repitió el lavado con agua destilada. Finalmente se incubaron los cortes en solución verde brillante 1% por 2 minutos, se lavaron con agua destilada, deshidrataron, montaron y observaron en microscopio OLYMPUS BX60. La evaluación de la intensidad de la infección se realizó utilizando una escala semicuantitativa previamente descrita y validada (Beck et al., 2003). Esta escala oscila desde 0 (no se detectan quistes de *Pneumocystis*) hasta 4+ (quistes de *Pneumocystis* y exudado espumoso presentes a través de los alveolos en la mayoría del tejido).

Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E): Se utilizó esta tinción para evaluar la inflamación peribronquiolar y perivascular. Para ello los cortes se incubaron en solución de hematoxilina durante 10 minutos, se lavaron con agua corriente por 5 minutos, se pasaron rápidamente por agua destilada, alcohol ácido y agua destilada. Luego, se lavaron en agua corriente por 30 segundos, se pasaron por agua destilada y se incubaron en solución de eosina durante 3 minutos. Finalmente se sumergieron rápidamente en alcohol 70°, se lavaron con agua destilada, deshidrataron, montaron y observaron en microscopio OLYMPUS BX60 conectado a una cámara de video QImaging MicroPublisher 3.3 RTV (QImaging). Se evaluó la presencia de inflamación peribronquiolar y perivascular a través de la observación microscópica de manguitos (cuffs) celulares en el intersticio de bronquiolos menores a 300 μm de diámetro y sus vasos sanguíneos asociados presentes en el tejido. Las muestras fueron analizadas en ciego y calificadas de acuerdo con un puntaje (score) semicuantitativo (Iturra et al., 2018; Poole et al., 2009), en donde 0= ausencia de cuffs; 1= cuffs en <25% de los intersticios; 2= cuffs presentes entre el 25 y 50% de los intersticios; y 3= cuffs en >50% de los intersticios. Las mediciones morfométricas fueron realizadas en 5 bronquiolos seleccionados al azar por cada animal, en los 4 ejemplares de cada grupo y fecha de sacrificio. La selección de bronquiolos fue realizada mediante la generación de números aleatorios (Haahr, 1998).

Tinción Alcian Blue/ Periodic Acid-Schiff (AB/PAS): Se utilizó esta tinción para la evaluación de la sobreproducción de moco en el epitelio respiratorio. Para ello los cortes se incubaron en solución AB (azul de alcian 1% en ácido acético 3%; pH 2,5) durante 30 minutos y se lavaron 3 veces con agua destilada. Luego se incubaron en ácido periódico 1% por 10 minutos y se lavaron 3 veces con agua destilada. Después se incubaron en solución de Schiff (fucsina básica 0,45%; metabisulfito de sodio 0,45%; ácido clorhídrico 0,1%) por 30 minutos y se lavaron 3 veces con agua sulfurosa (ácido clorhídrico 0,05 N; metabisulfito de sodio 0,6%). Finalmente se lavaron en agua destilada por 5 minutos, se deshidrataron, montaron y observaron en microscopio OLYMPUS BX60 conectado a una cámara de video QImaging MicroPublisher 3.3 RTV (QImaging). Se obtuvieron imágenes de bronquiolos con un diámetro menor a 300 μm presentes en el tejido. Se evaluó el área de epitelio ocupada por moco a través de la cuantificación del área relativa de epitelio teñida con AB/PAS (AB/PAS positiva), considerando para ello el área de tejido comprendida entre la membrana basal y el lumen. También se evaluó la obstrucción del lumen bronquiolar a través de la cuantificación del porcentaje del lumen ocupado por moco y secreciones mucopurulentas. Las mediciones de sobreproducción de moco fueron realizadas en ciego, utilizando el programa Image Pro-Plus 5.1 (MEDIA CYBERNETICS). Las mediciones fueron realizadas en 5 bronquiolos seleccionados al azar por cada animal, en los 4 ejemplares de cada grupo y fecha de sacrificio. La selección de bronquiolos fue realizada mediante la generación

de números aleatorios (Haahr, 1998).

Evaluación gravimétrica de edema pulmonar

Se evaluó la acumulación de líquido pulmonar (edema) a través de la medición del contenido de líquido en los pulmones extraídos en fresco y secados en estufa a 85 °C por 24 horas. Para ello, se pesaron los pulmones inmediatamente después de extraídos en balanza analítica sobre soportes de papel aluminio previamente pesados (peso pulmonar húmedo). Luego, se dejaron secar en estufa a 85 °C por 24 horas y se registró nuevamente su peso en balanza analítica (peso pulmonar seco). El tiempo óptimo de secado de los pulmones fue determinado en experimentos previos, en donde se observó que luego de 24 horas de secado a 85 °C, el peso pulmonar seco se mantiene constante. Los resultados se expresaron como índice peso pulmonar húmedo/ peso pulmonar seco (Hwang et al., 2001).

Evaluación de toxicidad renal y hepática

Se evaluó la toxicidad del tratamiento farmacológico a través de la medición en el suero de alteraciones en los siguientes parámetros: creatinina (CREA), nitrógeno ureico (UREA), bilirrubina total y directa (TBIL-DBIL), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALKP), alanino aminotransferasa (ALT) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT). Para ello se obtuvieron 3 mL de sangre de la vena cava inferior con jeringa de 3 mL. Se traspasó cuidadosamente

la sangre a tubos de plástico (BD Vacutainer Serum) y se dejó coagular por 2 horas a temperatura ambiente. Luego, los tubos se centrifugaron a 1500 RPM por 15 minutos y se recuperó la fracción superior (suero) en tubos de polipropileno (Falcon, FisherScientific). Los tubos con suero fueron enviados inmediatamente después de su extracción al Laboratorio Clínico del Hospital de la Universidad de Chile, en donde se realizaron las mediciones.

Homogeneización del tejido y extracción de ARN y proteínas

Para la extracción de ARN, 30 mg de tejido pulmonar fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido, pulverizados finamente y homogeneizados en mortero de porcelana. Se dejó evaporar el nitrógeno y se extrajo ARN total utilizando el kit RNeasy Mini (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se guardó a -80 °C hasta su utilización.

Para la extracción de proteínas, 300 mg de tejido pulmonar fueron homogeneizados mediante disrupción mecánica con Tissue-Tearor (BioSpec Products Inc.) a 20000 RPM por 5 segundos en buffer RIPA modificado (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; NP-40 1%; deoxicolato de sodio 0,5%; PMSF 1 mM; aprotinina 1 µg/ml; leupeptina 1 µg/ml; pepstatina 1 µg/ml) a 4 °C. Las muestras se incubaron en hielo por 30 minutos, se centrifugaron a 10000 x G por 10 minutos y se recuperó la fracción de proteínas totales (sobrenadante) las que se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

Evaluación de la expresión génica de mCLCA3 y MUC5AC por PCR

La evaluación de la expresión de mCLCA3 y MUC5AC se realizó en ciego con respecto al estatus de *Pneumocystis*, utilizando reacciones de la polimerasa en cadena (PCR) semi cuantitativas. Para ello se cuantificó el ARN con espectrofotómetro en cubetas de cuarzo y se sintetizó ADN complementario (ADNc) utilizando el kit SuperScript II RT (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó 1 µg de ARN total en cada reacción de transcripción reversa (RT). Los ADNc obtenidos fueron conservados a -80 °C hasta su utilización. Se diseñaron las siguientes parejas de partidores específicos para la amplificación de los ADNc blanco, utilizando la herramienta Primer-BLAST (NCBI, NIH, USA):

***Muc5ac*:** Partidor Fw: ACC ACG GAT ATC AGA ACC AGC

Partidor Rv: TGT CAA GCC ACT TGG TCC AG

Producto esperado: 199 bp.

***mClca3*:** Partidor Fw: AGT GAT CGT GGA CAG CAC AG

Partidor Rv: TTG GCT ATG CCT GGG ACT TG

Producto esperado: 165 pb.

Las reacciones de PCR para *Muc5ac* y *mClca3* se realizaron en un volumen final de 50 µl, utilizando el siguiente mix de reactivos:

Buffer PCR 5X (Invitrogen)	: 10 μ l
MgCl ₂ 25 mM (Invitrogen)	: 3 μ l
dNTPs 10 mM (Invitrogen)	: 1 μ l
Partidor Fw 10 μ M	: 1 μ l
Partidor Rv 10 μ M	: 1 μ l
Taq DNA polimerasa (Invitrogen)	: 0,25 μ l
Agua libre de nucleasas	: 31,75 μ l
ADNc	: 2 μ l

Las reacciones de PCR fueron realizadas bajo las siguientes condiciones:

95 °C por 5 minutos	
95 °C por 30 segundos	} X 30 ciclos
65 °C por 30 segundos	
72 °C por 30 segundos	
72 °C por 5 minutos	

Para normalizar los resultados se utilizó β -actina como gen blanco constitutivo, usando los siguientes partidores:

β -actina: Partidor Fw: GCG CAA GTA CTC TGT GTG GA

Partidor Rv: CAT CGT ACT CCT GCT TGC TG

Producto esperado: 501 bp.

Las reacciones de PCR para β -actina se realizaron en un volumen final de 50 μ l, utilizando el mismo mix de reactivos descrito anteriormente para *Muc5ac* y *mClca3*.

Las reacciones de PCR para β -actina fueron realizadas bajo las siguientes condiciones:

95 °C por 5 minutos
95 °C por 30 segundos
55 °C por 30 segundos
72 °C por 45 segundos
72 °C por 5 minutos

} X 30 ciclos

Una vez finalizadas las reacciones de PCR, se separaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE: tris 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM), se tiñeron los geles en solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) en buffer TAE y se obtuvieron imágenes utilizando el sistema de documentación Gel Doc EZ (BIO-RAD). Se analizó la intensidad de las bandas de expresión para cada gen mediante densitometría utilizando el programa Image J (NIH, USA). Se calculó la expresión relativa de cada gen normalizando los valores con la intensidad de banda de expresión del gen constitutivo β -Actina respectivo a cada una de las muestras.

Evaluación de la producción de mCLCA3 y MUC5AC por Western Blot

La producción de mCLCA3 se evaluó mediante Western Blot en condiciones reductoras. Para ello se cuantificaron proteínas totales usando el método de Bradford (BIO-RAD Protein Assay). Luego, 30 µg de proteínas fueron alicuotadas, mezcladas en partes iguales con buffer de carga (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; dodecil sulfato de sodio (SDS) 4%; azul de bromofenol 0,2%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol 200 mM) y hervidas a 95 °C por 10 minutos. A continuación las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en buffer Tris-Glicina (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%), utilizando geles al 4% (concentrador: 6,1 mL de agua; 1,3 mL acrilamida/bisacrilamida 30%; 2,5 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 0,1 mL SDS 10%; 0,1% persulfato de amonio; 25 µl TEMED) y 8% (resolutivo: 4,7 mL de agua; 2,7 mL acrilamida/bisacrilamida 30%; 2,5 mL Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 0,1 mL SDS 10%; 0,1% persulfato de amonio; 25 µl TEMED). Terminada la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF en buffer de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; metanol 20%). Luego, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de las membranas con leche descremada al 5% en buffer TBS (Tris-HCl 20 mM; 500 mM NaCl; pH 7,5) durante toda la noche a 4 °C. La detección de mCLCA3 y Actina se realizó usando los siguientes anticuerpos, diluidos en buffer TBS-Leche 1%:

CLCA3: Anticuerpo primario: conejo anti-CLCA3 IgG (1:200, Santa Cruz Biotechnology); Anticuerpo secundario: pollo anti-conejo IgG-HRP (1:2000,

Santa Cruz Biotechnology).

Actina: Anticuerpo primario: cabra anti-Actina IgG (1:500, Santa Cruz Biotechnology); Anticuerpo secundario: burro anti-cabra IgG-HRP (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). El revelado se realizó por quimioluminiscencia (Pierce ECL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y con film fotográfico CL-XPosure (ThermoFischer Scientific). Los resultados se obtuvieron a través de la medición de la intensidad de las bandas, normalizadas en relación con la expresión de Actina, utilizando el programa Image J (NIH, USA).

La evaluación de la producción de MUC5AC se realizó en condiciones no reductoras ya que el epítipo reconocido por el anticuerpo primario es destruido por agentes reductores como β -mercaptoetanol y Ditioneitol (DTT), lo que fue evaluado en ensayos preliminares. Para el Western Blot se cuantificaron proteínas totales usando el método de Bradford (BIO-RAD Protein Assay). Luego, 30 μ g de proteínas fueron alicuotadas, mezcladas en partes iguales con buffer de carga sin agente reductor y hervidas a 95 °C por 10 minutos. A continuación, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en buffer Tris-Glicina de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente y usando geles al 4% (concentrador) y 8% (resolutivo). Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y bloqueadas toda la noche en buffer TBS-leche descremada 5% a 4 °C. La detección de MUC5AC se realizó usando los siguientes anticuerpos, diluidos en buffer TBS-Leche 1%:

MUC5AC: Anticuerpo primario: ratón anti-MUC5AC IgG (1:500, Santa Cruz

Biotechnology); Anticuerpo secundario: cabra anti-ratón IgG-HRP (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). El revelado se realizó por quimioluminiscencia (Pierce ECL) con film CL-XPosure (ThermoFischer Scientific). Como control de carga se midió la expresión de Actina. Los resultados se obtuvieron a través de la medición de la intensidad de las bandas, normalizadas a la expresión de Actina, con el programa Image J (NIH, USA).

Análisis estadístico

El número de animales a utilizar por experimento fue calculado considerando resultados de experimentos preliminares, utilizando un nivel de significancia (alfa) de 0,05 y un poder estadístico de 80%. Los resultados fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar. Las comparaciones entre dos grupos experimentales se realizaron con test de t-student de dos colas. Para las comparaciones entre tres o más grupos experimentales se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía con test a posteriori de Tukey y ANOVA de dos vías con test a posteriori de Bonferroni cuando se evaluaron dos factores. Los análisis de sobrevida fueron realizados utilizando el estimador de Kaplan-Meier y las distribuciones de sobrevida fueron comparadas con test de Mantel-Cox. En todos los casos se consideró una significancia estadística de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS

Estandarizar el modelo de PcP inducida por inmunosupresión para evaluar sobrevida a la infección y acumulación de líquido pulmonar como factor patológico.

En primer lugar, evaluamos la progresión del peso corporal, acumulación de líquido pulmonar y sobrevida de los animales durante 8 semanas de inmunosupresión con esteroides (betametasona), utilizando el modelo de inducción experimental de PcP (**Figura 1**).

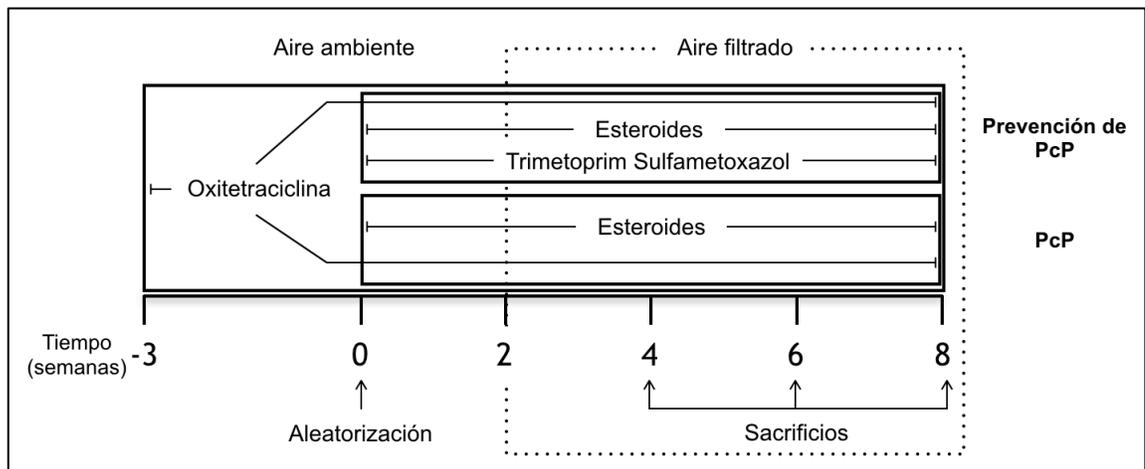


Figura 1: Modelo de inducción experimental de PcP mediante administración de esteroides. PcP: neumonía por *Pneumocystis*.

Se observó que los animales que recibieron tratamiento inmunosupresor evidenciaron una progresiva disminución de peso, mientras que los animales no inmunosuprimidos lo incrementaron gradualmente (**Figura 2**).

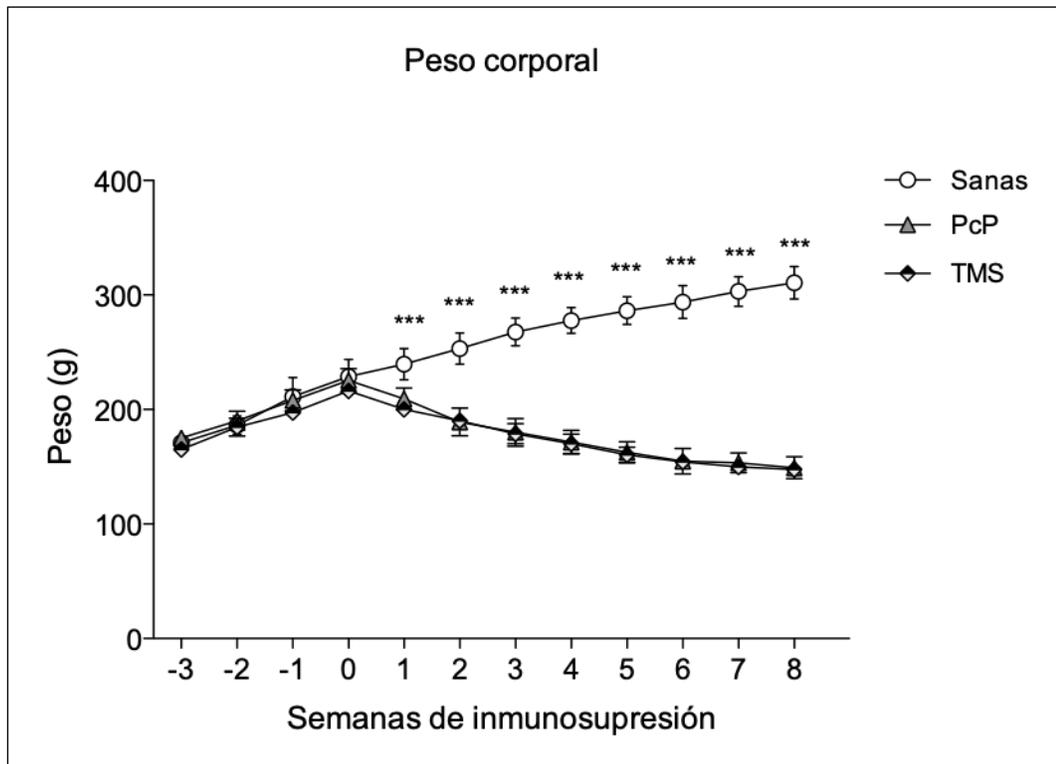


Figura 2: Evolución del peso corporal de ratas durante el modelo de inducción de PcP. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; n=8 animales; test ANOVA: ***p<0,001.

No hubo diferencias significativas en la disminución de peso entre animales inmunosuprimidos sin profilaxis (PcP) e inmunosuprimidos con profilaxis (TMS), lo que sugiere que la reducción del peso es atribuible a la acción del inmunosupresor y no a la infección por *Pneumocystis*.

En el grupo de animales inmunosuprimidos que no recibieron profilaxis, se registraron fallecimientos a los 40, 42 y 43 días de tratamiento (3/8), por lo que la sobrevivencia en este grupo (PcP) a las 8 semanas de tratamiento es cercana al 60% (**Figura 3**). No hubo ejemplares muertos en los otros grupos experimentales, lo que demuestra que la profilaxis con TMS es 100% eficaz.

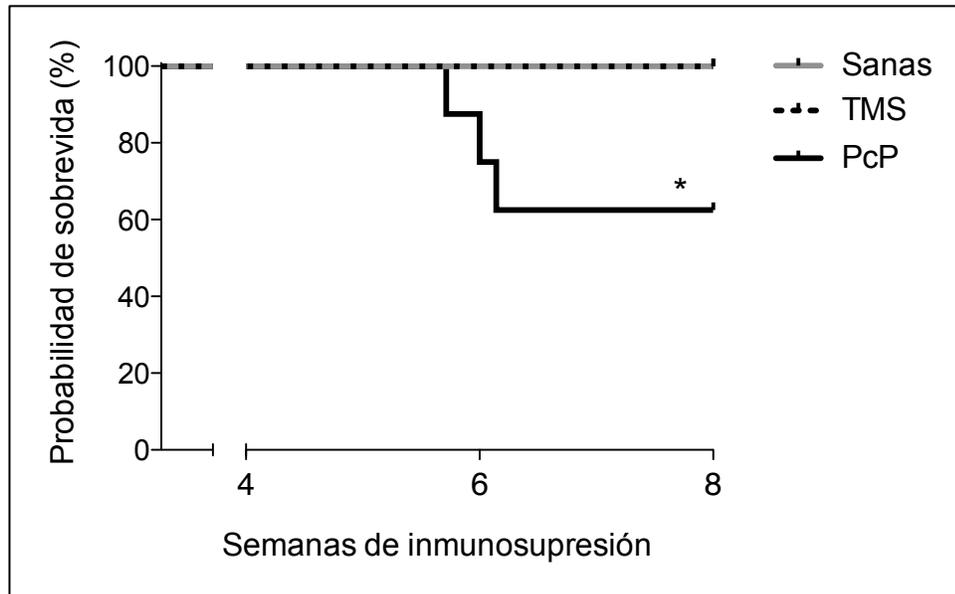


Figura 3: Evaluación de la sobrevivencia de ratas durante el modelo de inducción de PcP. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; n=8 animales; test Mantel-Cox; *p<0,05.

Se realizaron improntas de tejido pulmonar de los 3 animales fallecidos antes de finalizar el tratamiento y de todos los animales restantes a las 8 semanas de inmunosupresión. En todos los animales inmunosuprimidos que no recibieron profilaxis fue posible observar quistes de *Pneumocystis* (**Figura 4**). La intensidad de la infección fue compatible con neumonía (score 3+, **Tabla 1**). Animales

inmunosuprimidos y tratados con TMS no desarrollaron la infección, al igual que los ejemplares sanos.

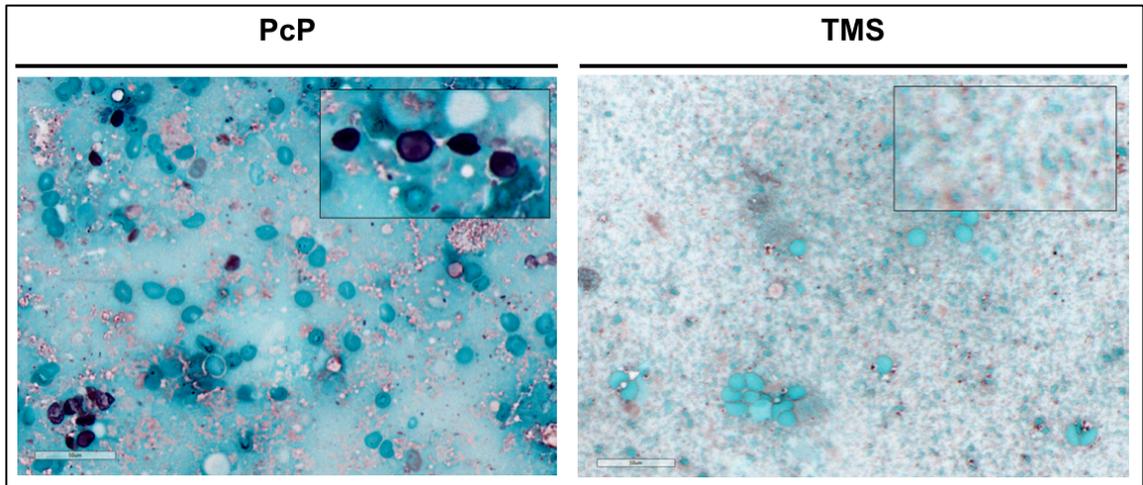


Figura 4: Evaluación histológica de quistes de *Pneumocystis* durante PcP. Improntas representativas de tejido pulmonar de ratas infectadas (PcP) y con profilaxis (TMS) luego de 8 semanas de inmunosupresión. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; Tinción G-G, barra 50 μ m.

Grupo experimental	Tratamiento	Animales con quistes	Carga de quistes en improntas (score)
PcP	Betametasona + Oxitetraciclina	8/8	3+
TMS	Betametasona + Oxitetraciclina + TMS	0/8	0
Sanas	Sin inmunosupresor	0/8	0

Tabla 1: Evaluación de la carga de quistes de *Pneumocystis* en improntas de pulmón de animales sanos e inmunosuprimidos por 8 semanas, con y sin profilaxis anti *Pneumocystis*. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol.

Luego, evaluamos la acumulación de líquido pulmonar a través de mediciones gravimétricas de los pulmones de animales sacrificados en la 8a semana de inmunosupresión. Se evidenció un peso significativamente mayor en pulmones húmedos (frescos) de animales con PcP en relación con los otros grupos (**Figura 5A**). La diferencia en el peso pulmonar húmedo no fue atribuible a diferencias en el peso corporal inicial o final de los animales (**Figuras 2 y 5B**, respectivamente). No se evidenciaron diferencias significativas en el peso pulmonar seco (**Figura 5C**). La relación peso húmedo/ peso seco de pulmones de animales con PcP fue significativamente mayor a ejemplares de los otros grupos, evidenciando acumulación de líquido pulmonar (**Figura 5D**).

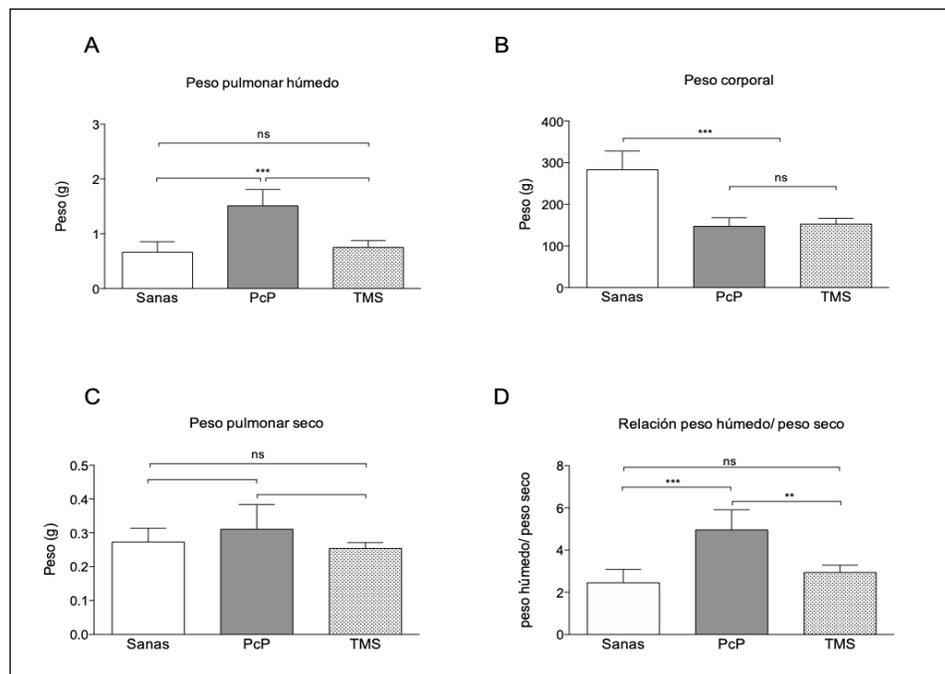


Figura 5: Evaluación gravimétrica de líquido pulmonar durante PcP. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; n=5 animales; test ANOVA: ns: no significativo; **p<0,01; ***p<0,001.

Cuantificar la progresión de cambios inflamatorios y moco en pulmones de rata durante el desarrollo de PcP.

A continuación, se utilizó el modelo de inducción de PcP (**Figura 1**) para cuantificar la progresión de cambios inflamatorios y de producción de moco en ratas inmunosuprimidas.

Se detectó la presencia de quistes de *Pneumocystis* en improntas de tejido pulmonar de los animales que recibieron inmunosupresión sin profilaxis (**Figura 6**, PcP). Animales inmunosuprimidos con profilaxis no evidenciaron la presencia de quistes (**Figura 6**, TMS). La intensidad de la infección en los animales sin profilaxis (PcP) fue compatible con neumonía (score 3+, **Tabla 2**).

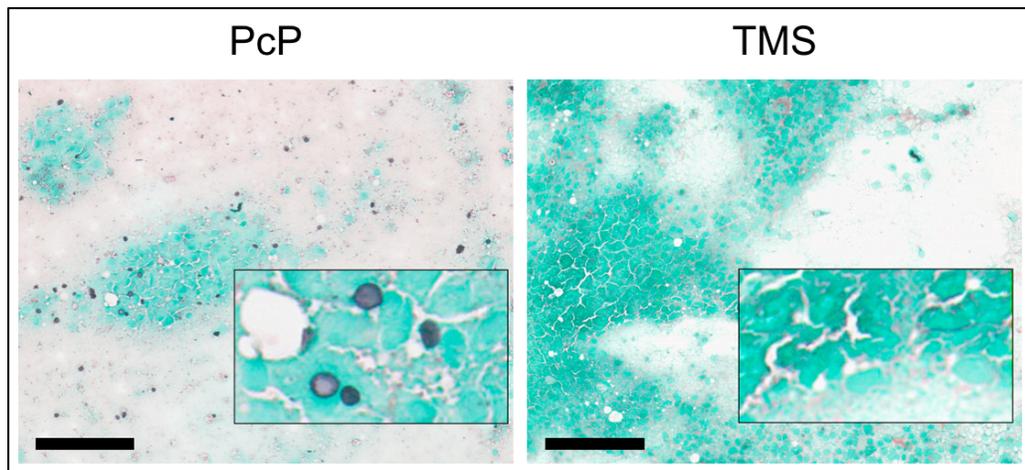


Figura 6: Evaluación histológica de quistes de *Pneumocystis* durante PcP. Improntas representativas de tejido pulmonar de ratas inmunosuprimidas sin profilaxis (PcP) e inmunosuprimidas con profilaxis (TMS) luego de 8 semanas de inmunosupresión. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; Tinción G-G, barra 100 μ m.

Grupo experimental	Tratamiento	Animales con quistes	Carga de quistes en improntas (score)
PcP	Betametasona + Oxitetraciclina	12/12	3+
TMS	Betametasona + Oxitetraciclina + TMS	0/12	0

Tabla 2: Evaluación de la carga de quistes de *Pneumocystis* en improntas de pulmón de animales inmunosuprimidos sin profilaxis (PcP) e inmunosuprimidos con profilaxis (TMS) luego de 8 semanas de inmunosupresión. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol.

A continuación evaluamos la progresión de la respuesta inflamatoria en secciones de pulmón teñidas con H-E a las 4, 6 y 8 semanas de inmunosupresión. Se observó progresivo incremento de infiltrados inflamatorios (cuffs) en el intersticio de bronquiolos y vasos sanguíneos de animales que no recibieron profilaxis (**Figura 7**, flechas).

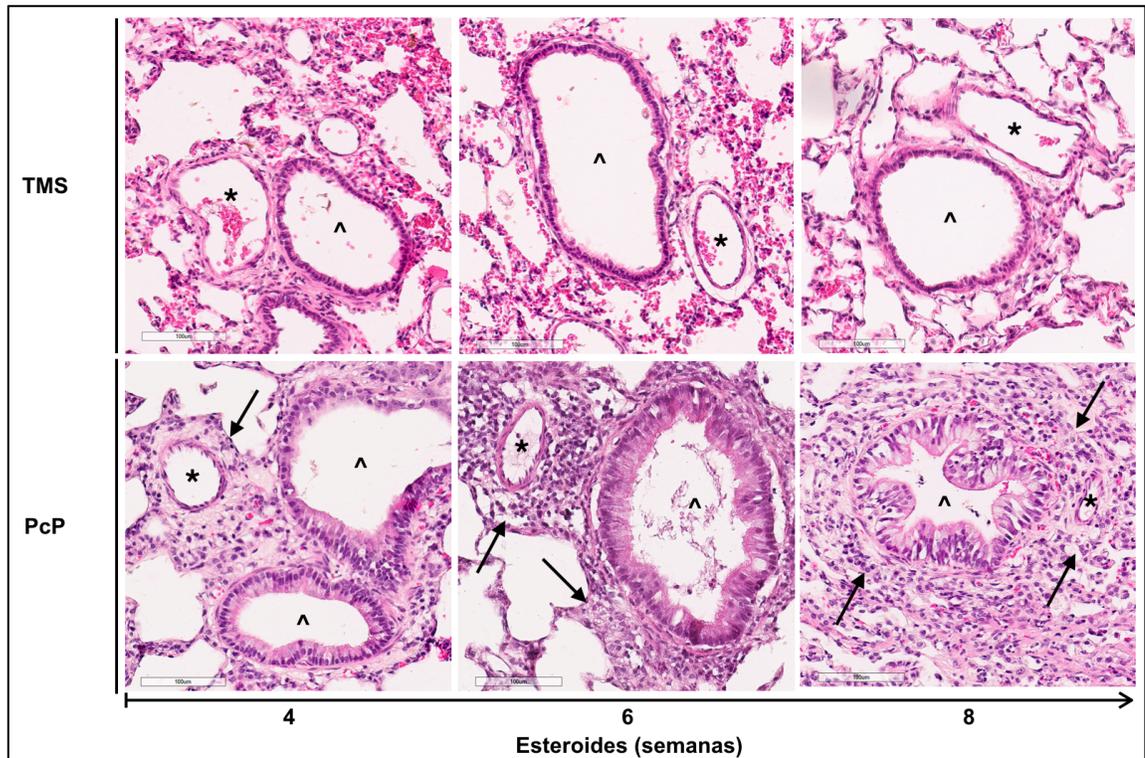


Figura 7: Progresión de la respuesta inflamatoria durante PcP. Imágenes representativas de cada punto de sacrificio de ratas inmunosuprimidas con profilaxis (TMS) o sin profilaxis (PcP). ^: lumen bronquiolar; *: lumen vascular; flecha: infiltrados inflamatorios (cuffs); PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; Tinción H-E, barra 100 μm .

Las mediciones de los cambios inflamatorios evidenciaron que los infiltrados (cuffs) aparecieron más tardíamente alrededor de los bronquiolos (6 semanas de inmunosupresión, **Figura 8A**), que alrededor de los vasos sanguíneos (4 semanas de inmunosupresión, **Figura 8B**). Animales que recibieron profilaxis (TMS) no evidenciaron inflamación significativa en ninguno de los puntos de sacrificio.

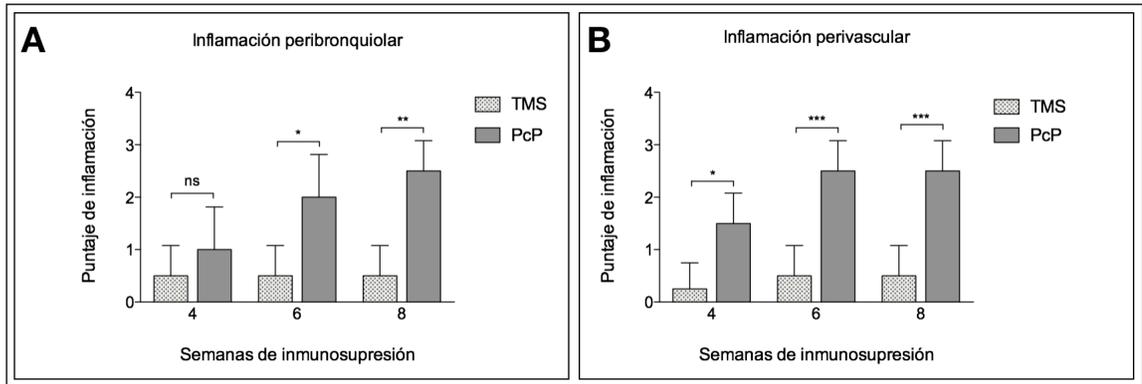


Figura 8: Cuantificación de cambios inflamatorios alrededor de bronquiolos (**A**) y vasos sanguíneos (**B**) durante el desarrollo de PcP. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; n=4 animales; test ANOVA: ns: no significativo; *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

En cortes histológicos de pulmón teñidos con AB/PAS se evidenció una progresiva sobreproducción de moco en los animales sin profilaxis (PcP) durante el desarrollo de la neumonía (**Figura 9**). También se detectó la aparición progresiva de gránulos de mucinas intracelulares en el epitelio respiratorio (**Figura 9**, cabezas de flecha) y tapones mucosos (**Figura 9**, flechas).

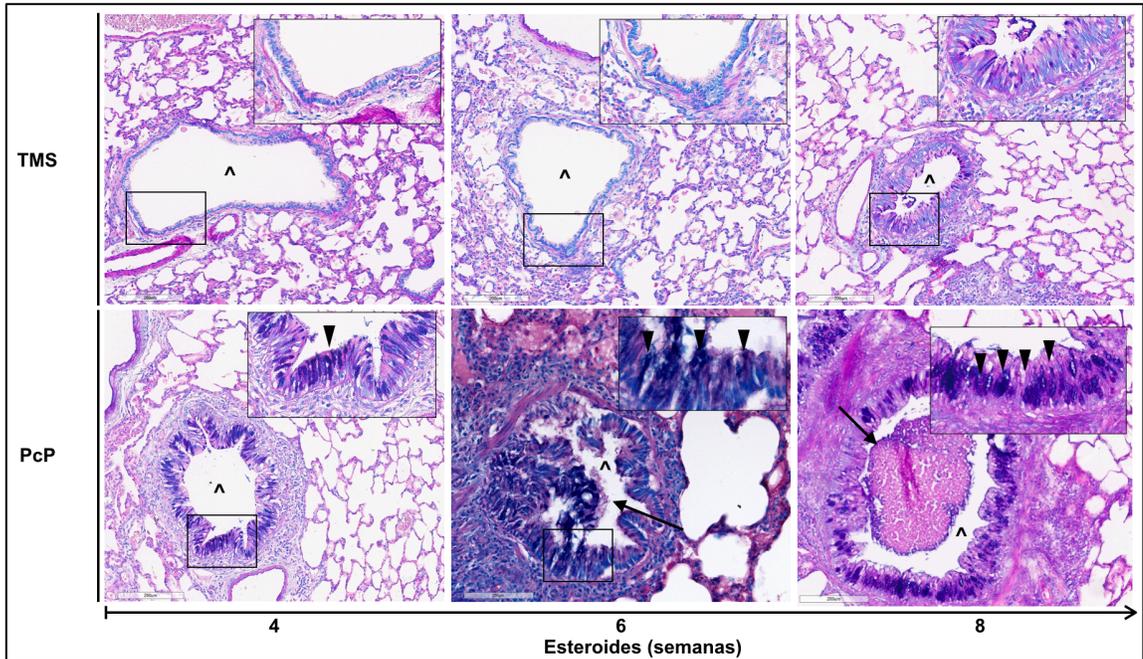


Figura 9: Progresión de la producción de moco durante PcP. Imágenes representativas de cada punto de sacrificio de ratas inmunosuprimidas con profilaxis (TMS) o sin profilaxis (PcP). ^: lumen bronquiolar; flecha: tapones mucosos; cabezas de flecha: gránulos de mucinas; PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; Tinción AB/PAS, barra 200 μm .

La sobreproducción de moco en el epitelio fue significativa a las 4 semanas de inmunosupresión (**Figura 10A**), mientras que la obstrucción del lumen bronquiolar por tapones mucosos fue significativa más tardíamente (8 semanas de inmunosupresión, **Figura 10B**). Células AB/PAS positivas y tapones mucosos fueron prácticamente indetectables en animales control que recibieron profilaxis.

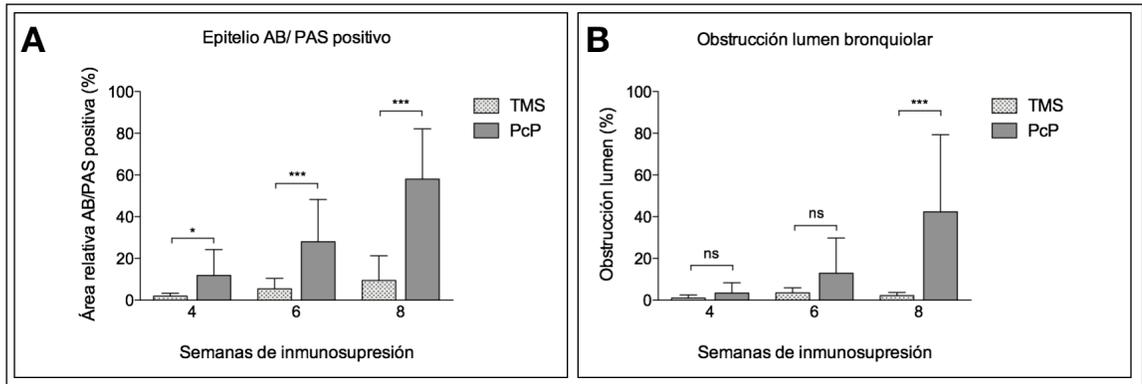


Figura 10: Cuantificación de cambios en la producción de moco en el epitelio respiratorio (**A**) y en el lumen bronquiolar (**B**) durante el desarrollo de PcP. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; n=4 animales; test ANOVA: ns: no significativo; *p<0,05; ***p<0,001.

Se evidenció un incremento significativo en la expresión de Muc5ac (**Figura 11A,B**) y mClca3 (**Figura 11C,D**) a partir de la 6ª semana de inmunosupresión. Animales inmunosuprimidos que recibieron profilaxis no mostraron cambios significativos en la expresión de ninguno de estos genes.

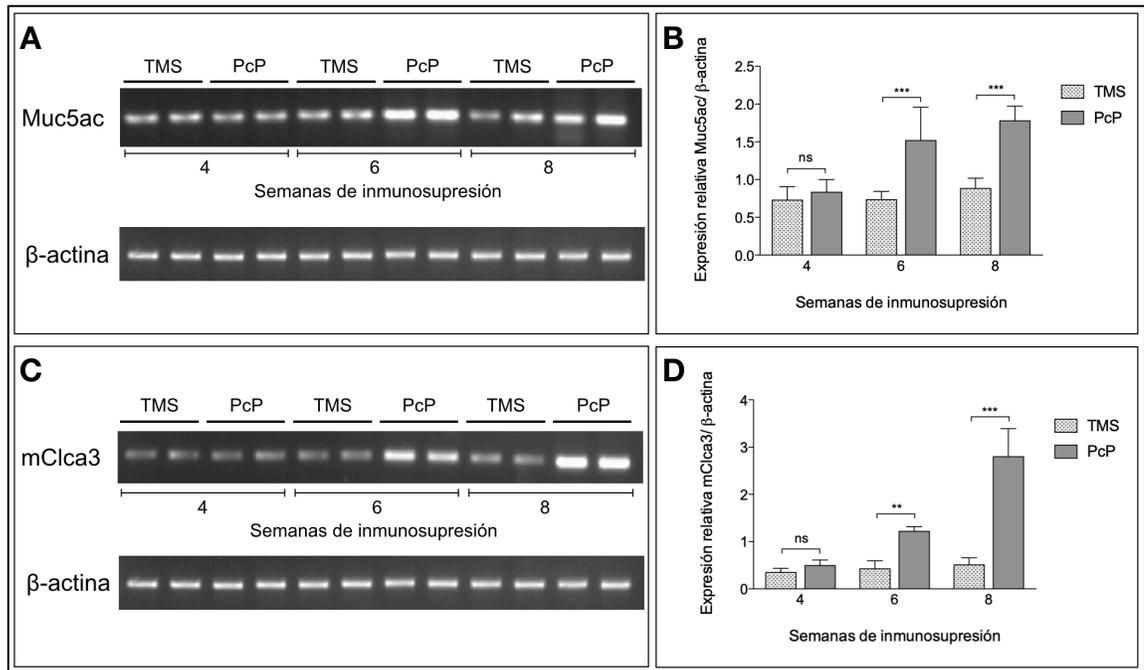


Figura 11: Cuantificación de cambios en la expresión de Muc5ac y mClca3 durante PcP. **A,C:** Imágenes representativas del análisis en gel de agarosa con productos de PCR de animales inmunosuprimidos con profilaxis (TMS) o sin profilaxis (PcP) en cada punto de sacrificio. **B,D:** Cuantificación relativa de la expresión génica. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; n=4 animales; test ANOVA: ns: no significativo; **p<0,01; ***p<0,001.

De igual forma, se evidenció un incremento significativo en la producción de MUC5AC en animales con PcP desde la 6ª semana de inmunosupresión (**Figura 12A,C**) y de mCLCA3 a partir de la 4ª semana de inmunosupresión (**Figura 12B,D**). Animales con profilaxis no mostraron diferencias significativas en la producción de estas proteínas.

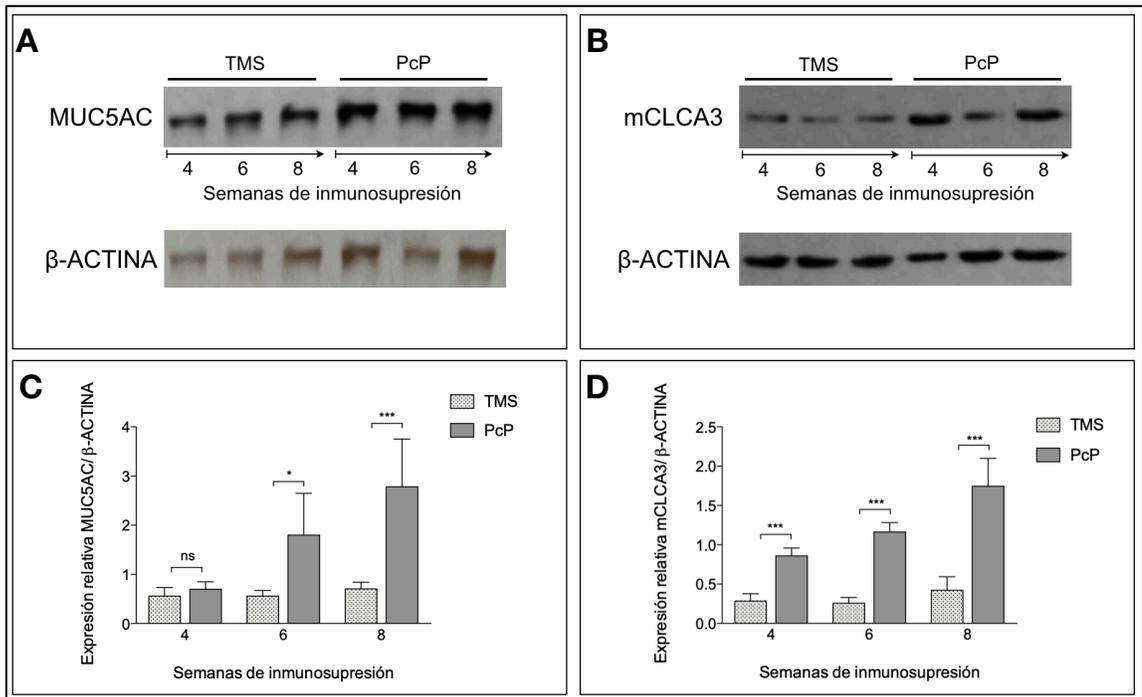


Figura 12: Cuantificación de cambios en la producción de MUC5AC y mCLCA3 durante PcP. **A,B:** Imágenes representativas del análisis por Western Blot de animales inmunosuprimidos con profilaxis (TMS) o sin profilaxis (PcP) en cada punto de sacrificio. **C,D:** Cuantificación relativa de la expresión de proteínas. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; n=4 animales; test ANOVA: ns: no significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

En conjunto, los resultados obtenidos en ratas con PcP inducida por esteroides evidencian que *Pneumocystis* induce progresiva inflamación, sobreproducción de moco y sobreexpresión de MUC5AC y mCLCA3.

Evaluar vía de administración, dosis y toxicidad sistémica del ácido niflúmico, un inhibidor farmacológico de mCLCA3.

Se evaluó la seguridad y tolerancia de los animales a la administración intraperitoneal de ácido niflúmico. Para ello se administraron dosis de 3 y 12 mg/Kg/día, durante 28 días a ratas sanas. La dosis de 3 mg/Kg fue seleccionada por ser la mínima dosis utilizada en ratas que ha demostrado disminuir la producción de moco, en un modelo de administración crónica por 28 días (Hegab et al., 2007). La dosis de 12 mg/Kg fue elegida por ser equivalente a la máxima dosis utilizada en ratones para disminuir la producción de moco, en un modelo de administración aguda por 4 días (Nakano et al., 2006). Ratas control recibieron un volumen equivalente de vehículo solo. Animales que recibieron ácido niflúmico, al igual que los ejemplares que recibieron vehículo, evidenciaron un incremento progresivo del peso corporal. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos tratados con las diferentes dosis de ácido niflúmico o con vehículo (**Figura 13**).

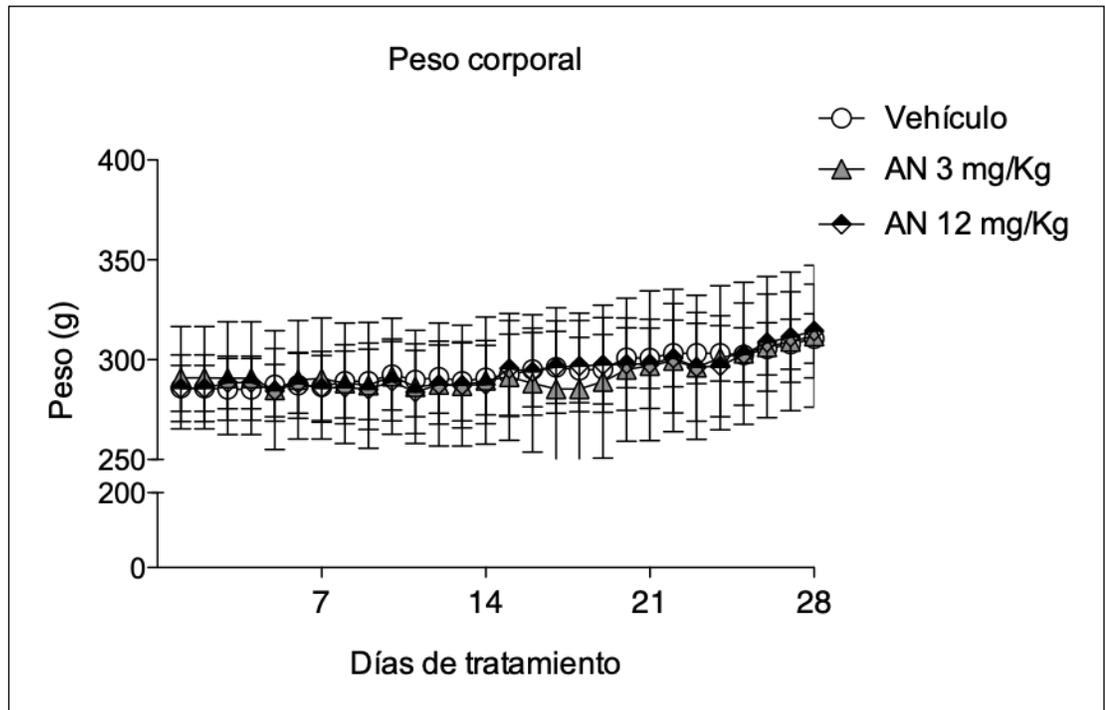


Figura 13: Evolución del peso corporal de ratas sanas durante el tratamiento con ácido niflúmico. AN: ácido niflúmico; n=5 animales; test ANOVA: no significativo.

Se observó un incremento dosis-dependiente de los niveles plasmáticos de nitrógeno ureico (UREA) en los animales tratados con ácido niflúmico. Este incremento es significativo a la mayor dosis utilizada (12 mg/Kg) en comparación a animales control (**Figura 14A**). De igual manera, se evidenció un incremento significativo de fosfatasa alcalinas (ALKP) en animales que recibieron ácido niflúmico 3 mg/Kg en comparación a ejemplares que recibieron dosis de 12 mg/Kg y a ratas control (**Figura 14B**). Los demás parámetros analizados no evidenciaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (**Figura 14**). A pesar de las diferencias detectadas en UREA y ALKP, los valores medidos

en todos los marcadores evaluados se encuentran comprendidos dentro de los rangos normales para ratas Sprague Dawley (Caridad et al., 2011).

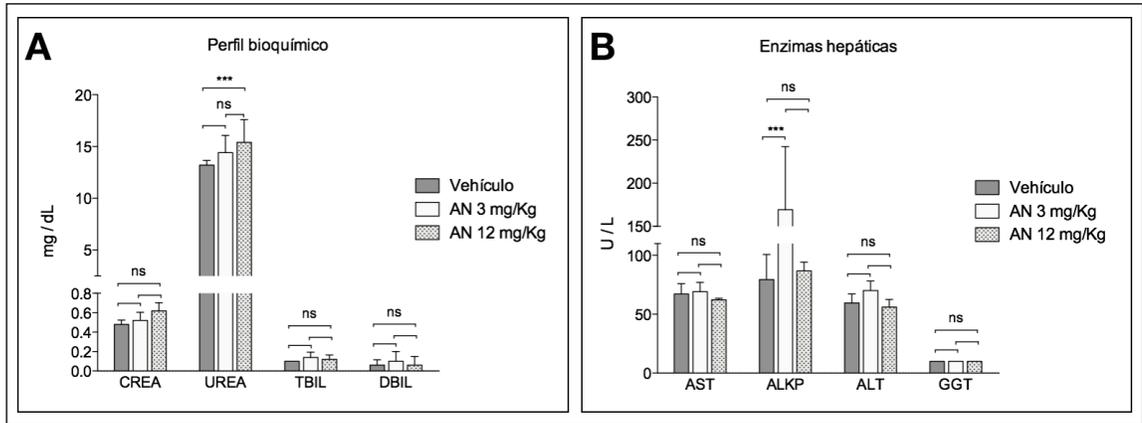


Figura 14: Evaluación de la toxicidad del tratamiento con ácido niflúmico. **A:** Perfil bioquímico. **B:** Actividad de enzimas hepáticas. AN: ácido niflúmico; CREA: creatinina; UREA: nitrógeno ureico; TBIL-DBIL: bilirrubina total y directa; AST: aspartato aminotransferasa; ALKP: fosfatasa alcalina; ALT: alanino aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa; n=5 animales; test ANOVA: ns: no significativo; ***p<0,001.

Estos resultados evidencian que el tratamiento intraperitoneal con ácido niflúmico, a dosis de 3 y 12 mg/Kg durante 28 días, es seguro y bien tolerado por los animales.

Evaluar el efecto del ácido niflúmico en la sobrevida y en la progresión de cambios inflamatorios y moco en pulmones de rata durante el desarrollo de PcP.

A continuación, dos grupos de animales fueron inmunosuprimidos con esteroides (betametasona) y luego de la 4 semana de tratamiento se les administró ácido niflúmico (6mg/Kg/día) o bien vehículo solo (**Figura 15**).

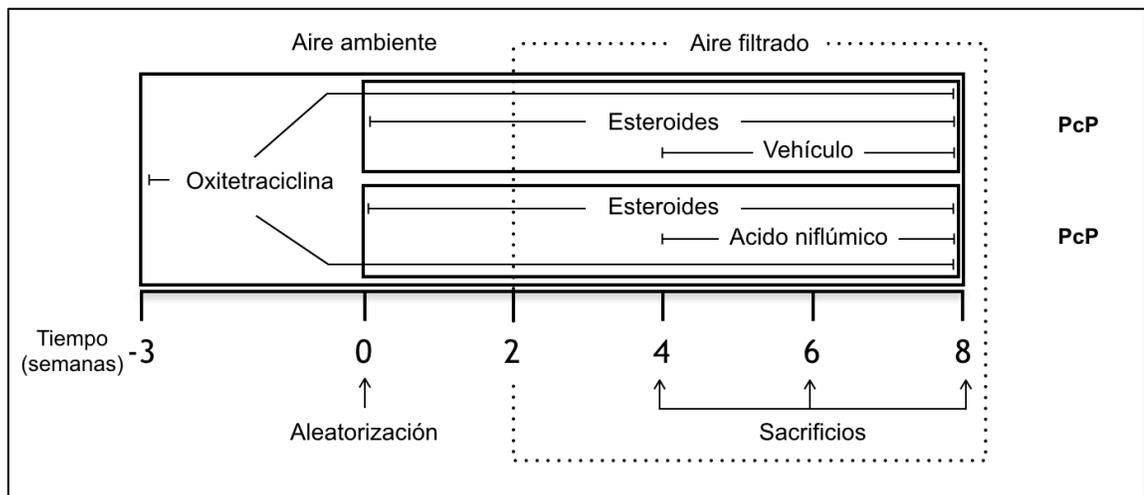


Figura 15: Modelo de inducción de PcP por administración de esteroides y evaluación del efecto del ácido niflúmico. PcP: neumonía por *Pneumocystis*.

Se detectó la presencia de quistes de *Pneumocystis* en improntas de tejido pulmonar tanto en los animales que recibieron ácido niflúmico como en los que recibieron vehículo (**Figura 16**). La intensidad de la infección en los animales fue compatible con neumonía (score 3+, **Tabla 3**).

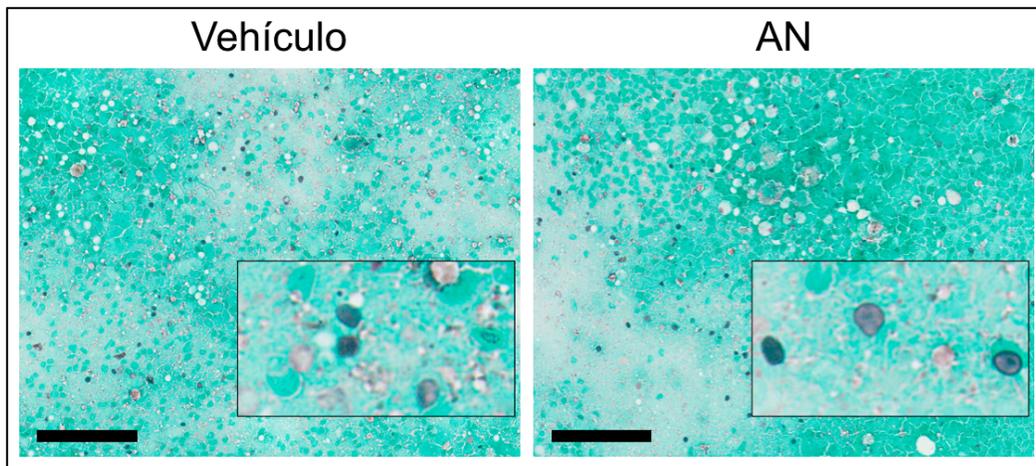


Figura 16: Evaluación histológica de quistes de *Pneumocystis* durante el tratamiento con ácido niflúmico. Improntas representativas de tejido pulmonar de animales inmunosuprimidos que recibieron solución vehículo o ácido niflúmico (AN). Tinción G-G, barra 100 μ m.

Grupo experimental	Tratamiento	Animales con quistes	Carga de quistes en improntas (score)
Vehículo	Betametasona + Oxitetraciclina + Vehículo desde la 4a semana	12/12	3+
AN 6 mg/Kg	Betametasona + Oxitetraciclina + AN a partir de la 4a semana	12/12	3+

Tabla 3: Evaluación de la carga de quistes de *Pneumocystis* en improntas de pulmón de animales inmunosuprimidos que recibieron solución vehículo o ácido niflúmico (AN).

En cortes histológicos de pulmón teñidos con H-E se observó que el tratamiento con ácido niflúmico ralentiza la progresión de infiltrados inflamatorios (cuffs) alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos, independientemente de la presencia de *Pneumocystis* (**Figura 17**, flechas).

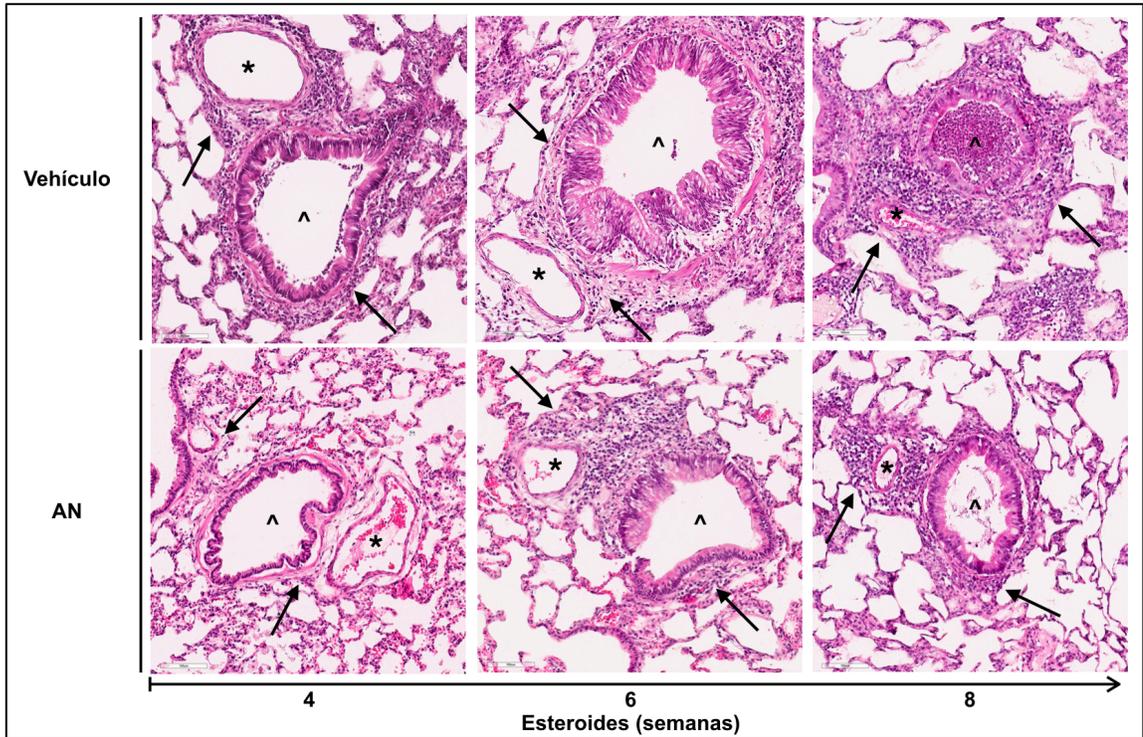


Figura 17: Efecto del ácido niflúmico en la respuesta inflamatoria durante PcP. Imágenes representativas de cada punto de sacrificio de ratas inmunosuprimidas que recibieron solución vehículo o ácido niflúmico (AN). ^: lumen bronquiolar; *: lumen vascular; flecha: infiltrados inflamatorios (cuffs). Tinción H-E, barra 100 μm .

La disminución en la progresión es significativa a las 8 semanas de inmunosupresión, correspondiendo a 4 semanas de tratamiento continuo con ácido niflúmico (**Figura 18**). Animales que recibieron vehículo evidenciaron progresiva inflamación, tanto peribronquiolar como perivascular.

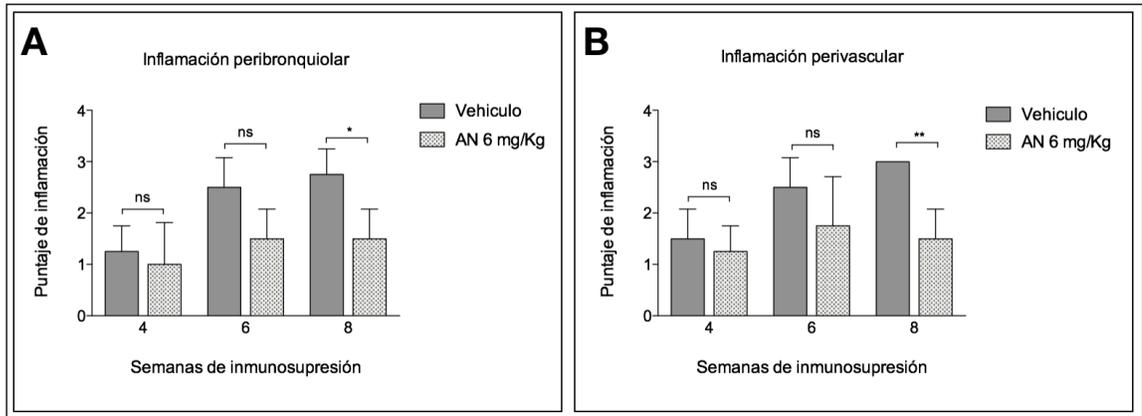


Figura 18: Cuantificación del efecto del ácido niflúmico sobre los cambios inflamatorios alrededor de bronquiolos (**A**) y vasos sanguíneos (**B**) durante PcP. AN: ácido niflúmico; n=4 animales; test ANOVA: ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En cortes histológicos de pulmón teñidos con AB/PAS se observó que el tratamiento con ácido niflúmico es capaz de detener y revertir la sobreproducción de moco, evidenciado a través de una disminución significativa de las áreas teñidas con AB/PAS en pulmones de los animales que recibieron este tratamiento (**Figura 19**).

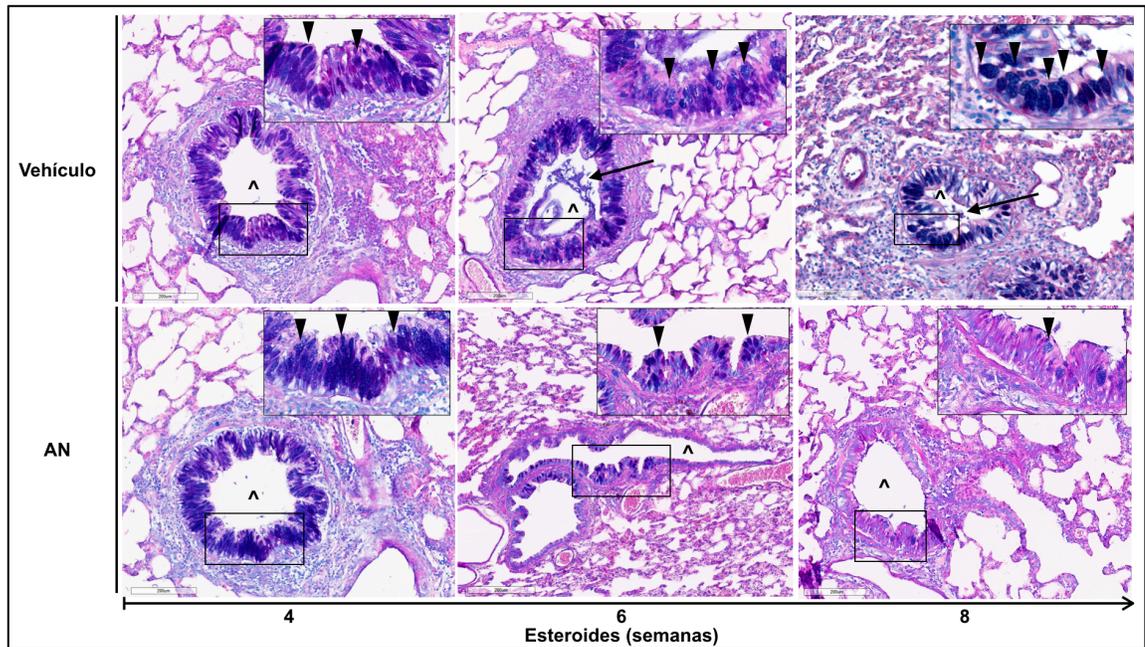


Figura 19: Efecto del ácido niflúmico en la producción de moco durante PcP. Imágenes representativas de cada punto de sacrificio de ratas inmunosuprimidas que recibieron solución vehículo o ácido niflúmico (AN). ^: lumen bronquiolar; flecha: tapones mucosos; cabezas de flecha: gránulos de mucinas. Tinción AB/PAS, barra 200 μ m.

En el epitelio se evidenció también una reducción progresiva de gránulos de mucinas intracelulares (**Figura 19**, cabezas de flecha) y de tapones mucosos en el lumen de la vía aérea (**Figura 19**, flechas). La disminución en la producción de moco fue significativa luego de 14 días de administración continua de ácido niflúmico (6 semanas de inmunosupresión, **Figura 20**). Animales que recibieron vehículo evidenciaron progresiva sobreproducción de moco.

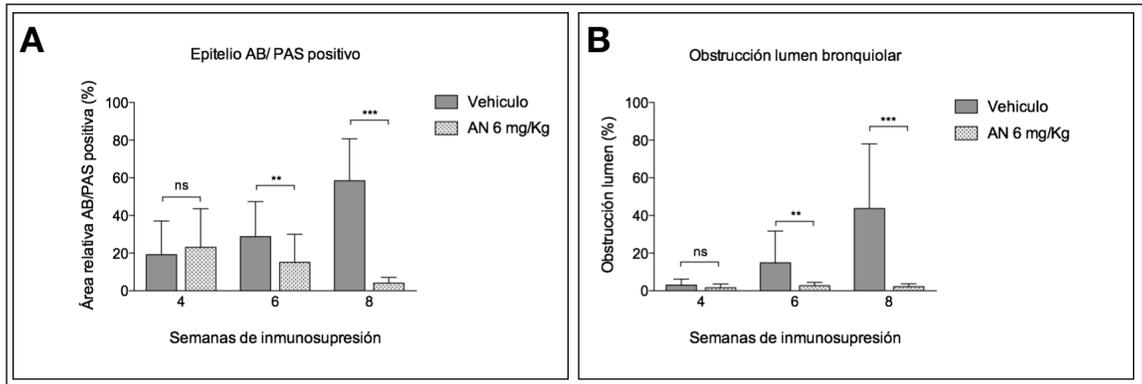


Figura 20: Cuantificación del efecto del ácido niflúmico en la producción de moco en el epitelio respiratorio (**A**) y en el lumen bronquiolar (**B**) durante PcP. AN: ácido niflúmico; n=4 animales; test ANOVA: ns: no significativo; **p<0,01; ***p<0,001.

Además, se evidenció que el ácido niflúmico es capaz de inhibir significativamente el incremento en la expresión de Muc5ac (**Figura 21A,B**) y mClca3 (**Figura 21C,D**) luego de 14 días de tratamiento. Animales inmunosuprimidos que recibieron vehículo mostraron incrementos significativos en la expresión de ambos genes.

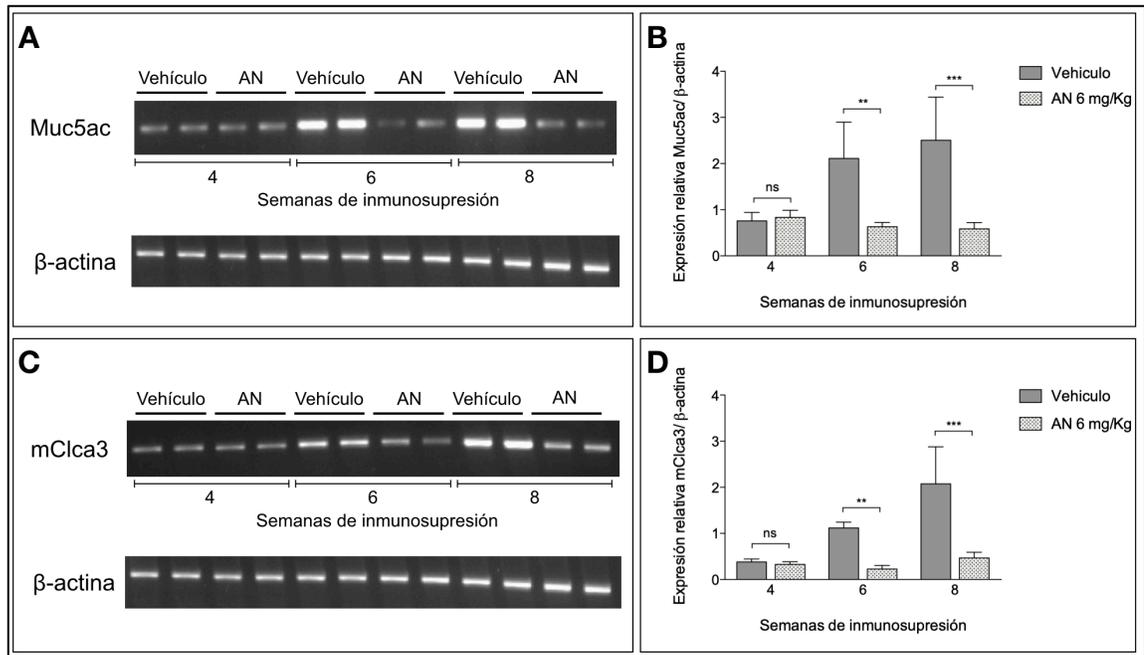


Figura 21: Cuantificación del efecto del ácido niflúmico en la expresión de Muc5ac y mClca3 durante PcP. **A,C:** Imágenes representativas del análisis en gel de agarosa con productos de PCR de animales inmunosuprimidos que recibieron vehículo o ácido niflúmico (AN) en cada punto de sacrificio. **B,D:** Cuantificación relativa de la expresión génica. n=4 animales; test ANOVA: ns: no significativo; **p<0,01; ***p<0,001.

De igual forma, el tratamiento con ácido niflúmico inhibe significativamente el incremento de la producción de MUC5AC (**Figura 22A,C**) y mCLCA3 (**Figura 22B,D**), luego de 14 días de administración. Animales que recibieron vehículo evidenciaron incrementos significativos en la producción de estas proteínas.

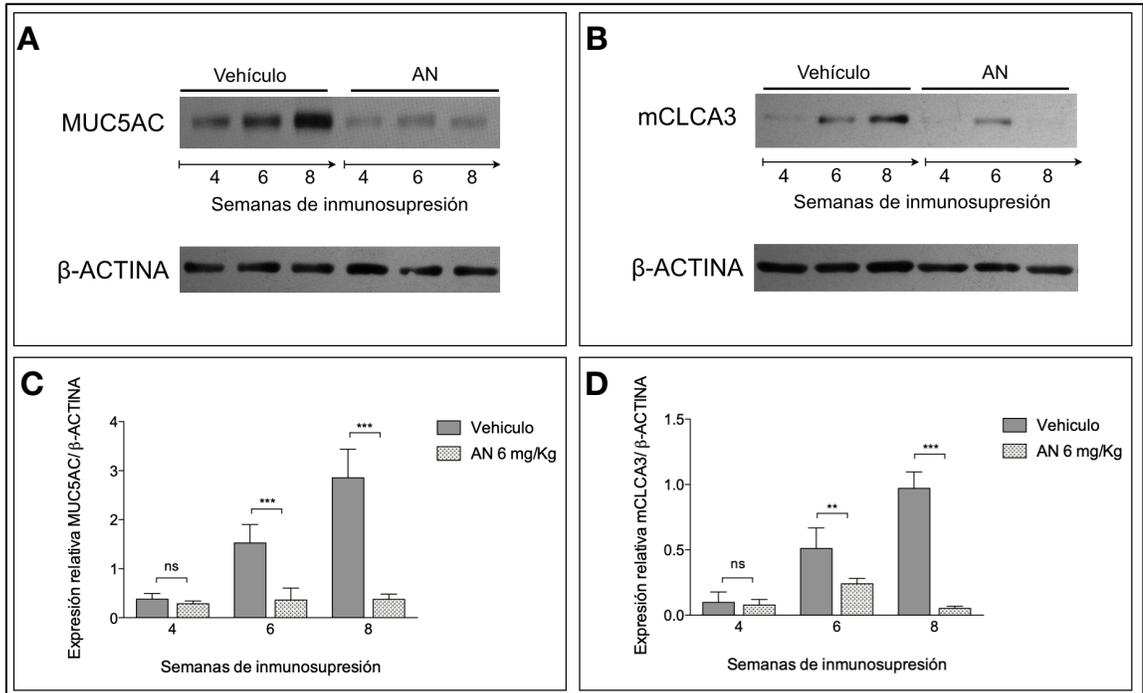


Figura 22: Cuantificación del efecto del ácido niflúmico en la producción de MUC5AC y mCLCA3 durante PcP. **A,B:** Imágenes representativas del análisis por Western Blot de animales inmunosuprimidos que recibieron vehículo o ácido niflúmico (AN) en cada punto de sacrificio. **C,D:** Cuantificación relativa de la expresión de proteínas. n=4 animales; test ANOVA: ns: no significativo; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Se confeccionaron gráficos de sobrevida para los animales inmunosuprimidos (PcP) versus ejemplares inmunosuprimidos + profilaxis (TMS) (Experimento 1, **Figura 1**) y para los animales inmunosuprimidos + vehículo versus ejemplares inmunosuprimidos + ácido niflúmico (AN) (Experimento 2, **Figura 15**). Se evidenció que la profilaxis con TMS incrementa significativamente la sobrevida de los animales inmunosuprimidos en comparación a aquéllos que desarrollan PcP (100% vs 60%, **Figura 23A**). Animales inmunosuprimidos que recibieron vehículo en el segundo experimento, desarrollaron PcP con una sobrevida cercana al 60%, similar a los animales con PcP del primer experimento. Sin embargo, animales inmunosuprimidos que recibieron tratamiento con ácido niflúmico incrementaron significativamente su sobrevida, llegando al 80% (**Figura 23B**). Al observar a baja magnificación cortes longitudinales de pulmón, fue posible evidenciar un mayor volumen pulmonar aparente en los animales con PcP (esteroides o esteroides + vehículo) en comparación con sus respectivos controles (esteroides + TMS o esteroides + AN) (**Figura 23**). Este efecto, si bien no fue cuantificado, es congruente con las mediciones de edema pulmonar en ratas con PcP (**Figura 5D**). Ratas con PcP que recibieron tratamiento con ácido niflúmico evidenciaron pulmones más pequeños que los animales que recibieron vehículo solo.

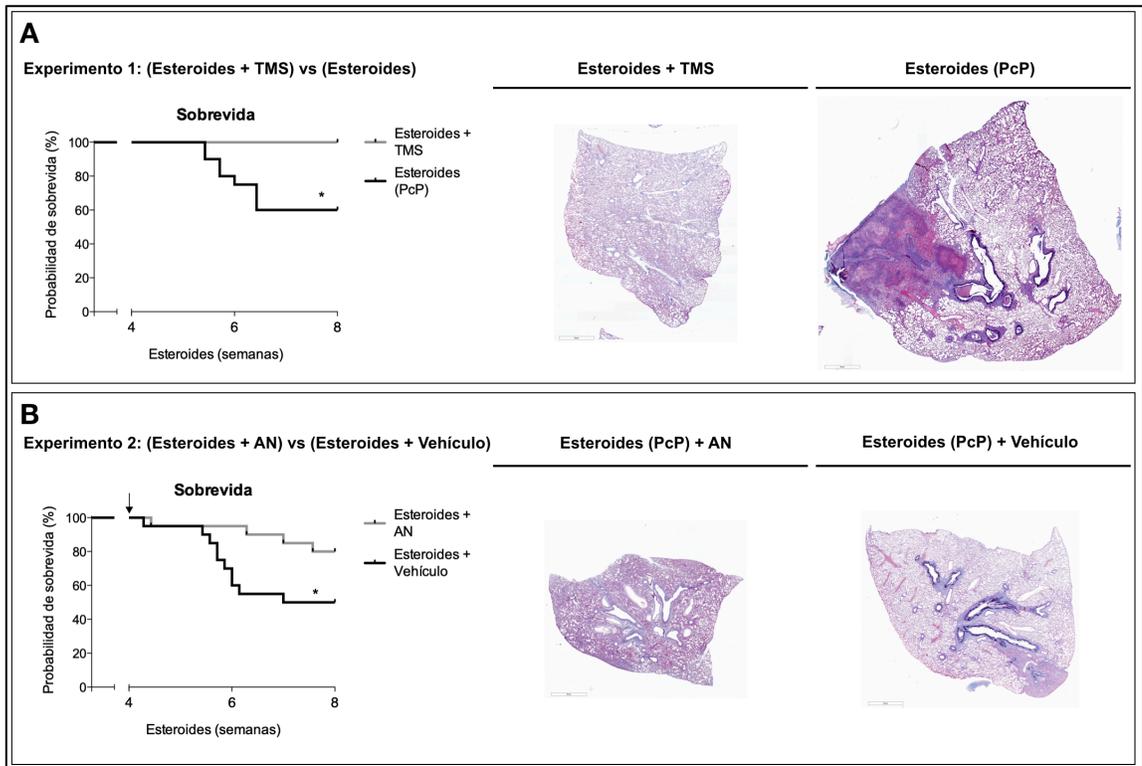


Figura 23: Efecto del ácido niflúmico en la sobrevida de ratas con PcP. Gráficos de sobrevida (Kaplan-Meier) y secciones representativas de pulmón teñidas con AB/PAS a las 8 semanas de inmunosupresión. **A:** Experimento 1: animales inmunosuprimidos (PcP) versus animales inmunosuprimidos + profilaxis (TMS). **B:** Experimento 2: animales inmunosuprimidos + vehículo versus animales inmunosuprimidos + ácido niflúmico (AN). Flecha: Inicio del tratamiento con AN. PcP: neumonía por *Pneumocystis*; TMS: trimetoprim sulfametoxazol; n=20 animales; test Mantel-Cox; *p<0,05.

Finalmente, se realizó un experimento en un pequeño grupo de animales (n=8), con la intención de evaluar si el esquema de administración del ácido niflúmico podría ser intermitente (5 días/ semana). Luego del primer ciclo de tratamiento (**Figura 24**, cabeza de flecha y línea punteada) se observó la pérdida del efecto protector del ácido niflúmico, evidenciado a través del incremento en la mortalidad

de los animales la que igualó la de ejemplares no tratados (**Figura 24**). Este experimento fue finalizado al día 9 de tratamiento y no se evaluó si la producción de moco recrudesció. Sin embargo, sugiere que la administración de ácido niflúmico no debe ser interrumpida para mantener su efecto en la sobrevida de los animales.

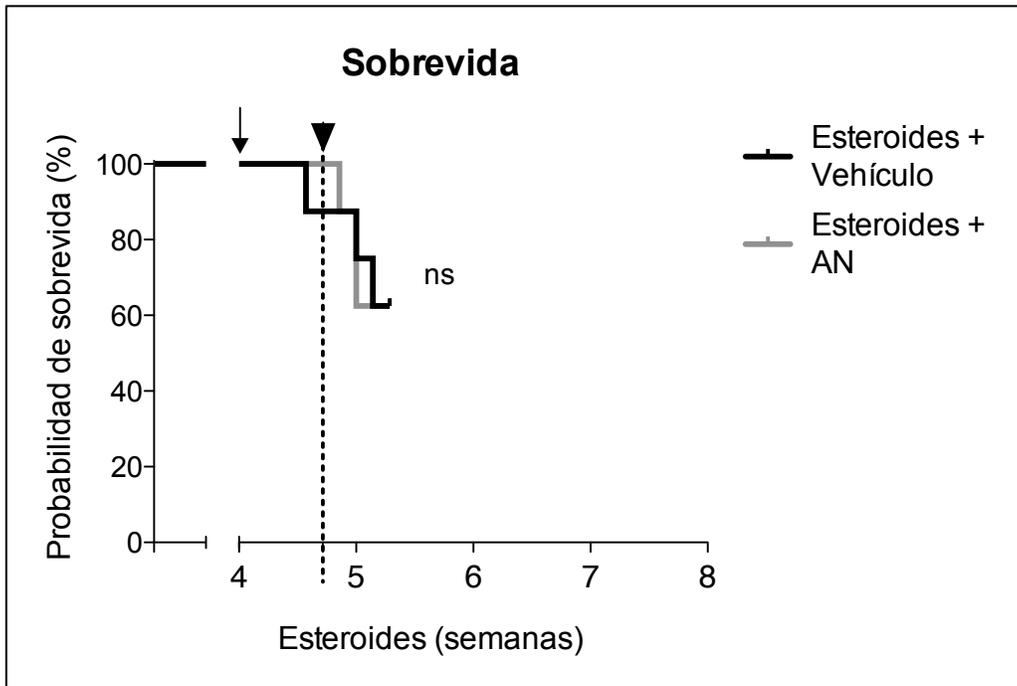


Figura 24: Efecto del ácido niflúmico en la sobrevida de ratas con PcP, al utilizar un esquema alternativo de tratamiento. AN: ácido niflúmico; Flecha: inicio del tratamiento con AN; Cabeza de flecha y línea punteada: Interrupción del tratamiento con AN; n=8 animales; test Mantel-Cox; ns: no significativo.

DISCUSIÓN

Hasta el día de hoy el tratamiento de la infección por *Pneumocystis* se ha focalizado en eliminar el agente causal, fundamentalmente a través de la administración de antibióticos como trimetoprim sulfametoxazol (Calderón et al., 2010). Sin embargo, la limitada eficacia terapéutica, la emergencia de resistencias y la elevada frecuencia de efectos secundarios, hacen necesaria la búsqueda mejores estrategias de tratamiento (Huang et al., 2017). Esta tesis se enfocó en evaluar el potencial de modular el curso y los efectos de la enfermedad a través de la inhibición farmacológica de una de las vías responsables de la producción de moco pulmonar, caracterizando primero los cambios inflamatorios, acumulación de líquido y sobreproducción de moco durante la neumonía, identificando luego un posible blanco para la modulación de la producción patológica del moco y evaluando por último los efectos de su inhibición.

El modelo experimental utilizado se basa en la inducción de neumonía por *Pneumocystis* en animales inmunocompetentes a través de la administración de esteroides y busca reproducir el curso de la infección observada en humanos inmunosuprimidos. La administración crónica de corticoides en animales de experimentación induce una significativa disminución del peso corporal como efecto secundario (Weisbroth et al., 1999). Sin embargo, el efecto en el metabolismo de los tejidos es diferencial, induciendo crecimiento en hígado y corazón, e inhibiéndolo en el pulmón (Fussell and Kelly, 1991). Para evaluar la

efectividad de la inducción de la neumonía y objetivar la disminución de peso atribuible a la infección con relación a la baja debida a la inmunosupresión, observamos la progresión del peso corporal de los animales durante 8 semanas de tratamiento inmunosupresor, utilizando trimetoprim sulfametoxazol (TMS) como tratamiento profiláctico en un grupo control. Evidenciamos que todos los animales sin profilaxis desarrollaron neumonía (grupo PcP), que la sobrevida a la infección es cercana al 60% y que la administración profiláctica de TMS la previene completamente (**Figuras 3 y 4**). También evidenciamos una significativa disminución del peso corporal, similar en todos los ejemplares inmunosuprimidos e independiente del tratamiento profiláctico, sugiriendo que la baja de peso se debe a la administración del corticoide y no a la infección por el patógeno (**Figura 2**). Notablemente, observamos un mayor peso pulmonar húmedo (pulmones frescos) en animales con PcP en relación con los animales inmunosuprimidos que recibieron profilaxis (TMS), efecto atribuible a la infección por *Pneumocystis* y no a la sola inmunosupresión (**Figura 5A**). No obstante, esta medida podría estar influenciada por el tamaño pulmonar, por lo que evaluamos también la relación peso pulmonar húmedo/ peso pulmonar seco, índice descrito como medida de acumulación de líquido pulmonar (Hwang et al., 2001; Pearce et al., 1965). Pudimos así evidenciar un incremento significativo de la relación peso pulmonar húmedo/ peso pulmonar seco en los animales infectados (**figura 5D**). Estos resultados demuestran que *Pneumocystis* induce acumulación de líquido pulmonar en ratas que cursan PcP, incremento que podría explicarse por

cambios en la permeabilidad vascular y, de forma más relevante para este trabajo, por alteraciones en los mecanismos de producción y secreción de moco. La evolución patológica del epitelio respiratorio a un fenotipo hipersecretor de moco contribuye a la morbilidad y mortalidad de enfermedades respiratorias y se ha vinculado estrechamente a procesos inflamatorios. En modelos de PcP inducida por la administración de corticoides, la producción de moco no ha sido evaluada y la inflamación ha sido pobremente caracterizada. Por ello en este trabajo nos enfocamos primero en evaluar la progresión de cambios inflamatorios y luego en la sobreproducción de moco durante la infección. Pudimos evidenciar aparición de progresivos infiltrados inflamatorios y edema intersticial alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos de animales infectados, manifestados en forma de manguitos (cuffs) inflamatorios (**Figuras 7 y 8**). Estos resultados son congruentes, pero de mayor magnitud a los evidenciados recientemente por nuestro grupo en animales inmunocompetentes con infección primaria por *Pneumocystis* (Iturra et al., 2018). De todas formas, resulta paradójico observar una reacción inflamatoria de la magnitud evidenciada pese a la administración de un corticoide como método de inmunosupresión. En este trabajo seleccionamos betametasona por su potente efecto inhibidor en la activación de linfocitos T, efecto necesario para la inducción de la infección, y su escaso efecto mineralocorticoide (Fiel and Vincken, 2006), actividad que podría inducir edema al incrementar el volumen de líquido extracelular. Sin embargo, la betametasona es también un antiinflamatorio potente, con una eficacia relativa de 30:1 respecto

a hidrocortisona, cualidad por la que es utilizada habitualmente en el tratamiento de patologías pulmonares relacionadas a inflamación como asma y EPOC, en las que se administra de forma sistémica en dosis orales de hasta 7 mg/día (0,117 mg/Kg). Más aún, se ha demostrado que la utilización de prednisona como terapia adyuvante durante PcP disminuye en un 50% los episodios de falla respiratoria y mortalidad (Bozzette et al., 1990), cuando es administrada en dosis de 40 mg (equivalente a 6 mg de betametasona) cada 12 horas. En comparación, los animales de este trabajo recibieron una dosis oral, calculada de acuerdo con la ingesta de agua, de 0,09 mg/día (0,6 mg/Kg), siendo esta dosificación equivalente a las dosis de corticoides utilizadas en humanos para las indicaciones terapéuticas descritas (Nair and Jacob, 2016). En consecuencia, los resultados evidencian que la inflamación y el remodelamiento patológico del epitelio respiratorio inducidos por *Pneumocystis* durante PcP son de magnitud tal que exceden el efecto antiinflamatorio del corticoide y plantean la necesidad de evaluar la magnitud de los efectos utilizando otros métodos de inmunosupresión más selectivos y específicos, como tacrolimus o ciclofosfamida.

Además de la inflamación, estudiamos el efecto de la infección por *Pneumocystis* en la producción de moco pulmonar. Para ello evaluamos la expresión de MUC5AC, principal mucina secretada que es sobreexpresada en inflamación (Wang et al., 2017) y cuya sobreproducción se asocia a la formación de tapones mucosos y a la obstrucción del flujo de aire en la vía aérea (Evans et al., 2015). También evaluamos la expresión de mCLCA3, miembro de una familia de

canales de cloruro activados por calcio, reconocido por su rol en la regulación de la sobreproducción de moco en el epitelio respiratorio (Nakano et al., 2006) y cuya sobreexpresión se ha asociado al incremento en la producción de moco y sobreexpresión de MUC5AC (Nagashima et al., 2016; Ni et al., 2016; Thai et al., 2005). Nuestros resultados muestran progresiva sobreproducción de moco, evidenciada a través del incremento del área de epitelio positiva para AB/PAS (**Figuras 9 y 10A**), de la obstrucción de la vía aérea por tapones mucosos (**Figuras 9 y 10B**) y del incremento en la expresión de MUC5AC y mCLCA3 a nivel de ARNm (**Figura 11**) y proteínas (**Figura 12**), sugiriendo que *Pneumocystis* induce sobreproducción de moco durante la neumonía a través de la vía MUC5AC/mCLCA3. Además, fortalecen la evidencia aportada por nuestro grupo del incremento en la expresión de estos genes asociado a *Pneumocystis* en lactantes presumiblemente inmunocompetentes, fallecidos súbitamente en la comunidad (Pérez et al., 2014; Vargas et al., 2013). En este trabajo utilizamos RT-PCR para evaluar la expresión génica de Muc5ac y mClca3, Western Blot para evaluar la expresión proteica de MUC5AC y mCLCA3 y tinción AB/PAS para evaluar moco a nivel histológico. Si bien estas técnicas son ampliamente utilizadas en la literatura, en la actualidad existen métodos más sensibles y específicos que podrían complementar estas mediciones, tales como PCR en tiempo real (qPCR) para la expresión génica, espectrometría de masa para la expresión proteica e inmunohistoquímica para la evaluación histológica. Utilizar estas técnicas en trabajos futuros permitirá una caracterización más precisa y

detallada de la sobreproducción de moco durante PcP.

La demostración que *Pneumocystis* induce sobreproducción de moco durante la neumonía, y que este efecto sería mediado vía MUC5AC/mCLCA3, nos permitió identificar una posible vía de modulación farmacológica para disminuir su producción. Pese a que no existen antagonistas específicos de CLCA, se han descrito potentes inhibidores de los canales de cloruro tales como DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianostilbeno 2,2-disulfónico), DPC (ácido carboxílico 2-difenilamina) y ácido niflúmico (AN) (Famaey, 1997; Nakano et al., 2006). Seleccionamos el ácido niflúmico porque DIDS y DPC presentan baja selectividad para los diferentes subtipos de canales de cloruro, mientras que AN es considerado un inhibidor más específico de CLCA (Parai and Tabrizchi, 2002). Los resultados muestran que el ácido niflúmico es un fármaco fácilmente administrable por vía intraperitoneal, que fue bien tolerado por los animales y que no evidenció signos de toxicidad a las dosis utilizadas (**Figuras 13 y 14**). Este trabajo demostró que la administración de AN en ratas con PcP detiene y revierte los cambios inflamatorios y de sobreproducción de moco inducidos por *Pneumocystis* durante la progresión de la infección. Su efecto sobre la inflamación peribronquial y perivascular es evidente luego de 14 días de tratamiento y es significativo a los 28 días (**Figuras 17 y 18**). Su acción sobre la sobreproducción de moco y la obstrucción de la vía aérea se evidencia más precozmente, siendo significativo a los 14 días de tratamiento (**Figuras 19 y 20**). Además, evidenciamos que el ácido niflúmico inhibe la sobreexpresión de MUC5AC y mCLCA3 a nivel de ARNm

(Figura 21) y proteínas (Figura 22), fortaleciendo la idea que la sobreproducción de moco durante PcP es mediada por la vía MUC5AC/mCLCA3. Más aún, pudimos evidenciar que el tratamiento con ácido niflúmico mejora significativamente la sobrevida de los animales durante la progresión de la neumonía (Figura 23), siempre y cuando sea administrado de forma continua, sin interrupciones (Figura 24). Determinar si este efecto es producto del recrudescimiento de la secreción de moco, así como el evaluar otros esquemas posibles de tratamiento, permitirán caracterizar de mejor manera el efecto protector de este fármaco sobre los animales durante PcP.

Los resultados obtenidos nos permiten hipotetizar que mCLCA3 sería uno de los mediadores del fenotipo hipersecretor de moco inducido por *Pneumocystis*, y que el tratamiento con ácido niflúmico lo inhibiría de forma directa. Sin embargo, se ha descrito que la expresión de mCLCA3 no es esencial para la sobreproducción de moco (Robichaud et al., 2005) y que tanto hCLCA1 como mCLCA3 son proteínas secretadas que no conforman un canal iónico propiamente tal (Gibson et al., 2005). Por ello, la evidencia obtenida no es suficiente para determinar si los efectos observados son atribuibles directamente a la inhibición de mCLCA3 por el ácido niflúmico, o bien se deben a la acción del fármaco sobre otros blancos moleculares relacionados a hipersecreción de moco e inflamación. En este contexto, el efecto del ácido niflúmico podría atribuirse a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, a través de su actividad inhibidora sobre las ciclooxigenasas (Civelli et al., 1991; Famaey, 1997; Ledoux, 2004). Sin embargo, la indometacina,

otro inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, no es efectiva en disminuir la respuesta de la vía aérea en modelos murinos de estimulación (Nakano et al., 2006), haciendo poco probable que sea éste el mecanismo responsable de la acción inhibidora del ácido niflúmico sobre la hipersecreción de moco.

La producción de moco en el epitelio respiratorio es controlada por numerosas vías, dando cuenta de la importancia de su regulación en condiciones normales y patológicas. Una de estas vías es la mediada por citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13). IL-13 induce hiperreactividad de la vía aérea, metaplasia de células caliciformes e incrementa significativa y consistentemente la expresión de MUC5AC en humanos y modelos murinos, en un proceso que involucra la vía de señalización IL-13R α_1 -JAK-STAT6 (Kuperman et al., 2002). STAT6 es un factor de transcripción involucrado en numerosos procesos celulares, incluyendo la respuesta temprana a patógenos, y cuya forma activa (fosforilada) es capaz de traslocar al núcleo induciendo directamente la expresión de Muc5ac (Wang et al., 2017) y Clca (Winpenny et al., 2009). Además, STAT6 es capaz de activar el factor de transcripción SPDEF, el que actúa sobre varias cascadas transcripcionales relacionadas a secreción de moco, induciendo la expresión de Muc5ac y Clca1 e inhibiendo la de FoxA2, que a su vez es un potente represor de la producción de moco (Chen et al., 2009; Seibold, 2018). IL-13 induce la expresión de SPDEF, generando hiperplasia de células caliciformes (Park et al., 2007) e incrementando la producción de hCLCA1 y MUC5AC (Chen et al., 2009; Yu et al., 2011). Notablemente, *Pneumocystis* es capaz de inducir una potente

respuesta del tipo Th2 y una respuesta inmune innata dependiente de STAT6 en ratones (Eddens et al., 2016; Swain et al., 2011, 2012) y ratas inmunocompetentes (Iturra et al., 2018). En este trabajo se utilizaron animales inmunosuprimidos para inducir la neumonía, por lo que la respuesta mediada por linfocitos T fue abolida. Sin embargo, células del epitelio y macrófagos pulmonares activados son capaces de producir IL-13 y sobreexpresar el receptor de esta interleuquina, pudiendo establecerse un circuito de retroalimentación positiva que promovería la expresión persistente de IL-13, causando metaplasia de células mucosas, sobreproducción crónica de moco e hiperreactividad de la vía aérea (Joyce and Van Kaer, 2008; Kim et al., 2008). De forma relevante, la administración de glucocorticoides no altera la expresión de los receptores de interleuquinas Th2 y no es suficiente para suprimir la sobreproducción de moco, la hiperreactividad de la vía aérea ni la hiperplasia de células mucosas inducida por IL-13 (Kibe et al., 2003). Por ello, es posible hipotetizar que durante la neumonía por *Pneumocystis* la sobreproducción de moco podría involucrar la vía IL-13R α_1 -JAK-STAT6-SPDEF. En este modelo hipotético, la liberación de IL-13 induciría la activación de JAK y STAT6. STAT6 induciría la expresión de Muc5ac y mClca3, además de activar SPDEF. A su vez, SPDEF activado induciría la expresión de Muc5ac y mClca3 e inhibiría a FOXA2, promoviendo aún más la expresión de Muc5ac. SPDEF también induciría la producción de mCLCA3, que al ser secretado podría activar a CLCA, llevando también a la sobreexpresión de Muc5ac. Así, mCLCA3 constituiría una vía alternativa que permitiría potenciar la

expresión de MUC5AC, amplificando la respuesta secretora de moco (**Figura 25**). En este escenario, la acción inhibidora del ácido niflúmico podría llevarse a cabo en uno o varios niveles de la vía de transducción de señales: a través de la inhibición directa de alguno de los actores de la vía (STAT6, SPDEF y/o mCLCA3), así como también inhibiendo CLCA. Evaluar las formas activas de los distintos actores de esta vía de transducción de señales (ej. STAT6/ STAT6 fosforilado), así como la producción de citoquinas Th2, permitiría dilucidar de mejor manera los eventos moleculares responsables de la respuesta a la infección por *Pneumocystis* y el mecanismo de acción del ácido niflúmico.

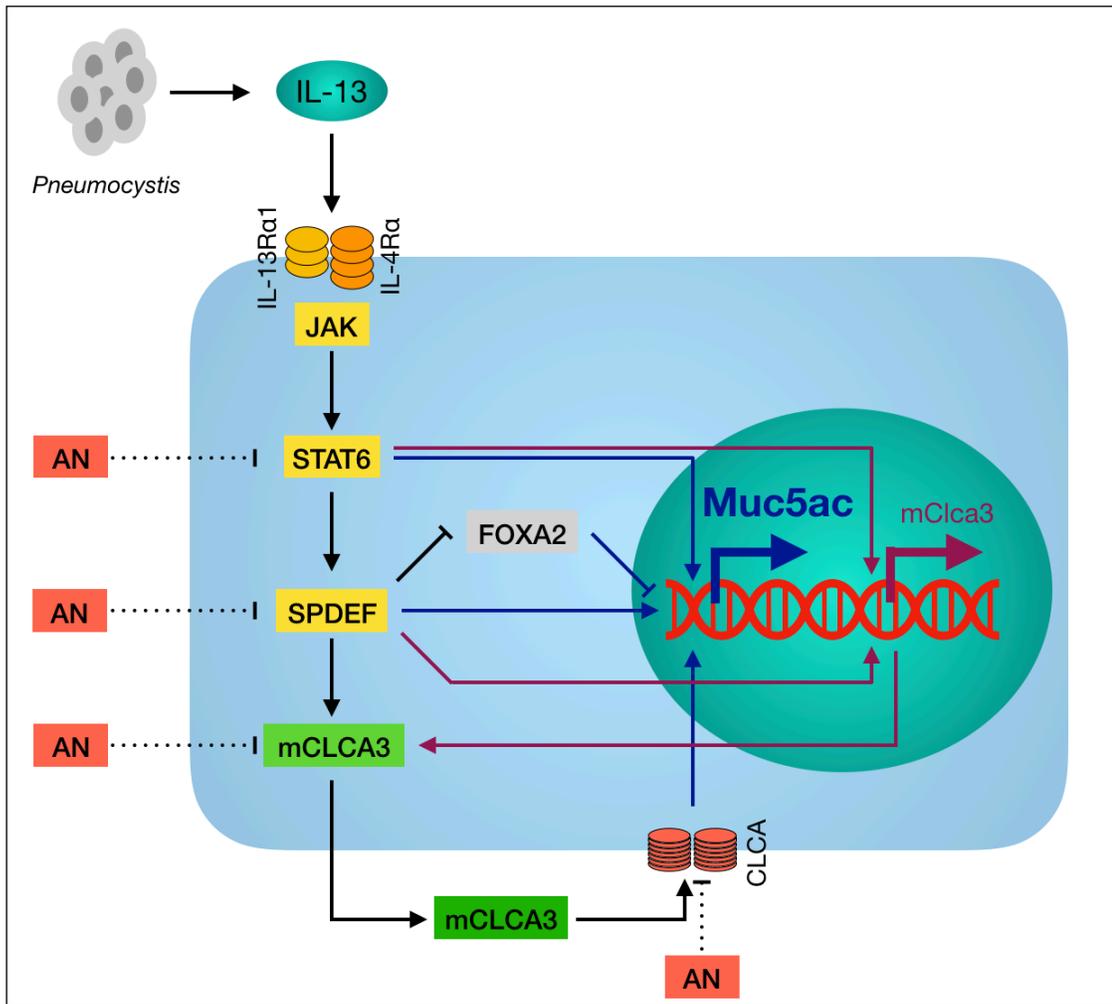


Figura 25: Modelo hipotético de sobreproducción de moco inducida por *Pneumocystis* durante PcP y posibles niveles de acción del ácido niflúmico. La infección podría inducir liberación de IL-13 llevando a sobreexpresión de Muc5ac (flechas azules) y de mClca3 (flechas burdeo). La vía que involucra mClca3 permitiría amplificar la respuesta secretora de moco. El ácido niflúmico (AN) podría inhibir la producción de moco en varios niveles de esta vía de transducción de señales (líneas punteadas).

En conclusión, esta tesis demuestra que el ácido niflúmico detiene y disminuye la sobreproducción patológica de moco estimulada por *Pneumocystis* en un modelo animal de PcP inducida por esteroides, mejorando además la supervivencia de los animales a la infección cuando es administrado en un esquema continuo de tratamiento. La disminución en la producción de moco sería mediada, al menos en parte, por la disminución de la expresión de mCLCA3 y MUC5AC. La modulación del moco durante PcP podría constituir una nueva estrategia para mejorar el curso y la supervivencia a la enfermedad. Los resultados obtenidos permiten comprender de mejor manera la patogénesis de la infección por *Pneumocystis*, los efectos de la respuesta inmune tipo Th2 en su progresión y el rol de mCLCA3 como vía de amplificación de la secreción de moco pulmonar.

REFERENCIAS

- Bals, R., and Hiemstra, P. S. (2004). Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Respir. J.* 23, 327–333. doi:10.1183/09031936.03.00098803.
- Banerjee, A. K., Angulo, A. F., Polak-Vogelzang, A. A., and Kershof, A. M. (1987). An alternative method for the decontamination of rats carrying *Mycoplasma pulmonis* without the use of germfree isolators. *Lab. Anim.* 21, 138–142. doi:10.1177/002367728702100210.
- Beck, J. M., Preston, A. M., Wilcoxon, S. E., Morris, S. B., White, E. S., and Paine, R. (2003). Pneumocystis pneumonia increases the susceptibility of mice to sublethal hyperoxia. *Infect. Immun.* 71, 5970–5978. doi:10.1128/IAI.71.10.5970-5978.2003.
- Bozzette, S. A., Wu, A. W., Bartok, A., Niosi, J., Coffman, J., Cassens, B., et al. (1990). A controlled trial of early adjunctive treatment with corticosteroids for pneumocystis carinii pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 323, 1451–1457. doi:10.1056/NEJM199011223232104.
- Burgel, P. R., Montani, D., Danel, C., Dusser, D. J., and Nadel, J. A. (2007). A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax* 62, 153–161. doi:10.1136/thx.2006.062190.
- Calderón, E. J., Gutiérrez-Rivero, S., Durand-Joly, I., and Dei-Cas, E. (2010).

Pneumocystis infection in humans: Diagnosis and treatment. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* doi:10.1586/eri.10.42.

Caridad, L. G. A., Diuris, B., Amelia, P., Marisel, R., Bárbara O, G., María E, A., et al. (2011). Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp: SPRD. *Rev. Electron. Vet.* 12.

Chen, G., Korfhagen, T. R., Xu, Y., Kitzmiller, J., Wert, S. E., Maeda, Y., et al. (2009). SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *J. Clin. Invest.* 119, 2914–2924. doi:10.1172/JCI39731.

Civelli, M., Vigano, T., Acerbi, D., Caruso, P., Giossi, M., Bongrani, S., et al. (1991). Modulation of arachidonic acid metabolism by orally administered morniflumate in man. *Agents Actions* 33, 233–239. doi:10.1007/BF01986568.

Durand-Joly, I., Moukhtar Aliouat, E., Recourt, C., Guyot, K., François, N., Wauquier, M., et al. (2002). Pneumocystis carinii f. sp. hominis Is not infectious for SCID mice. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1862–1865. doi:10.1128/JCM.40.5.1862-1865.2002.

Eddens, T., Campfield, B. T., Serody, K., Manni, M. L., Horne, W., Elsegeiny, W., et al. (2016). A novel CD41 T cell-dependent murine model of pneumocystis-driven asthma-like pathology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 194, 807–820. doi:10.1164/rccm.201511-2205OC.

- Evans, C. M., Raclawska, D. S., Ttofali, F., Liptzin, D. R., Fletcher, A. A., Harper, D. N., et al. (2015). The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity. *Nat. Commun.* 6. doi:10.1038/ncomms7281.
- Fahy, J. V., and Dickey, B. F. (2010). Medical progress: Airway mucus function and dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 363, 2233–2247. doi:10.1056/NEJMra0910061.
- Famaey, J. P. (1997). In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: An overview. *Inflamm. Res.* 46, 437–446. doi:10.1007/s000110050221.
- Fiel, S., and Vincken, W. (2006). Systemic corticosteroid therapy for acute asthma exacerbations. *J. Asthma* 43, 321–331. doi:10.1080/02770900600567163.
- Fujimoto, K., Morita, S., Iwashita, H., Kimura, H., Gono, H., Nakanishi, A., et al. (2002). Gene expression of calcium-dependent chloride channel (CLCA) family in the sputum cells from COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 165.
- Fussell, J. C., and Kelly, F. J. (1991). Effects of dexamethasone on lung protein turnover. *Biochem. J.* 273, 93–97. doi:10.1042/bj2730093.
- Gibson, A., Lewis, A. P., Affleck, K., Aitken, A. J., Meldrum, E., and Thompson, N. (2005). HCLCA1 and mCLCA3 are secreted non-integral membrane proteins and therefore are not ion channels. *J. Biol. Chem.* 280, 27205–27212. doi:10.1074/jbc.M504654200.
- Gigliotti, F., and Wright, T. W. (2005). Immunopathogenesis of Pneumocystis

carinii pneumonia. *Expert Rev. Mol. Med.* 7.

doi:10.1017/S1462399405010203.

Haahr, M. (1998). Random Sequence Generator. *RANDOM.ORG, True Random Number Serv.* Available at: www.random.org.

Hauber, H. P., Bergeron, C., Tscopoulos, A., Wallaert, B., Olivenstein, R., Holroyd, K. J., et al. (2005a). Increased expression of the calcium-activated chloride channel hCLCA1 in airways of patients with obstructive chronic bronchitis. *Can. Respir. J.* 12, 143–146.

Hauber, H. P., Daigneault, P., Frenkiel, S., Lavigne, F., Hung, H. L., Levitt, R. C., et al. (2005b). Niflumic acid and MSI-2216 reduce TNF- α -induced mucin expression in human airway mucosa. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115, 266–271. doi:10.1016/j.jaci.2004.09.039.

Hegab, A. E., Sakamoto, T., Nomura, A., Ishii, Y., Morishima, Y., Iizuka, T., et al. (2007). Niflumic acid and AG-1478 reduce cigarette smoke-induced mucin synthesis: The role of hCLCA1. *Chest* 131, 1149–1156. doi:10.1378/chest.06-2031.

Hernandez-Novoa, B., Bishop, L., Logun, C., Munson, P. J., Elnekave, E., Rangel, Z. G., et al. (2008). Immune responses to *Pneumocystis murina* are robust in healthy mice but largely absent in CD40 ligand-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.* 84, 420–430. doi:10.1189/jlb.1207816.

Hoshino, M., Morita, S., Iwashita, H., Sagiya, Y., Nagi, T., Nakanishi, A., et al. (2002). Increased expression of the human Ca²⁺-activated Cl-channel 1

- (CaCC1) gene in the asthmatic airway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1132–1136. doi:10.1164/ajrccm.165.8.2107068.
- Huang, Y. S., Yang, J. J., Lee, N. Y., Chen, G. J., Ko, W. C., Sun, H. Y., et al. (2017). Treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: a review. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* doi:10.1080/14787210.2017.1364991.
- Hughes, W. T., McNabb, P. C., Makres, T. D., and Feldman, S. (1974). Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5, 289–293. doi:10.1128/AAC.5.3.289.
- Hwang, Y. S., Lefferts, P. L., and Snapper, J. R. (2001). Correlation between increased airway responsiveness and severity of pulmonary edema. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14, 47–53. doi:10.1006/pupt.2000.0266.
- Institute for Laboratory Animal Research (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8th Ed.* doi:10.2307/1525495.
- Iturra, P. A., Rojas, D. A., Pérez, F. J., Méndez, A., Ponce, C. A., Bonilla, P., et al. (2018). Progression of Type 2 Helper T Cell–Type Inflammation and Airway Remodeling in a Rodent Model of Naturally Acquired Subclinical Primary *Pneumocystis* Infection. *Am. J. Pathol.* 188, 417–431. doi:10.1016/j.ajpath.2017.10.019.
- Joyce, S., and Van Kaer, L. (2008). Lung NKT cell commotion takes your breath away. *Nat. Med.* 14, 609–610. doi:10.1038/nm0608-609.

- Kibe, A., Inoue, H., Fukuyama, S., Machida, K., Matsumoto, K., Koto, H., et al. (2003). Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167, 50–56. doi:10.1164/rccm.2110084.
- Kim, E. Y., Battaile, J. T., Patel, A. C., You, Y., Agapov, E., Grayson, M. H., et al. (2008). Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat. Med.* 14, 633–640. doi:10.1038/nm1770.
- Kim, Y. M., Won, T. Bin, Kim, S. W., Min, Y. G., Lee, C. H., and Rhee, C. S. (2007). Histamine induces MUC5AC expression via a hCLCA1 pathway. *Pharmacology* 80, 219–226. doi:10.1159/000104419.
- Kuperman, D. A., Huang, X., Koth, L. L., Chang, G. H., Dolganov, G. M., Zhu, Z., et al. (2002). Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat. Med.* 8, 885–889. doi:10.1038/nm734.
- Ledoux, J. (2004). Dynamics of Ca²⁺-Dependent Cl⁻ Channel Modulation by Niflumic Acid in Rabbit Coronary Arterial Myocytes. *Mol. Pharmacol.* 67, 163–173. doi:10.1124/mol.104.004168.
- Mansharamani, N. G., Balachandran, D., Vernovsky, I., Garland, R., and Koziel, H. (2000). Peripheral blood CD4 + T-lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without

- HIV infection. *Chest* 118, 712–720. doi:10.1378/chest.118.3.712.
- Medrano, F. J., Montes-Cano, M., Conde, M., De La Horra, C., Respalda, N., Gasch, A., et al. (2005). Pneumocystis jirovecii in general population. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 245–250. doi:10.3201/eid1102.040487.
- Morris, A., Lundgren, J. D., Masur, H., Walzer, P. D., Hanson, D. L., Frederick, T., et al. (2004). Current epidemiology of Pneumocystis pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1713–1720. doi:10.3201/eid1010.030985.
- Morris, A., Wei, K., Afshar, K., and Huang, L. (2008). Epidemiology and Clinical Significance of Pneumocystis Colonization . *J. Infect. Dis.* 197, 10–17. doi:10.1086/523814.
- Nagashima, A., Shinkai, M., Shinoda, M., Shimokawaji, T., Kimura, Y., Mishina, K., et al. (2016). Clarithromycin suppresses chloride channel accessory 1 and inhibits interleukin-13-induced goblet cell hyperplasia in human bronchial epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6585–6590. doi:10.1128/AAC.01327-16.
- Nair, A., and Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* 7, 27. doi:10.4103/0976-0105.177703.
- Nakanishi, A., Morita, S., Iwashita, H., Sagiya, Y., Ashida, Y., Shirafuji, H., et al. (2001). Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5175–5180. doi:10.1073/pnas.081510898.

- Nakano, T., Inoue, H., Fukuyama, S., Matsumoto, K., Matsumura, M., Tsuda, M., et al. (2006). Niflumic acid suppresses interleukin-13-induced asthma phenotypes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 1216–1221. doi:10.1164/rccm.200410-1420OC.
- Ni, Z. H., Tang, J. H., Chen, G., Lai, Y. M., Chen, Q. G., Li, Z., et al. (2016). Resveratrol inhibits mucus overproduction and MUC5AC expression in a murine model of asthma. *Mol. Med. Rep.* 13, 287–294. doi:10.3892/mmr.2015.4520.
- O'Donnell, W. J., Pieciak, W., Chertow, G. M., Sanabria, J., and Lahive, K. C. (1998). Clearance of *Pneumocystis carinii* cysts in acute *P. carinii* pneumonia: Assessment by serial sputum induction. *Chest* 114, 1264–1268. doi:10.1378/chest.114.5.1264.
- Parai, K., and Tabrizchi, R. (2002). A comparative study of the effects of Cl⁻ channel blockers on mesenteric vascular conductance in anaesthetized rat. *Eur. J. Pharmacol.* 448, 59–66. doi:10.1016/S0014-2999(02)01895-2.
- Park, K. S., Korfhagen, T. R., Bruno, M. D., Kitzmiller, J. A., Wan, H., Wert, S. E., et al. (2007). SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. *J. Clin. Invest.* 117, 978–988. doi:10.1172/JCI29176.
- Pearce, M. L., Yamashita, J., and Beazell, J. (1965). Measurement of Pulmonary Edema. *Circ. Res.* 16, 482–488. doi:10.1161/01.RES.16.5.482.
- Pérez B., F., Méndez G., A., Lagos R., A., and Vargas M., S. L. (2014). Dinámica y patología del barrido mucociliar como mecanismo defensivo del

pulmón y alternativas farmacológicas de tratamiento. *Rev. Med. Chil.* 142, 606–615. doi:10.4067/S0034-98872014000500009.

Pérez, F. J., Ponce, C. A., Rojas, D. A., Iturra, P. A., Bustamante, R. I., Gallo, M., et al. (2014). Fungal colonization with *Pneumocystis* correlates to increasing chloride channel accessory 1 (hCLCA1) suggesting a pathway for up-regulation of airway mucus responses, in infant lungs. *Results Immunol.* 4, 58–61. doi:10.1016/j.rinim.2014.07.001.

Ponce, C. A., Gallo, M., Bustamante, R., and Vargas, S. L. (2010).

Pneumocystis Colonization Is Highly Prevalent in the Autopsied Lungs of the General Population. *Clin. Infect. Dis.* 50, 347–353. doi:10.1086/649868.

Poole, J. A., Wyatt, T. A., Oldenburg, P. J., Elliott, M. K., West, W. W., Sisson, J. H., et al. (2009). Intranasal organic dust exposure-induced airway adaptation response marked by persistent lung inflammation and pathology in mice. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 296, L1085–L1095. doi:10.1152/ajplung.90622.2008.

Pop, S. M., Kolls, J. K., and Steele, C. (2006). *Pneumocystis*: Immune recognition and evasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 17–22. doi:10.1016/j.biocel.2005.08.010.

Robichaud, A., Tuck, S. A., Kargman, S., Tam, J., Wong, E., Abramovitz, M., et al. (2005). Gob-5 is not essential for mucus overproduction in preclinical murine models of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 303–314. doi:10.1165/rcmb.2004-0372OC.

- Seibold, M. A. (2018). Interleukin-13 stimulation reveals the cellular and functional plasticity of the airway epithelium. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 15, S98–S106. doi:10.1513/AnnalsATS.201711-868MG.
- Steele, C., Shellito, J. E., and Kolls, J. K. (2005). Immunity against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis*. *Med. Mycol.* 43, 1–19. doi:10.1080/13693780400015360.
- Stringer, J. R., Beard, C. B., and Miller, R. F. (2009). Spelling *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 506. doi:10.3201/eid1503.081060.
- Swain, S. D., Meissner, N., Han, S., and Harmsen, A. (2011). *Pneumocystis* infection in an immunocompetent host can promote collateral sensitization to respiratory antigens. *Infect. Immun.* 79, 1905–1914. doi:10.1128/IAI.01273-10.
- Swain, S. D., Meissner, N. N., Siemsen, D. W., McInerney, K., and Harmsen, A. G. (2012). *Pneumocystis* elicits a STAT6-dependent, strain-specific innate immune response and airway hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 290–298. doi:10.1165/rcmb.2011-0154OC.
- Tadaki, H., Arakawa, H., Mizuno, T., Suzuki, T., Takeyama, K., Mochizuki, H., et al. (2009). Double-Stranded RNA and TGF- α Promote MUC5AC Induction in Respiratory Cells. *J. Immunol.* 182, 293–300. doi:10.4049/jimmunol.182.1.293.
- Thai, P., Chen, Y., Dolganov, G., and Wu, R. (2005). Differential regulation of MUC5AC/Muc5ac and hCLCA-1/mGob 5 expression in airway epithelium.

- Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 523–530. doi:10.1165/rcmb.2004-0220RC.
- Thomas, C. F., and Limper, A. H. (2004). Pneumocystis pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 350, 2487–2498. doi:10.1016/S0929-6646(08)60199-0.
- Thornton, D. J., Rousseau, K., and McGuckin, M. A. (2008). Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 459–486. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702.
- Vareille, M., Kieninger, E., Edwards, M. R., and Regamey, N. (2011). The airway epithelium: Soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 210–229. doi:10.1128/CMR.00014-10.
- Vargas, S. L., Hughes, W. T., Santolaya, M. E., Ulloa, A. V., Ponce, C. A., Cabrera, C. E., et al. (2002). Search for Primary Infection by *Pneumocystis carinii* in a Cohort of Normal, Healthy Infants. *Clin. Infect. Dis.* 32, 855–861. doi:10.1086/319340.
- Vargas, S. L., Ponce, C. A., Gallo, M., Pérez, F., Astorga, J. F., Bustamante, R., et al. (2013). Near-universal prevalence of pneumocystis and associated increase in mucus in the lungs of infants with sudden unexpected death. *Clin. Infect. Dis.* 56, 171–179. doi:10.1093/cid/cis870.
- Vargas, S. L., Ponce, C. A., Hughes, W. T., Wakefield, A. E., Weitz, J. C., Donoso, S., et al. (1999). Association of Primary *Pneumocystis carinii* Infection and Sudden Infant Death Syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1489–1493. doi:10.1086/313796.
- Vargas S.L (2013). “Pneumocystosis,” in *Parasitología Humana*, ed. Werner Apt

- B. (México: McGraw Hill Interamericana Editores S.A.), 360–366.
- Voynow, J. A., Young, L. R., Wang, Y., Horger, T., Rose, M. C., and Fischer, B. M. (2017). Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells . *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 276, L835–L843. doi:10.1152/ajplung.1999.276.5.L835.
- Wang, X., Li, Y., Luo, D., Wang, X., Zhang, Y., Liu, Z., et al. (2017). Lyn regulates mucus secretion and MUC5AC via the STAT6 signaling pathway during allergic airway inflammation. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/srep42675.
- Weisbroth, S. H., Geistfeld, J., Weisbroth, S. P., Williams, B., Feldman, S. H., Linke, M. J., et al. (1999). Latent *Pneumocystis carinii* infection in commercial rat colonies: Comparison of inductive immunosuppressants plus histopathology, PCR, and serology as detection methods. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1441–1446.
- Winpenny, J., Marsey, L., and Sexton, D. (2009). The CLCA Gene Family: Putative Therapeutic Target for Respiratory Diseases. *Inflamm. Allergy - Drug Targets* 8, 146–160. doi:10.2174/187152809788462590.
- Yanagihara, K., Seki, M., and Cheng, P. W. (2001). Lipopolysaccharide induces mucus cell metaplasia in mouse lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 66–73. doi:10.1165/ajrcmb.24.1.4122.
- Yasuo, M., Fujimoto, K., Tanabe, T., Yaegashi, H., Tsushima, K., Takasuna, K., et al. (2006). Relationship between calcium-activated chloride channel 1 and MUC5AC in goblet cell hyperplasia induced by interleukin-13 in human

bronchial epithelial cells. *Respiration* 73, 347–359. doi:10.1159/000091391.

Yu, H., Li, Q., Kolosov, V. P., Perelman, J. M., and Zhou, X. (2011). Interleukin-13 induces mucin 5AC production involving STAT6/SPDEF in human airway epithelial cells. *Cell Commun. Adhes.* 17, 83–92. doi:10.3109/15419061.2010.551682.