

**Universidad de Chile
Facultad de Medicina
Escuela de Postgrado**



**LA INFECCIÓN PRIMARIA POR *PNEUMOCYSTIS CARINII* SE ASOCIA A
ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA NEUROENDOCRINO PULMONAR EN RATAS
INMUNOCOMPETENTES**

María Andrea Méndez Gálvez

Tesis para optar al grado de Magíster en Farmacología

Director de Tesis: Dr. Sergio Vargas Munita

2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la(el) candidata(o)

MARÍA ANDREA MÉNDEZ GÁLVEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Farmacología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 26 de agosto de 2015

Prof. Dr. Sergio Vargas

Director de Tesis

**(Depto. de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas,
Facultad de Medicina, Universidad de Chile)**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Gladys Tapia

Prof. Dra. Cecilia Toro

Prof. Dr. Luis Quiñones

**Prof. Dra. Virginia Fernández
Presidente Comisión**

Dedicada al P. R.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se desarrolló gracias al financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto Fondecyt Regular 1100225
- Proyecto Fondecyt Regular 1140412

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	4
ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	10
1. <i>PNEUMOCYSTIS</i>	10
1.1 <i>Antecedentes generales.....</i>	10
1.2 <i>Aspectos epidemiológicos y patogénicos de Pneumocystis</i>	11
1.3 <i>Rol de Pneumocystis en la patología pulmonar</i>	13
2. SISTEMA NEUROENDOCRINO PULMONAR	14
2.1 <i>Antecedentes generales.....</i>	14
2.2 <i>Inervación de las células neuroendorinas pulmonares.....</i>	15
2.3 <i>Funciones del sistema neuroendocrino pulmonar</i>	16
2.4 <i>Rol del sistema neuroendocrino pulmonar en la enfermedad pulmonar</i>	17
3. PÉPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE CALCITONINA (CGRP)	19
3.1 <i>Generalidades de CGRP</i>	19
3.2 <i>Funciones de CGRP.....</i>	19
3.3 <i>Rol de CGRP en la enfermedad pulmonar</i>	21
4. PÉPTIDO LIBERADOR DE GASTRINA (GRP).....	23
4.1 <i>Generalidades de GRP.....</i>	23
4.2 <i>Rol de GRP y su receptor en la patología pulmonar.....</i>	24
II. HIPÓTESIS.....	27
III. OBJETIVOS.....	27
1. OBJETIVO GENERAL	27
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
IV. METODOLOGÍA.....	28
1. MODELO ANIMAL.....	28
2. DIAGNÓSTICO DE <i>PNEUMOCYSTIS</i>	28
3. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO ESPECÍFICO 1	29
3.1 <i>Inmunohistoquímica</i>	29
3.2 <i>Análisis morfológico.....</i>	29
4. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO ESPECÍFICO 2	30
4.1 <i>ELISA.....</i>	30
5. METODOLOGÍA ASOCIADA AL OBJETIVO ESPECÍFICO 3.....	31
5.1 <i>Extracción de RNA total.....</i>	31
5.2 <i>Reacción de Transcripción Reversa (RT).....</i>	31
5.3 <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional</i>	32
5.4 <i>Reacción de PCR en tiempo real (qPCR).....</i>	32
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
V. RESULTADOS.....	34
1. RESULTADOS ASOCIADOS AL OBJETIVO ESPECÍFICO 1	34
2. RESULTADOS ASOCIADOS AL OBJETIVO ESPECÍFICO 2	41
3. RESULTADOS ASOCIADOS AL OBJETIVO ESPECÍFICO 3	42

VI. DISCUSIÓN	45
VII. REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

1. FIGURA 1: <i>IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LOS CAMBIOS DE LA VÍA AÉREA DURANTE LA INFECCIÓN PRIMARIA POR P. CARINII</i>	12
2. FIGURA 2: <i>IMAGEN REPRESENTATIVA DE UN NEB EN LA VÍA AÉREA</i>	14
3. FIGURA 3: <i>DIAGRAMAS REPRESENTATIVOS DE UNA PNEC Y UN NEB EN LA VÍA AÉREA</i>	15
4. FIGURA 4: <i>EVENTUALES CAMBIOS EN EL SISTEMA NEUROENDOCRINO PULMONAR ASOCIADOS A LA INFECCIÓN PRIMARIA POR PNEUMOCYSTIS CARINII</i>	26
5. FIGURA 5: <i>ESQUEMA RESUMEN DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO</i>	33
6. FIGURA 6: <i>IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE PNECs Y NEBS EN EL EPITELIO DE LA VÍA AÉREA DE PULMÓN DE RATA</i>	35
7. FIGURA 7: <i>DENSIDAD DE CÉLULAS NEUROENDOCRINAS PULMONARES EN LA VÍA AÉREA TOTAL DE PULMÓN DE RATA</i>	36
8. FIGURA 8: <i>DENSIDAD DE CÉLULAS NEUROENDOCRINAS PULMONARES EN LA VÍA AÉREA PEQUEÑA DE PULMÓN DE RATA</i>	37
9. FIGURA 9: <i>DENSIDAD DE CÉLULAS NEUROENDOCRINAS PULMONARES EN LA VÍA AÉREA MAYOR DE PULMÓN DE RATA</i>	38
10. FIGURA 10: <i>IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA ALTURA DE LOS NEBS EN EL EPITELIO DE LA VÍA AÉREA DE PULMÓN DE RATA</i>	39
11. FIGURA 11: <i>TAMAÑO DE NEBS EN LA VÍA AÉREA TOTAL DE PULMÓN DE RATA</i>	40
12. FIGURA 12: <i>CONCENTRACIÓN DE GRP EN TEJIDO PULMONAR DE RATA</i>	41
13. FIGURA 13: <i>NIVELES DE EXPRESIÓN DE MRNA DE CGRP</i>	42
14. FIGURA 14: <i>FIGURAS REPRESENTATIVAS DE LA EXPRESIÓN DE MRNA DE GRP</i>	43
15. TABLA 1: <i>FRECUENCIA DE RATAS QUE EXPRESAN MRNA DE GRP SEGÚN GRUPO DE TRATAMIENTO Y DÍA DE INFECCIÓN</i>	43
16. FIGURA 15: <i>NIVELES DE EXPRESIÓN DE MRNA DE GRPR</i>	44
17. RESUMEN GRÁFICO: <i>CAMBIOS OBSERVADOS EN EL SISTEMA NEUROENDOCRINO PULMONAR ASOCIADOS A LA INFECCIÓN PRIMARIA POR PNEUMOCYSTIS CARINII</i>	51

ABREVIATURAS

PNEC: célula neuroendocrina pulmonar (pulmonary neuroendocrine cell)

NEB: cuerpo neuroepitelial (neuroepithelial body)

CGRP: péptido relacionado con el gen de calcitonina (calcitonin gene related peptide)

GRP: péptido liberador de gastrina (gastrin releasing peptide)

BLP: péptido similar a bombesin (bombesin-like peptide)

GRPR: receptor de péptido liberador de gastrina (gastrin releasing peptide receptor)

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

SIDS: síndrome infantil de muerte súbita (Sudden infant death syndrome)

PGP9.5: Protein Gene Product 9.5

vCE: variante de células Clara

5-HT: 5-hidroxitriptamina

VRS: virus respiratorio sincicial

SNC: sistema nervioso central

RESUMEN

Pneumocystis es un hongo que produce infección en individuos inmunocompetentes durante los primeros meses de vida. Esta infección ha sido asociada a cambios patológicos en la vía aérea, que podrían vincularse a la severidad o patogenia de algunas enfermedades crónicas, como EPOC o Asma Bronquial. Sin embargo, los mecanismos que explican estos cambios patológicos durante la infección no se conocen con claridad. En este sentido, el sistema neuroendocrino pulmonar podría contribuir a estos cambios.

El sistema neuroendocrino pulmonar es un conjunto de células epiteliales innervadas de la vía aérea que se comporta como quimiorreceptor, reservorio de células progenitoras y mediador de hiperreactividad, inflamación, reparación y remodelación tisular. Diversas enfermedades respiratorias han sido asociadas a cambios morfológicos de células neuroendocrinas pulmonares, que se han vinculado a la respuesta frente a la hipoxia, y a aumento en los niveles de sus aminas y péptidos, tales como CGRP y GRP. Estos péptidos han sido señalados como factores que contribuyen a la inflamación, broncoconstricción y remodelación en la vía aérea, por lo que podrían constituir parte de la respuesta patológica en la vía aérea durante algunas enfermedades pulmonares, eventualmente, durante la infección primaria por *Pneumocystis*. Por lo tanto, nos propusimos demostrar que la infección primaria por *Pneumocystis carinii* se asocia a estimulación del sistema neuroendocrino pulmonar, que se expresa en hiperplasia e hipertrofia de PNEC/NEBs, aumento en la innervación de NEBs, incremento en la expresión génica de los péptidos CGRP, GRP y del receptor GRPR, e incremento en los niveles de CGRP y GRP.

Para demostrar la hipótesis, se trabajó con pulmones procedentes de un modelo de infección primaria por *P. carinii*, en ratas inmunocompetentes. En estos tejidos se buscó determinar cambios morfológicos en PNEC/NEBs, en sus fibras nerviosas, y niveles de CGRP mediante inmunohistoquímica. Adicionalmente, se buscó cuantificar la concentración de GRP mediante ELISA, y determinar la expresión de los genes de CGRP, GRP y GRPR mediante RT-PCR convencional y qRT-PCR.

Se observó un incremento significativo en la densidad de grupos de células inmunorreactivas a CGRP, indicadores de NEBs, en el día 75 de infección con respecto al control, tanto en la vía aérea pequeña (menor a 250 μm) como en la vía aérea total, independiente de su tamaño. No se observaron cambios en la densidad de NEBs en la vía aérea mayor ni en la densidad de PNECs en ninguno de los días de infección estudiados. El tamaño de NEBs se incrementó significativamente en el día 60 de infección con respecto al control. No se visualizaron fibras nerviosas con la técnica utilizada. No se detectaron cambios significativos en la concentración de GRP en ninguno de los días de infección estudiados. Los niveles de mRNA de CGRP y de GRPR en el día 75 de infección fueron significativamente mayores que en el grupo control. Adicionalmente se observó que un mayor porcentaje de ratas infectadas expresaron mRNA de GRP comparado con ratas control.

Los resultados de esta tesis muestran que la infección primaria por *Pneumocystis* en un modelo de ratas inmunocompetentes se asocia a estímulo del sistema neuroendocrino pulmonar, manifestado como hiperplasia e hipertrofia de células inmunorreactivas a CGRP, indicadores NEBs e incremento de la expresión génica de los neuropéptidos CGRP, GRP, y del receptor GRPR. Esto sugiere que las células neuroendocrinas pulmonares, particularmente CGRP, podrían formar parte de la patogenia de la infección primaria por *Pneumocystis carinii* en ratas inmunocompetentes, constituyendo parte de la respuesta frente la hipoxia y/o contribuyendo a la inflamación, broncoconstricción y remodelación de la vía aérea. En estas funciones también podría participar el receptor GRPR, justificando mayores estudios para determinar la participación de las células neuroendocrinas, sus neuropéptidos de secreción y/o sus receptores en la infección. Así, CGRP y el receptor GRPR podrían constituir eventuales blancos de acción terapéutica en la infección respiratoria.

ABSTRACT

Pneumocystis is a fungus that causes an infection in immunocompetent individuals during their first months of life. This infection has been related to pathological changes in the airway, and they could be associated with severity or pathogeny of chronic diseases, such as COPD or asthma. However, mechanisms that underlie these pathological changes in the infection have not been described. Thus, Pulmonary Neuroendocrine System may be part of the infection pathogeny.

The pulmonary neuroendocrine system is a group of innervated epithelial cells in the airway which have functions as chemoreceptors, stem cells reservoirs and hyperreactivity, inflammation, and tissue remodelling mediators. Several pulmonary diseases have been associated with morphological changes in neuroendocrine cells, that have been related to hypoxic response and an increase of amine and peptide levels, such as CGRP and GRP. These peptides have been described as inflammation, bronchoconstriction and remodelling factors, because of what they could contribute to the pathologic response in the airway for some respiratory diseases, eventually through the *Pneumocystis* primary infection. Therefore, we aimed to demonstrate that the *Pneumocystis carinii* primary infection is related to pulmonary neuroendocrine system stimulation, expressed as PNEC/NEBs hyperplasia and hypertrophy, an increase in innervation of NEBs, increase in CGRP, GRP and GRPR gene expression and an increase in CGRP and GRP peptide levels.

To demonstrate this hypothesis, we used lungs of a *P. carinii* primary infection model in immunocompetent rats. Morphological changes in PNEC/NEBs, nerves, and CGRP levels were determined by immunohistochemistry, GRP concentration was measured by ELISA and CGRP, GRP and GRPR gene expression were determined using RT-PCR and qRT-PCR.

We observed a significant increase in density of clusters of CGRP immunoreactive cells which indicate NEBs, on day 75 of the infection with respect to the control group, in small airway (less than 250 μm) and in total airway. No changes were observed in the NEBs density in the major airway nor in the PNECs density, independently of the day of infection. The NEBs size significantly increased on day 60 of the infection compared to the control group. Nerves were not seen with the

techniques used in this thesis. The GRP concentration did not change throughout the infection. mRNA levels of CGRP and GRPR on day 75 of the infection were significantly higher than in the control group. In addition, we observed that a higher percentage of infected rats expressed GRP mRNA compared to control rats.

These findings show that *Pneumocystis* primary infection in an immunocompetent rats model is associated with pulmonary neuroendocrine system stimulation, expressed as hyperplasia and hypertrophy of CGRP immunoreactive cells which indicates NEBs, and an increase in CGRP, GRP and GRPR gene expression. This suggests that pulmonary neuroendocrine cells, especially CGRP could constitute part of the pathogeny in the *Pneumocystis carinii* primary infection in immunocompetent individuals, as a factor in the hypoxic response or contributing to airway inflammation, bronchoconstriction and remodelling. Additionally, GRPR may also participate in these functions. Nevertheless, more studies are needed to describe the participation of neuroendocrine cells, their neuropeptides and their receptors along the infection. Thus, CGRP and GRPR could become therapeutic targets in respiratory infections.

I. INTRODUCCIÓN

1. *Pneumocystis*

1.1 Antecedentes generales

Pneumocystis es un género perteneciente al reino fungi, que parasita e infecta a mamíferos. Existen varias especies de *Pneumocystis* que infectan de forma específica a cada especie de mamífero: *Pneumocystis jirovecii* es encontrado en humano, *P. carinii* y *P. wakefieldiae* en rata, *P. murina* en ratón y *P. oryctolagi* en conejo [Cushion *et al.*, 2010].

Pneumocystis spp. (en adelante *Pneumocystis*) es un organismo unicelular, extracelular, con tropismo pulmonar. Estudios muestran que este patógeno sería un parásito obligado que dependería estrictamente de su hospedero, debido a su especificidad de hospedero, su patrón de co-evolución y la dependencia de aminoácidos y colesterol del hospedero [Hauser *et al.*, 2010, Furlong *et al.*, 1997]. Así, *Pneumocystis* no tendría formas capaces de vivir independientemente de otro organismo, y no requiere un vector o período de maduración fuera del pulmón [Cushion *et al.*, 2010].

El estudio del ciclo de vida y de la patogenia de *Pneumocystis* se ha visto limitado por las dificultades para cultivar eficientemente a *Pneumocystis* en el largo plazo [Hauser *et al.*, 2010]. Algunos sistemas de cultivo, que utilizan una capa de células alimentadoras, han logrado un incremento de hasta 10 veces en el número de organismos, permitiendo un máximo de 3 pasajes [Atzori *et al.*, 1998]. Un estudio reciente determinó el crecimiento de *Pneumocystis* en un sistema de cultivo de interfase aire-líquido, utilizando una línea de células epiteliales humanas pseudoestratificadas de la vía aérea. Los investigadores observaron crecimiento de *Pneumocystis in vitro*, sin embargo, la reproducibilidad de este sistema de cultivo debe ser determinada [Schildgen *et al.*, 2014]. No obstante lo anterior, estudios en modelo animal han permitido obtener información sobre distintos aspectos de este patógeno, incluyendo la caracterización de la patogenia de la infección.

1.2 Aspectos epidemiológicos y patogénicos de *Pneumocystis*

Pneumocystis produce neumonía en individuos que padecen alguna condición de inmunosupresión, como personas desnutridas, pacientes con inmunodeficiencia primaria, portadores de Virus de Inmunodeficiencia humana (VIH), receptores de trasplante de órganos y pacientes oncológicos tratados con fármacos inmunosupresores [Cushion *et al.*, 2010]. Sin embargo, estudios han reportado que un alto porcentaje de la población experimenta una infección por *Pneumocystis* en los primeros meses de vida, tal como indica el hecho de que al menos un 85% de individuos desarrolla seroconversión antes de los 20 meses de edad [Vargas *et al.*, 2001]. Por otro lado, la colonización por *Pneumocystis* es altamente prevalente en la población de individuos inmunocompetentes, alcanzando un 65% de prevalencia en adultos [Ponce *et al.*, 2010].

Pneumocystis se transmite por vía aérea, aunque algunas investigaciones muestran que podría ocurrir transmisión transplacentaria [Montes-Cano *et al.*, 2009, Sanchez *et al.*, 2007]. Estudios en ratones muestran que existe transmisión de *Pneumocystis* desde animales inmunosuprimidos hacia animales inmunocompetentes, y entre animales portadores inmunocompetentes [Gigliotti *et al.*, 2003, Dumoulin *et al.*, 2000], además, se ha demostrado que estos organismos patógenos son viables y capaces de dividirse en el pulmón del hospedero inmunocompetente [Chabé *et al.*, 2004]. Lo anterior sugiere que este mecanismo podría constituir una forma de circulación de este patógeno en el ambiente [Gigliotti *et al.*, 2003].

Si bien se ha considerado que la infección primaria por *Pneumocystis* se presentaría de forma asintomática al menos en una fracción de individuos inmunocompetentes [Vargas *et al.*, 2001], se ha observado en ratones que *Pneumocystis* provoca una infección pulmonar con inducción de la respuesta inmune caracterizada por aumento en: número de macrófagos, neutrófilos, células presentadoras de antígenos (APCs), linfocitos TCD4+ y TCD8+, niveles de citoquinas, número de linfocitos B, niveles de anticuerpo específico anti-*Pneumocystis* y niveles de albúmina sérica en fluido de Lavado Broncoalveolar (LBA) [Hernandez-Novoa *et al.*, 2008, An *et al.*, 2003, Gigliotti *et al.*, 2003, Swain *et*

al., 2011]. Histológicamente, en estudios realizados en modelo animal inoculado con organismos de *Pneumocystis*, se ha observado hipertrofia de células epiteliales, aumento en el contenido de mucus en células caliciformes y leve inflamación perivascular. Estos cambios se asocian a leve reducción de la función pulmonar a las 5 semanas de infección [Swain *et al.*, 2012]. Esta infección se resolvería en 5 a 6 semanas y *Pneumocystis* sería eliminado del pulmón del hospedero [An *et al.*, 2003]. Datos preliminares no publicados obtenidos en el laboratorio, en modelo de rata inmunocompetente y de contagio con *Pneumocystis* por cohabitación, indican que durante la infección se observa incremento significativo en: grosor epitelial, infiltrados peribronquiolares y perivasculares, depósitos de reticulina y colágeno, contenido de mucus en el epitelio y niveles de expresión de la proteína MUC5AC, que forma parte del mucus secretado por células caliciformes (Figura 1).

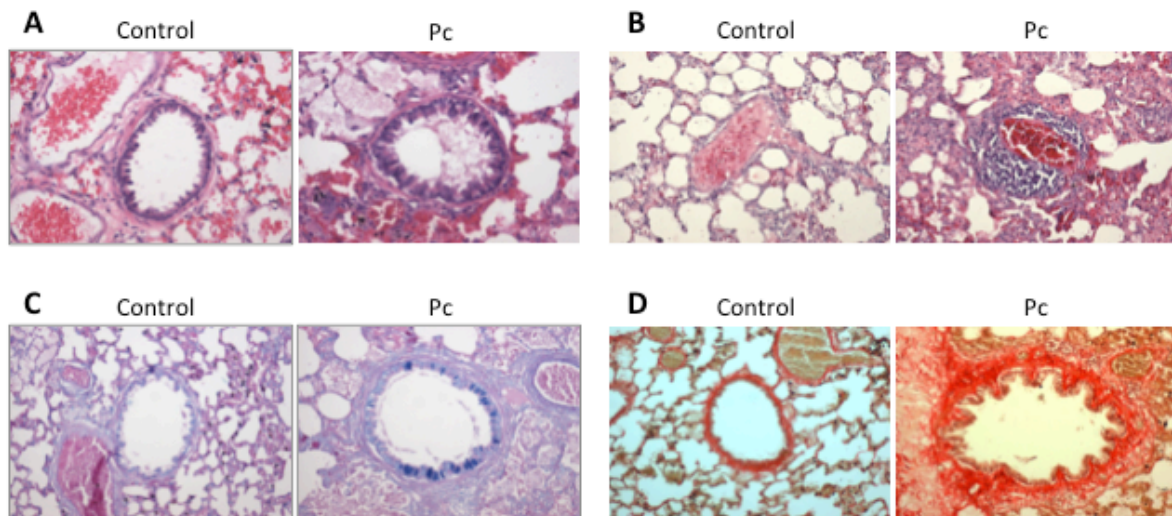


Figura N°1. Imágenes representativas de los cambios en la vía aérea durante la infección primaria por *P. carinii*. Se muestran imágenes de bronquiolos procedentes de pulmones de ratas control y con infección primaria por *Pneumocystis*. **A y B.** Imágenes obtenidas por tinción de hematoxilina-eosina (H-E) que muestran incremento en el grosor epitelial e infiltrados perivasculares, respectivamente. **C.** Imagen obtenida por tinción de Alcian Blue-Pas que muestra incremento de mucinas epiteliales. **D.** Imagen obtenida por tinción de Picrosirius red que muestra depósitos de colágeno peribronquiolar. Resultados preliminares no publicados.

1.3 Rol de *Pneumocystis* en la patología pulmonar

Algunos estudios han relacionado la infección o colonización por *Pneumocystis* con la presencia y/o severidad de algunas enfermedades pulmonares crónicas,

La infección por *Pneumocystis* en el hospedero inmunocompetente podría promover la sensibilización a otros antígenos respiratorios, como ovoalbúmina [Swain *et al.*, 2011]. Incluso, *Pneumocystis* puede provocar una respuesta en el pulmón de individuos susceptibles sin sensibilización, caracterizada por inflamación tipo Th2 e hiperreactividad bronquial, factores de la infección respiratoria que han sido asociados al desarrollo de asma infantil [Swain *et al.*, 2012].

En pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se ha observado una relación directamente proporcional entre la frecuencia de colonización y el grado de severidad de la patología [Morris *et al.*, 2004]. Un estudio realizado en un modelo de infección por VIH en primates indica que la colonización por *Pneumocystis* podría contribuir al desarrollo de EPOC [Shiple *et al.*, 2010]

La infección primaria por *Pneumocystis* también ha sido asociada al Síndrome Infantil de muerte súbita (Sudden infant death syndrome (SIDS)). Se ha observado una alta incidencia, que alcanza el 98%, de infección por *Pneumocystis* en lactantes fallecidos inesperadamente en la comunidad, alrededor del tercer mes de vida, que coincide con la edad de mayor frecuencia de SIDS y bronquiolitis [Vargas *et al.*, 2013].

No obstante la evidencia, los mecanismos que explican los cambios patológicos durante la infección por *Pneumocystis* y su eventual asociación con el daño pulmonar crónico en individuos inmunocompetentes, no se conocen con claridad. Existe un grupo de células del epitelio de la vía aérea, las células neuroendocrinas pulmonares, pertenecientes al sistema neuroendocrino pulmonar, que podrían contribuir a los cambios patológicos observados durante la infección, y que resultan de enorme relevancia dado que estas células han sido asociadas a la patogenia de algunas enfermedades respiratorias.

2. Sistema neuroendocrino pulmonar

2.1 Antecedentes generales

El sistema neuroendocrino pulmonar es un conjunto de células epiteliales de la vía aérea, que pueden presentarse en solitario (Pulmonary Neuroendocrine Cell (PNEC)) o como grupos celulares invados, conocidos como cuerpos neuroepiteliales (Neuroepithelial Body (NEBs)) (Figura 2) [Weichselbaum *et al.*, 2005]. Se distribuyen a lo largo de la vía aérea, desde la laringe a los alvéolos, pero PNECs y NEBs muestran una distribución diferencial según el tamaño de la vía aérea: la presencia de NEBs predomina en la vía aérea intermedia y periférica, asociándose con los puntos de bifurcación de la vía aérea, mientras que, la presencia de PNECs en el pulmón humano adulto es independiente del diámetro de la vía aérea (Figura 3). Estas células son relativamente abundantes en el pulmón fetal, alcanzan su mayor densidad alrededor del nacimiento y disminuyen en el adulto, sin embargo, están presentes a lo largo de la vida [Van Lommel *et al.*, 1999].

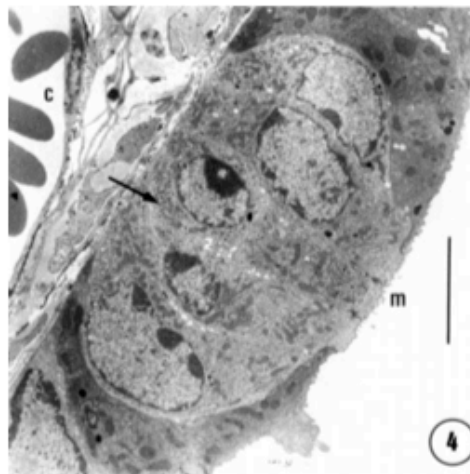


Figura N°2. Imagen representativa de un NEB en la vía aérea NEB de hamster, mostrando cinco núcleos celulares. El NEB está en contacto con el lumen de la vía aérea y la membrana celular apical posee microvellosidades (m). (c) capilar. Extraído de Van Lommel, 2001.

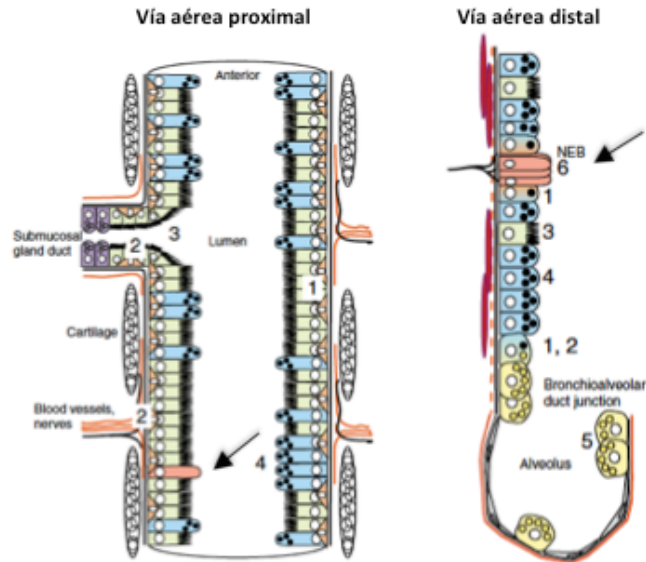


Figura N°3. Diagramas representativos de una PNEC y un NEB en la vía aérea. Esquema de la vía aérea proximal y distal, mostrando la distribución de células en el epitelio y su proporción en cada segmento. En el esquema de vía aérea proximal se representa una PNEC (flecha), mientras que en el esquema de vía aérea distal se representa un NEB (flecha). Extraído de Hogan, 2006.

2.2 Inervación de las células neuroendocrinas pulmonares

Las estructuras inervadas del sistema neuroendocrino pulmonar son los NEBs. Estudios morfológicos han mostrado que más de la mitad (52-60%) de los NEBs se asocian a fibras nerviosas, las cuales se distribuyen desde el plano intersticial hasta el plano epitelial [Larson *et al.*, 2003, Van Genechten *et al.*, 2004]. Estudios han mostrado que estas fibras nerviosas expresan el marcador neuroendocrino CGRP, y los marcadores neurales generales PGP9.5 (Protein Gene Product 9.5) y sustancia P, que han permitido su visualización mediante técnicas de inmunohistoquímica [Weichselbaum *et al.*, 2005, Van Genechten *et al.*, 2004].

La inervación de los NEBs es principalmente aferente [Adriaensen *et al.*, 1998]. Existen varias fuentes distintas de inervación: inervación vagal aferente, nervios inmunorreactivos a CGRP, que además expresan sustancia P, e inervación nitrérgica, cuyos nervios son inmunorreactivos a nNOS (Óxido Nítrico Sintasa neural) [Brouns *et al.*, 2009, Adriaensen *et al.*, 1998]. Adicionalmente, nervios colinérgicos también participarían en la inervación de los NEBs [Brouns *et al.*, 2009]. Distintas

poblaciones pueden contactar un NEB, pero ninguna de estas poblaciones contacta a todos los NEBs [Brouns *et al.*, 2009].

El hecho de que los NEBs constituyan estructuras invadidas, refuerza la idea, que será profundizada más adelante, de que estas agrupaciones celulares actúan como receptores de la vía aérea [Brouns *et al.*, 2009].

2.3 Funciones del sistema neuroendocrino pulmonar

El sistema neuroendocrino pulmonar posee diversas funciones. Este sistema promueve el desarrollo pulmonar, mediante la acción de GRP (Péptido Liberador de Gastrina (Gastrin Releasing Peptide)), que actúa como mitógeno [Emanuel *et al.*, 1999]. Por otro lado, actúa como quimiorreceptor de la vía aérea, a través de la función de NADPH oxidasa. Los NEBs poseen corrientes de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} voltaje-dependiente. Durante la normoxia, NADPH oxidasa mantiene la producción de superóxido y H_2O_2 , lo cual permite que el canal K^+ conserve su conformación. Durante la hipoxia, en cambio, NADPH oxidasa falla en mantener la producción de superóxido y H_2O_2 . La modulación del estado redox del canal K^+ puede alterar su conformación, cerrando el canal y disminuyendo la salida de K^+ . La resultante despolarización de membrana activa canales Ca^{2+} voltaje-dependiente, provocando la entrada de Ca^{2+} extracelular que resulta en la secreción de aminas y péptidos [Colebrooke *et al.*, 2002, Fu *et al.*, 2002, Fu *et al.*, 2000].

Por otro lado, investigaciones señalan que el sistema neuroendocrino pulmonar actúa como mediador de la hiperreactividad, inflamación, reparación y remodelación de la vía aérea, funciones en las que participan los productos de secreción GRP y CGRP (Péptido Relacionado con el Gen de Calcitonina (Calcitonin Gene Related Peptide)), entre otros [Zhou *et al.*, 2011, Sunday *et al.*, 1998, Aoki-Nagase *et al.*, 2002, Springer *et al.*, 2004, Kawanami *et al.*, 2009].

Por último, el sistema neuroendocrino pulmonar constituiría un reservorio de células progenitoras, dado que los NEBs conforman un microambiente que alberga células variante de células Clara (vCE), que poseen características de célula troncal [Hong *et al.*, 2001].

Como se ha mencionado, a estas funciones contribuyen los productos de secreción de las células neuroendocrinas, pudiendo ser esta secreción autocrina, paracrina o endocrina. Los principales productos secretados por estas células son: GRP [Emanuel *et al.*, 1999], CGRP [Brouns *et al.*, 2009] y 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina) [Fu *et al.*, 2002]. Estos poseen diversas funciones, como broncoconstricción [Lach *et al.*, 1993], vasodilatación [Champion *et al.*, 2000], quimiotaxis de células del sistema inmune, proliferación de fibroblastos [Sunday *et al.*, 2004], entre otras, y constituyen marcadores neuroendocrinos [Brouns *et al.*, 2009].

2.4 Rol del sistema neuroendocrino pulmonar en la enfermedad pulmonar

Distintas enfermedades respiratorias crónicas han sido asociadas a hipertrofia e hiperplasia PNECs/NEBs y, alternativamente, a un incremento en los niveles de sus productos de secreción, como displasia broncopulmonar [Johnson *et al.*, 1993], granuloma eosinofílico [Aguayo *et al.*, 1990] y neumonía intersticial idiopática [Ito *et al.*, 2002]. Investigaciones realizadas en modelo animal han señalado que algunos productos secretados por PNECs y NEBs podrían mediar la respuesta inflamatoria, la remodelación y la hiperreactividad de la vía aérea en displasia broncopulmonar y asma [Zhou *et al.*, 2011, Sunday *et al.*, 1998]. Un estudio realizado en modelo de injuria pulmonar inducida por radiación, mostró un incremento de células neuroendocrinas en el epitelio, y demostró la participación de GRP en el daño pulmonar [Zhou *et al.*, 2013]. Por otro lado, en lactantes fallecidos por SIDS se ha observado hiperplasia e hipertrofia de PNECs y NEBs, que si bien no constituye una enfermedad pulmonar, su patogénesis podría relacionarse a anomalías en el control de la respiración [Cutz *et al.*, 2007]. Por último, se ha reportado que Nicotina y 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), una nitrosamina derivada del tabaco, inducen secreción de 5-HT [Plummer *et al.*, 2000]. Así, la hiperplasia e hipertrofia de PNECs y NEBs, sumado al incremento en los niveles de sus productos de secreción, no sólo podrían conformar parte de la respuesta inflamatoria, sino también podrían constituir una reacción a la hipoxia, que es un aspecto frecuente en algunas enfermedades respiratorias [Fu *et al.*, 2002].

A diferencia de la evidencia encontrada sobre la descripción de células neuroendocrinas en relación a algunas enfermedades pulmonares crónicas, escasos estudios describen cambios en células neuroendocrinas durante la infección respiratoria. En este sentido, un estudio realizado en muestras humanas reportó un aumento de PNECs y NEBs en infección pulmonar, con respecto al grupo control [Yancheva *et al.*, 2015]. En modelo animal de infección por Virus Respiratorio Sincicial (VRS), se ha observado un aumento en la expresión de Sustancia P, y un aumento en la cantidad de nervios inmunorreactivos a sustancia P, sumado a una reducción en la expresión y síntesis de CGRP, marcador de PNECs y NEBs, durante la infección [Dakhama *et al.*, 2005]. Sin embargo, los estudios que describen la morfología de las células neuroendocrinas y la significancia de este aspecto en la patogenia de la infección respiratoria, son todavía insuficientes. En este sentido, los productos secretados por células neuroendocrinas podrían tener una importante función en la patogenia de la infección. Así, la evidencia sugiere que CGRP, GRP, y alternativamente sus receptores, podrían tener un rol relevante durante la infección, tanto en la respuesta de broncoconstricción, inflamación, como en la remodelación de la vía aérea.

3. Péptido Relacionado con el Gen de Calcitonina (CGRP)

3.1 Generalidades de CGRP

CGRP es un neuropéptido que se expresa en el sistema nervioso central (SNC) y periférico [Kresse *et al.*, 1992], células y órganos del sistema inmune [Tokoyoda *et al.*, 2004, Ma *et al.*, 2010], por lo que es posible detectar CGRP en muchos tejidos. En el pulmón, CGRP está presente tanto en las fibras nerviosas que inervan la vía aérea, como en las células neuroendocrinas pulmonares, PNECs y NEBs, que forman parte del sistema neuroendocrino pulmonar, en todos los niveles de la vía aérea. CGRP ha sido descrito en varias especies, incluyendo humanos y ratas [Springer *et al.*, 2003].

CGRP es un péptido de 37 aminoácidos que surge luego del splicing alternativo tejido-específico de un pre-mRNA, que es transcrito a partir del gen de calcitonina, dando lugar así a CGRPI o alfa-CGRP. Un segundo gen, altamente relacionado, origina CGRP II o beta-CGRP. Alfa-CGRP es el más abundante [Rosenfeld *et al.*, 1992, Springer *et al.*, 2003].

3.2 Funciones de CGRP

CGRP ejerce diversos efectos, dada la amplia distribución de éste y sus receptores, según el tejido sobre el cual actúa. Uno de sus principales efectos es el vascular, puesto que CGRP actúa como vasodilatador, tanto a nivel sistémico como pulmonar [Olivar *et al.*, 2000, Springer *et al.*, 2004].

A diferencia del efecto vascular, el efecto de CGRP sobre el músculo liso bronquial es contradictorio. Una investigación realizada en cobayos muestra que CGRP no induce broncoconstricción por sí solo, pero es capaz de inhibir la respuesta de otros broncoconstrictores, como sustancia P o agonistas colinérgicos, ejerciendo un efecto protector, sin embargo, esta broncoprotección se atenúa durante la inflamación, en cobayos sensibilizados y estimulados con ovoalbúmina, permitiendo la broncoconstricción [Cadieux *et al.*, 1999]. Otro estudio observó, en bronquios humanos aislados, una leve relajación luego del estímulo con CGRP en anillos bronquiales con epitelio intacto, mientras que, el estímulo con CGRP indujo una respuesta broncoconstrictora en anillos bronquiales donde el epitelio había sido

removido [Springer *et al.*, 2004]. A juzgar por los resultados, el efecto de CGRP sería dependiente del estado previo del pulmón. Además, la acción de CGRP no sería directa sobre el músculo liso bronquial, conclusión que es apoyada por experimentos realizados en ratones con delección del componente CRLR del receptor de CGRP en células del músculo liso bronquial, en los cuales la sensibilización y desafío con ovoalbúmina induce un incremento en la resistencia de la vía aérea luego del estímulo con metacolina, a diferencia de lo observado en ratones con delección de CRLR en todos los tejidos, en los cuales se observa una reducción significativa en la resistencia de la vía aérea, por lo tanto, CGRP no actúa directamente en las células del músculo liso bronquial para inducir broncoconstricción [Li *et al.*, 2014].

Evidencia creciente indica que el sistema nervioso interactúa con el sistema inmune, a través de moléculas específicas y sus receptores. Así, CGRP constituiría uno de estos mediadores, aunque esta función es controversial y se encuentra aún en estudio. Se ha demostrado que CGRP induce la producción de IL-4 en linfocitos T, y contribuye a la diferenciación hacia células Th2 [Tokoyoda *et al.*, 2004]. Un estudio posterior confirmó estos hallazgos, demostrando que, en modelo de hipersensibilidad dérmica de contacto, un modelo de inflamación cutánea, CGRP induce inflamación tipo Th2, con incremento significativo en la producción de IL-4 [Mikami *et al.*, 2011]. Por otro lado, se ha mostrado que CGRP induce la producción de IL-17 a partir de células Th17, y que en este sentido, media la inflamación en un modelo de encefalomiелitis autoinmune [Mikami *et al.*, 2012]. También en tejido dentario, CGRP poseería funciones proinflamatorias [Bowler *et al.*, 2013].

En pulmón, recientemente se ha demostrado que CGRP, a través de la interacción con su receptor y la activación de la vía cAMP/PKA, promueve la producción de IL-9 y la diferenciación de células Th9, *in vitro* e *in vivo*, esto último en un modelo de inflamación de la vía aérea inducida por ovoalbúmina, en ratones deficientes en receptor de CGRP. Además, en el grupo de ratones deficientes en receptor de CGRP, este estudio observó una disminución significativa en el infiltrado celular, incluyendo células Th y mastocitos, y en el puntaje de valoración clínica [Mikami *et al.*, 2013]. En modelo de hiperreactividad bronquial, CGRP participaría en

el incremento en los niveles de leucotrienos en el pulmón, no así en la infiltración eosinofílica [Aoki-Nagase *et al.*, 2002].

No obstante lo anterior, estudios muestran que CGRP también tendría un efecto antiinflamatorio. CGRP reduce la producción de las citoquinas Th1, IL-2 e IFN- γ [Tokoyoda *et al.*, 2004]. En experimentos realizados *in vitro*, se ha demostrado que CGRP inhibe la migración y maduración de células dendríticas [Mikami *et al.*, 2011, Rochlitzer *et al.*, 2011], y el pretratamiento de células dendríticas con CGRP reduce la activación y proliferación de células T. Estos hallazgos fueron estudiados en un modelo *in vivo* de inflamación inducida por ovoalbúmina, encontrándose que la transferencia de células dendríticas pretratadas con CGRP disminuye la infiltración eosinofílica, sin afectar los niveles de macrófagos, neutrófilos ni linfocitos, y sin cambios en los niveles de citoquinas Th1 ni Th2 [Rochlitzer *et al.*, 2011]. Además, en modelo de infección por VRS, la administración profiláctica de CGRP reduce el número de linfocitos en el pulmón [Dakhama *et al.*, 2005].

3.3 Rol de CGRP en la enfermedad pulmonar

Investigaciones han mostrado cambios significativos en los niveles de CGRP en modelos de enfermedad pulmonar. Se ha observado incremento en la expresión de mRNA de CGRP y niveles de CGRP pulmonar en modelo animal de hiperreactividad bronquial inducido por inhalación de ozono [Wu *et al.*, 2007]. Otro estudio reportó incremento significativo en los niveles de CGRP pulmonar, en modelo animal de hiperreactividad bronquial inducida por ovoalbúmina, mientras que, la delección del gen de CGRP previene la hiperreactividad bronquial [Aoki-Nagase *et al.*, 2002]. Una investigación posterior demostró que la delección del gen del receptor de CGRP también previene la hiperreactividad bronquial e inflamación, incluyendo la producción de IL-4, reafirmando los hallazgos previos [Li *et al.*, 2014]. Como se ha señalado previamente, CGRP promueve la producción de IL-9 y la diferenciación de células Th9 en un modelo de inflamación inducida por ovoalbúmina, y en ratones deficientes en receptor de CGRP, el infiltrado celular, incluyendo células Th y mastocitos, y el puntaje de valoración clínica se reducen [Mikami *et al.*, 2013]. Además, CGRP participaría en el incremento en los niveles de

leucotrienos en el pulmón [Aoki-Nagase *et al.*, 2002]. Sin embargo, CGRP también tendría efectos antiinflamatorios en el pulmón [Rochlitzer *et al.*, 2011, Dakhama *et al.*, 2005].

Por otro lado, se ha asociado la acción de CGRP a injuria y reparación, específicamente, un estudio en modelo de injuria pulmonar por ozono ha señalado una vinculación con necrosis celular y proliferación epitelial [Oslund *et al.*, 2009]. En este mismo sentido, se ha mostrado que CGRP estimula la proliferación de células epiteliales alveolares, que se comportan como células progenitoras para la reparación epitelial [Kawanami *et al.*, 2009]. Además, se ha demostrado que CGRP promueve indirectamente la proliferación de células progenitoras en las glándulas submucosas traqueales [Xie *et al.*, 2011].

Debido a su acción vasodilatadora, se ha demostrado en modelo animal que CGRP atenúa la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, por sí sola y en combinación con vasoconstrictores [Champion *et al.*, 2000].

Si bien se han descrito cambios en la expresión y niveles de CGRP, y el rol de este neuropéptido en algunos modelos de enfermedad respiratoria, principalmente en hiperreactividad bronquial, existe escasa evidencia sobre los niveles de CGRP y su significancia durante la infección pulmonar. Un estudio llevado a cabo en un modelo animal de infección por VRS mostró una reducción en la expresión y en los niveles de CGRP en epitelio y en fibras nerviosas pulmonares [Dakhama *et al.*, 2005], sin embargo, la evidencia es aún limitada.

4. Péptido Liberador de Gastrina (GRP)

4.1 Generalidades de GRP

GRP es un neuropéptido presente en distintos sistemas, tales como: SNC, donde ejerce un rol como cotransmisor, participando en la regulación del comportamiento y cognición; tracto gastrointestinal, donde regula la liberación hormonal y la secreción de ácido gástrico; y pulmón, donde es secretado por las células neuroendocrinas y regula diversas funciones [Cornelio *et al.*, 2007, Emanuel *et al.*, 1999].

GRP fue el primer péptido demostrado en las células neuroendocrinas pulmonares. Es un péptido de 27 aminoácidos, homólogo mamífero de bombesin, que es un péptido de 14 aminoácidos aislado de la piel de anfibios. Ambos comparten una secuencia C-terminal funcional conservada, y tienen los mismos efectos fisiológicos. Estos dos péptidos pertenecen a la familia de los péptidos similares a bombesina (Bombesin-like peptide, BLP) [Sunday *et al.*, 2004].

GRP es sintetizado como un prepropéptido de 148 aminoácidos. La remoción de un péptido de 23 aminoácidos por una peptidasa genera proGRP₁₋₁₂₅, que es escindido luego de la secuencia lisina-lisina en la posición 29-30, para liberar el extremo C-terminal, proGRP₃₁₋₁₂₅. Posteriormente, una carboxipeptidasa remueve las dos lisinas del extremo C-terminal de GRP₁₋₃₀ para producir GRP₁₋₂₈ glicina. La amidación de la metionina C-terminal da origen a GRP₁₋₂₇ amida [Patel *et al.*, 2006].

El mRNA de GRP es detectado en células neuroendocrinas pulmonares humanas a las 8 semanas de gestación, alcanza su nivel más alto a las 20 semanas de gestación, luego de lo cual declina, alcanzando los valores del adulto cerca de las 34 semanas de gestación. Los niveles del péptido GRP, en cambio, permanecen elevados durante varios meses después del nacimiento [Spindel *et al.*, 1987, Sunday *et al.*, 2004].

GRP ejerce su acción mediante la interacción con el receptor de GRP (GRPR). Este es un receptor de 7 dominios transmembrana, acoplado a proteína G. Una vez que se produce la interacción ligando-receptor, se activan varias vías de señalización, como PKC (protein kinase C), MAPK (mitogen-activated protein kinase), FAK (focal adhesion kinase), entre otras. Así, GRP actúa en distintos tejidos

donde ejerce diversos efectos, induciendo mitosis, contracción del músculo liso, secreción hormonal, quimiotaxis de células del sistema inmune, liberación de citoquinas, etc. [Siegfried *et al.*, 1997, Cornelio *et al.*, 2007, Lach *et al.*, 1993, Czepielewski *et al.*, 2012].

Debido a sus diversas acciones, GRP se ha vinculado a la patogenia de algunas enfermedades, como: enfermedades psiquiátricas, gastritis, artritis reumatoide, cáncer y enfermedades pulmonares [Bédard *et al.*, 2007, Rezin *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2011, Patel *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2011].

4.2 Rol de GRP y su receptor en la patología pulmonar

Estudios han demostrado que GRP contribuye a la morfogénesis pulmonar [Emanuel *et al.*, 1999] e induce broncoconstricción [Lach *et al.*, 1993, Zhou *et al.*, 2011].

Por otro lado, se ha señalado que GRP actúa como mediador de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado, *in vivo* e *in vitro*, que GRP induce quimiotaxis de neutrófilos a través de la activación de GRPR en estas células [Czepielewski *et al.*, 2012]. Un estudio desarrollado en modelo de displasia broncopulmonar, y paralelamente mediante la administración de GRP intratraqueal, mostró un incremento en el número de mastocitos en el pulmón, que fue reducido con un bloqueador de GRP, Además, GRP indujo proliferación y quimiotaxis de mastocitos *in vitro* [Subramaniam *et al.*, 2003]. En modelo de hiperreactividad bronquial inducida por ovoalbúmina, se observó un incremento en los niveles de GRP en el epitelio de la vía aérea. En este mismo estudio, utilizando además un modelo de hiperreactividad inducida por ozono, se demostró que GRP se asoció a un aumento en la resistencia de la vía aérea, a infiltración por macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, y a un incremento en los niveles de citoquinas Th1, Th2 y Th17. También se observó un aumento en la expresión de mRNA del receptor de GRP (GRPR) en macrófagos y células T, no así en polimorfonucleares [Zhou *et al.*, 2011].

Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, muestran que GRP induce proliferación de fibroblastos [Aguayo *et al.*, 1990, Ashour *et al.*, 2006]. En biopsias de portadores de granuloma eosinofílico, un enfermedad caracterizada por fibrosis e

inflamación en la vía aérea, se observó un aumento en el nivel de células positivas para GRP en el epitelio de la vía aérea, además de un incremento en la proliferación de fibroblastos *in vitro* luego del estímulo con GRP [Aguayo *et al.*, 1990]. Por otra parte, en un modelo de injuria pulmonar inducida por radiación, caracterizada por fibrosis, GRP induciría aumento en marcadores de fibrosis [Zhou *et al.*, 2013]. Se ha descrito también que GRP tendría un rol en la fibrosis observada en displasia broncopulmonar, dado que, en un modelo de displasia se observó incremento en los niveles de GRP acompañado de fibrosis, atelectasias y distensión de sacos alveolares, que fueron atenuados luego de la administración de un anticuerpo anti-GRP [Sunday *et al.*, 1998].

Además de los cambios en los niveles de GRPR y de su activación, descritos en células del sistema inmune luego de un estímulo, previamente mencionados, la expresión de GRPR ha sido ampliamente estudiada en cáncer, como potencial blanco terapéutico [Cornelio *et al.*, 2007]. Un estudio realizado en células procedentes de individuos fumadores, encontró un aumento en la expresión de mRNA de GRPR entre fumadores de más de 25 paquetes-año comparado con fumadores de menos de 25 paquetes-año, y la expresión de mRNA de GRPR se asoció a mayor respuesta proliferativa luego del estímulo con GRP [Shriver *et al.*, 2000, Siegfried *et al.*, 1997].

No obstante lo anterior, no se han descrito cambios en la expresión y niveles de GRP y GRPR durante la infección pulmonar. Según la información presentada, la evidencia de cambios a nivel de células neuroendocrinas pulmonares, su innervación, y de expresión y niveles de CGRP durante la infección respiratoria, y la significancia de estos cambios en la patogenia de la infección, es todavía insuficiente. Más aún, no existen estudios que caractericen la densidad de células neuroendocrinas y de su innervación, la expresión y niveles de sus péptidos de secreción CGRP y GRP, y la expresión y niveles del receptor GRPR, durante la infección por *Pneumocystis carinii*.

En resumen, la evidencia presentada sugiere que las células neuroendocrinas pulmonares, a través de la acción de sus péptidos de secreción CGRP y GRP, podrían contribuir a la inducción de la respuesta inflamatoria y broncoconstricción

descritos durante la infección respiratoria, específicamente, durante la infección por *Pneumocystis carinii* (Figura 4). De esta forma, la descripción de las características morfológicas de PNEC/NEBs y de la expresión y niveles de CGRP, GRP y GRPR durante la infección primaria por *Pneumocystis carinii*, contribuiría al conocimiento de la patogenia de la infección respiratoria, especialmente de una infección altamente prevalente en los primeros meses de vida, cuya asociación a algunas enfermedades pulmonares de la infancia se encuentra en estudio. Se desprende de lo anterior, que los neuropéptidos CGRP y GRP, y el receptor GRPR, podrían constituir blancos farmacológicos que contribuyan en la prevención o reducción de cambios patológicos que pueden ocurrir en la vía aérea durante la infección respiratoria. En este sentido, la infección primaria por *Pneumocystis* constituye un excelente modelo para el estudio de lo anterior.

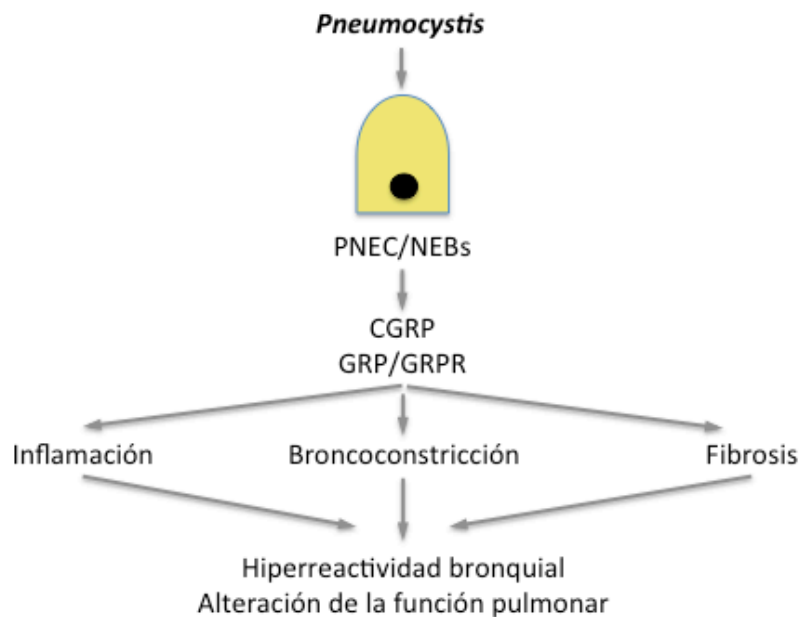


Figura N°4. Eventuales cambios en el sistema neuroendocrino pulmonar asociados a la infección primaria por *Pneumocystis carinii* en ratas inmunocompetentes, y su posible impacto en la patogenia de la infección en el hospedero.

Por lo tanto, los antecedentes previamente aportados y su posible impacto terapéutico han llevado a formular la hipótesis de trabajo que se expone a continuación.

II. HIPÓTESIS

La infección primaria por *Pneumocystis carinii* se asocia a estimulación del sistema neuroendocrino pulmonar. Esto se expresa como hiperplasia e hipertrofia de PNEC/NEBs, incremento de la inervación de NEBs, aumento en la expresión génica de sus péptidos de secreción CGRP, GRP y del receptor GRPR, e incremento en los niveles de CGRP y GRP, a distintos tiempos de la infección, en ratas inmunocompetentes

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar la asociación de la infección primaria por *Pneumocystis* con la densidad y tamaño de PNEC/NEBs, la densidad de inervación, la expresión génica de sus péptidos de secreción CGRP y GRP y del receptor GRPR, y los niveles de CGRP y GRP, a distintos tiempos de la infección en ratas inmunocompetentes

2. Objetivos específicos

1. Determinar la densidad y tamaño de células positivas a CGRP, indicadoras de PNEC/NEBs, y la densidad de nervios positivos a sustancia P en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por *P. carinii*
2. Determinar los niveles del péptido de secreción GRP en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por *P. carinii*
3. Determinar los niveles de mRNA de CGRP y del receptor GRPR, y frecuencia de ratas que expresan mRNA de GRP en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por *P. carinii*

IV. METODOLOGÍA

1. Modelo animal

Para lograr los objetivos, se trabajó con pulmones existentes en el laboratorio, procedentes de un modelo de infección primaria por *P. carinii* en ratas inmunocompetentes, estandarizado en el laboratorio, y que no fue desarrollado como parte de este trabajo de tesis. El modelo consistió en la obtención de un grupo de ratas Sprague Dawley infectantes, portadoras de PcP (neumonía por *Pneumocystis*), y un grupo de ratas Sprague Dawley inmunocompetentes, preñadas, cuyas crías fueron destinadas a obtener un grupo control y un grupo experimental. La mitad de las crías recibió tratamiento con trimetoprim/sulfametoxazol (TMS), conformando el grupo control. La otra mitad se expuso a ratas infectantes por cohabitación, constituyendo el grupo experimental. No se utilizó un grupo control con H₂O debido a que experimentos previos muestran presencia de *P. carinii* en este grupo. Las ratas fueron sacrificadas a los 45, 60 y 75 días de edad. Cada grupo de sacrificio fue constituido por 10 ratas. Se utilizó este modelo de infección primaria porque investigaciones previas del laboratorio han demostrado que este modelo permite estudiar las distintas fases de la infección primaria, en la cual se ha observado un máximo de carga de *P. carinii* alrededor del día 75 de infección, y cambios patológicos durante la infección, además, la infección primaria es una infección espontánea que no requiere inducción de inmunosupresores, evadiendo así el eventual efecto de un fármaco sobre la expresión de neuropéptidos.

2. Diagnóstico de *Pneumocystis*

El diagnóstico de *Pneumocystis* fue establecido mediante tinción histológica de Gomori-Grocott y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) anidada. Este diagnóstico no fue desarrollado como parte de esta tesis.

3. Metodología asociada al objetivo específico 1

“Determinar la densidad y tamaño de células positivas a CGRP y la densidad de nervios positivos a sustancia P en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por P. carinii”.

La densidad y tamaño de células positivas a CGRP se determinó mediante Inmunohistoquímica (IHQ), como parte de este trabajo de tesis.

3.1 Inmunohistoquímica

Se obtuvieron cortes de 3 μm de grosor a partir de tejido de pulmón izquierdo de rata, previamente fijado en formalina por 48 horas e incluido en parafina. Los cortes fueron desparafinados y calentados hasta 95°C en tampón citrato 10mM, pH 6,0, para recuperar antígeno. El bloqueo de peroxidasa endógena se realizó con H_2O_2 al 1% y el resto del protocolo se desarrolló utilizando los kits ImmunoCruz rabbit y mouse ABC Staining System (sc-2018 y sc-2017, Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las láminas fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide), marcador de células neuroendocrinas, dilución 1:2000 (C8198, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) [Brouns *et al.*, 2009, Springall *et al.*, 1997], y anti-sustancia P, marcador neural, dilución 1:1000 (ab14184, Abcam, Cambridge, UK). Como control positivo se utilizó cerebro de rata, como control negativo se omitió el anticuerpo primario. Los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina.

3.2 Análisis morfológico

Para determinar la densidad del PNECs y NEBs en la vía aérea, se cuantificó el número de PNECs y el número de NEBs en cada vía aérea, luego se determinó la longitud de la membrana basal (mm). La densidad de PNEC/NEBs se expresó como número de PNEC/NEBs por unidad de longitud de membrana basal (mm). Se consideró como NEB un conjunto de más de dos células inmunorreactivas a CGRP [Hong *et al.*, 2001]. Para cuantificar la densidad de células según tamaño de la vía aérea, se midió el diámetro de la vía aérea en vías cortadas transversalmente. Se consideró que un diámetro menor a 50 μm correspondía a bronquiolos terminales,

entre 50-250 μm correspondía a vía aérea pequeña, y un diámetro mayor a 250 μm correspondía a vía aérea mayor [Martin *et al.*, 2000]. Para determinar el tamaño de los NEBs, se cuantificó la altura (μm) de éstos, seleccionando el punto más alto de un NEB. Todas las cuantificaciones fueron realizadas en ciego por 1 observador, y para todas ellas se utilizó microscopio OLYMPUS BX60 con Software Image-Pro® Plus 5.1.2 (Figura 5).

4. Metodología asociada al objetivo específico 2

“Determinar los niveles del péptido de secreción GRP en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por P. carinii”.

La cuantificación de la concentración de GRP se realizó, como parte de este trabajo de tesis, mediante Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA) de competición [Novak *et al.*, 2000].

4.1 ELISA

Se utilizó el kit comercial Gastrin-releasing peptide ELISA Kit, Blue Gene Biotech. A partir de 200 mg de tejido pulmonar, previamente conservado en RNA later, se obtuvo un homogeneizado en tampón fosfato salino (PBS; 1x, pH 7.2), que fue disgregado con ultrasonicador y centrifugado a 1500 g por 15 minutos. Se tomaron 100 μl de sobrenadante de cada muestra, que fueron depositados en los pocillos de la microplaca, precubiertos con anticuerpo anti-GRP; PBS 1x se utilizó como control blanco. Las muestras fueron incubadas con el conjugado GRP-HRP por una hora y, luego, las muestras se incubaron con sustrato de la enzima HRP por 15 minutos. La Densidad Óptica (O.D.) fue medida en espectrofotómetro a 450 nm. Se determinó la concentración de GRP en cada muestra interpolando los valores de las muestras en una curva estándar concentración *versus* absorción, con un $r^2=0,98906$. Todas las mediciones fueron realizadas en duplicado.

5. Metodología asociada al objetivo específico 3

“Determinar los niveles de expresión de mRNA de CGRP y del receptor GRPR, y frecuencia de ratas que expresan mRNA de GRP en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por P. carinii”.

Los niveles relativos de expresión de los genes de CGRP y GRPR fueron determinados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Reversa (qRT-PCR), mientras que la frecuencia de ratas que expresan mRNA de GRP se determinó mediante RT-PCR convencional, ambos como parte de esta tesis, a partir de un homogeneizado de pulmón de rata conservado en RNAlater, con partidores diseñados en el laboratorio, que se señalan más adelante.

5.1 Extracción de RNA total

Se obtuvo 80 mg de tejido pulmonar de rata, y tejido de estómago para los controles positivos, conservados en RNA later. Se utilizó H₂O como control negativo. El tejido pulmonar fue homogeneizado, y la extracción de RNA total se realizó usando el reactivo comercial TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), según las indicaciones del fabricante, adicionando 1 ml de Trizol a cada tubo. Se determinó la concentración de RNA total en espectrofotómetro para microplacas Epoch (Biotek, USA).

5.2 Reacción de Transcripción Reversa (RT)

Se preparó una mezcla de RNA total 1 µg, partidores aleatorios 2 µl (10 µM), mix de dNTPs 1 µl (10 mM) y agua DEPC para lograr 10 µl. Luego se incubó a 65°C por 5 min y posteriormente en hielo por 1 min. Luego de esta incubación se agregó el siguiente mix: tampón RT 10x 2 µl, MgCl₂ (25 mM) 4 µl, DTT (0,1 M) 2 µl y RNAsa OUT 1 µl. Se incubó a 25°C por 2 min. Posterior a esto, se agregó 1 µl de SuperScript II (Invitrogen, Life Technologies, USA). Las mezclas fueron incubadas a 25°C por 10 min, 42°C por 50 min y 70°C por 15 min. Por último, las mezclas fueron incubadas con 1 µl de inhibidor de RNAsa a 37°C por 20 min.

5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional

El gen de GRP fue amplificado usando los partidores sentido 5'-GCAGTCTCCAGCCTACTTGG-3' y antisentido 5'-TTCAGCTGGCAGTTCCTTCC-3' (Tm 57,6°C). Se realizaron 40 ciclos de amplificación. Cada ciclo consistió en pasos consecutivos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2%. Se utilizó estómago como control positivo, agua como control negativo y actina como control interno. En cada una de las muestras se realizó un control negativo y una dilución 1:5, esta última para controlar posibles inhibidores de la reacción. Se determinó el número de muestras positivas para GRP en relación al total de muestras analizadas.

5.4 Reacción de PCR en tiempo real (qPCR)

La amplificación de los genes se realizó usando SensiMix SYBR Hi-ROX Kit (Bioline, UK), en un RotorGene 6000 Series (Corbett Research, Canada). Los partidores empleados fueron los siguientes: para CGRP sentido 5'-CCCTTTCCTGGTTGTCAGCA-3' y antisentido 5'-GCTCCAGCTCCCTGACTTTC-3', y para GRPR sentido 5'-CGGTCAAGTCCATGCGAAAC-3' y antisentido 5'-CTGGGATGGCCAACAGCATA-3'. Las reacciones de PCR fueron realizadas con las siguientes condiciones: denaturación inicial de 5 min a 94°C, 45 ciclos de 30 seg a 94°C, 20 seg a 60°C, 20 seg a 72°C. Se utilizó agua como control negativo, estómago como control positivo y actina como control interno.

6. Análisis Estadístico

Para el cálculo del número de animales por grupo experimental, que no fue realizado como parte de esta tesis, se utilizó la fórmula de cálculo de tamaño de muestra para estimación de la media en variables cuantitativas, con factor de corrección para $n/N > 0,05$, considerando la varianza de una de las mediciones histológicas para el cálculo. Como error de estimación máximo deseado (precisión), se consideró 0,2. El resultado de este cálculo arrojó un $n = 5$ ratas.

Para el análisis de los resultados se determinó inicialmente la distribución de los datos. Para aquellos datos con distribución normal, se utilizó una prueba de

ANOVA para comparación de grupos, con post test (Bonferroni's multiple comparisons test). En los casos de distribución no normal, se utilizó una prueba de ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallis, con post-test (Dunn's multiple comparisons test). Se consideró un nivel de significación de 0,05. En todos los análisis se utilizó el software Prism GraphPad 6.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

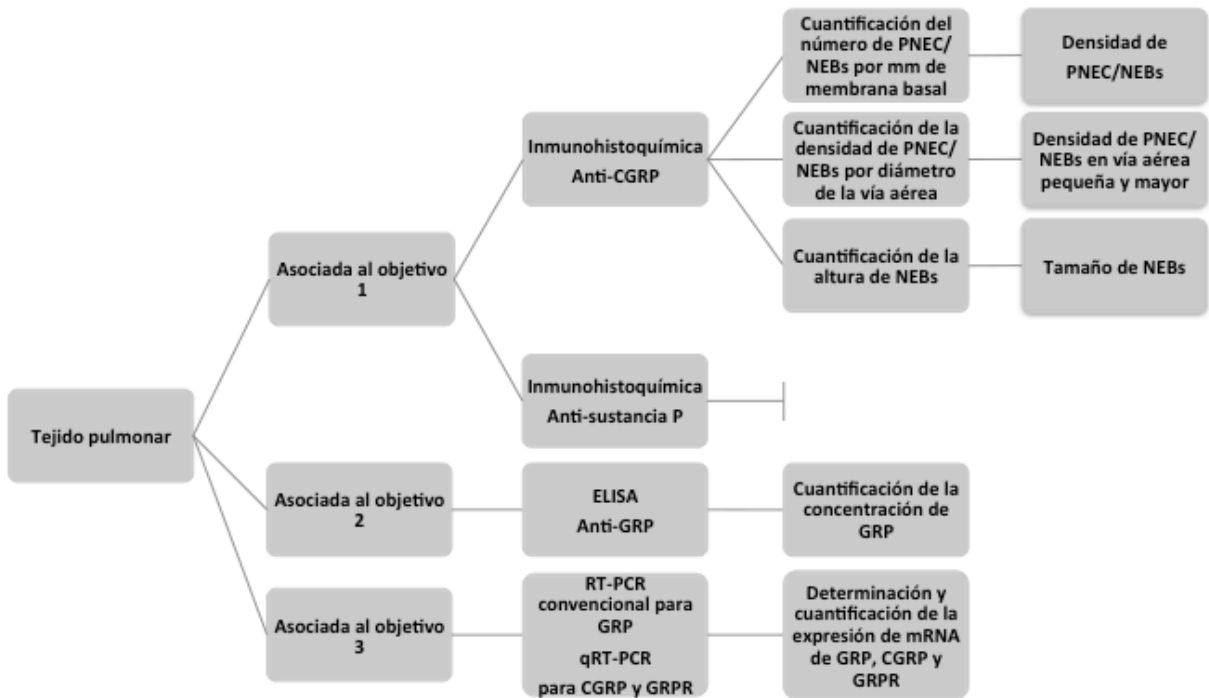


Figura N°5. Esquema resumen de la metodología de trabajo

V. RESULTADOS

1. Resultados asociados al objetivo específico 1

“Determinar la densidad y tamaño de células positivas a CGRP y la densidad de nervios positivos a sustancia P en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por P. carinii “

Algunos estudios muestran una asociación entre enfermedad pulmonar e hiperplasia de células neuroendocrinas, junto con aumento en los niveles del péptido de secreción CGRP [Zhou *et al.*, 2013, Ito *et al.*, 2002, Aguayo *et al.*, 1990, Wu *et al.*, 2007]. Por este motivo, y considerando las funciones del sistema neuroendocrino y de CGRP como mediadores de la hiperreactividad, inflamación, remodelación y reparación de la vía aérea [Zhou *et al.*, 2011, Sunday *et al.*, 1998, Aoki-Nagase *et al.*, 2002, Springer *et al.*, 2004, Kawanami *et al.*, 2009], se determinó la densidad de células positivas a CGRP durante la infección primaria por *Pneumocystis carinii*, como indicadora de la densidad de células neuroendocrinas y como indicadora de los niveles del péptido CGRP en el tejido pulmonar. Para esto se cuantificó la densidad de células inmunorreactivas a CGRP en solitario (PNECs) y en grupos celulares (NEBs) en cortes de pulmón de ratas control y con infección. Cabe señalar que CGRP ha sido ampliamente validado como marcador de células neuroendocrinas pulmonares, dado que, se ha demostrado que el porcentaje de células inmunorreactivas a CGRP no muestra diferencias con el porcentaje de células inmunorreactivas a PGP9.5, un marcador neural general y constitutivo de células neuroendocrinas [Brouns *et al.*, 2009, Springall *et al.*, 1997]. El lóbulo de procedencia de los cortes fue el izquierdo, debido a que un experimento previo realizado en lóbulo superior derecho mostró baja cantidad de vías aéreas mayores, resultando de esta forma poco representativo de la condición general del pulmón.

En una primera aproximación, al observar las vías aéreas procedentes de los cortes histológicos, fue posible observar una similar proporción de PNECs inmunorreactivas a CGRP en todos los días analizados, tanto en el grupo con infección como en el grupo control (Figura 6). A diferencia de esto, en general, fue posible observar NEBs en una menor cantidad de vías aéreas, y específicamente en

el día 75, hubo una mayor proporción de NEBs en comparación al resto de los otros grupos (Figura 6, insertos).

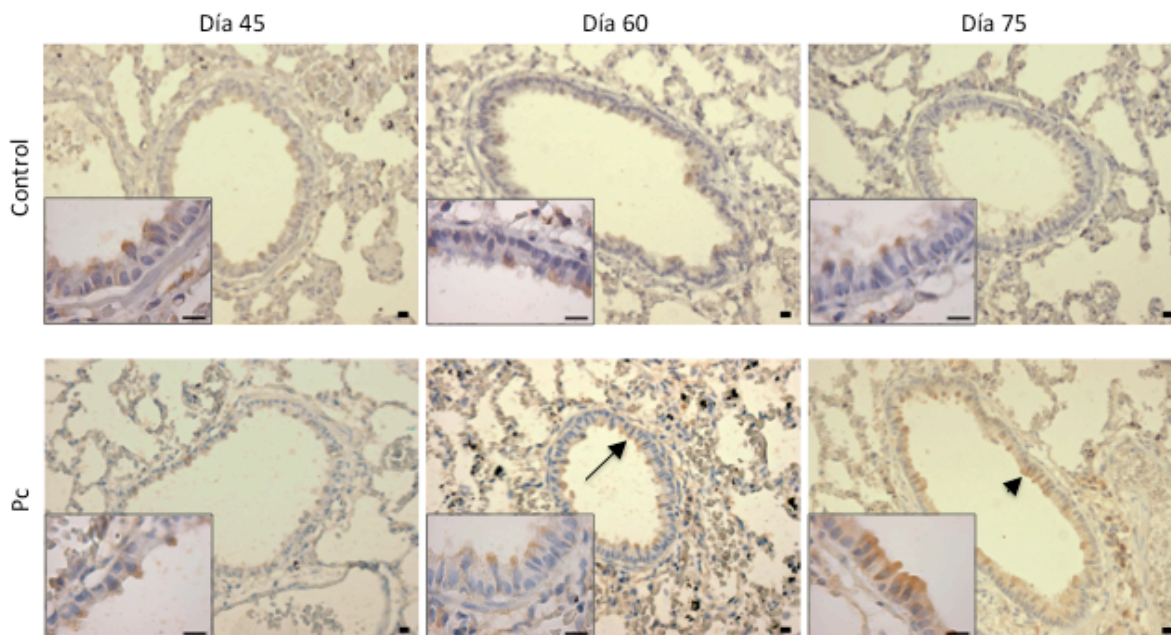


Figura N°6. Imágenes representativas de PNECs y NEBs en el epitelio de la vía aérea de pulmón de rata. Cortes histológicos de pulmón de rata fueron marcados con anticuerpo anti-CGRP mediante inmunohistoquímica. Se muestran imágenes representativas de bronquiolos (amplificación 20x) correspondientes al grupo control en la primera fila, y al grupo con infección (Pc) en la segunda fila. La primera columna muestra bronquiolos procedentes del día 45 de infección, la segunda columna muestra bronquiolos del día 60, y la tercera muestra bronquiolos del día 75 de infección. En las vía aéreas presentadas es posible observar células solitario inmunorreactivas a CGRP, indicadores de PNECs (flecha), y grupos de células inmunorreactivas a CGRP, indicadores de NEBs (cabeza de flecha). Los insertos muestran PNECs y NEBs (amplificación 100x) en el epitelio bronquiolar.

Para medir la densidad celular, en primer lugar, se cuantificó el número de células en todas las vías aéreas encontradas en los cortes, independiente de su tamaño, para apreciar de forma general la densidad de células neuroendocrinas. Al cuantificar la densidad de PNECs, no se observaron cambios significativos entre los grupos con infección y los grupos control, para ninguno de los días de infección estudiados (Figura 7A). En general, la densidad de PNECs observada varió entre 0,3 y 27,7 PNECs/milímetro de membrana basal (mmMB). Luego, se cuantificó la densidad de NEBs en todas las vías aéreas, observándose un incremento estadísticamente significativo en la densidad de NEBs en el grupo con infección del día 75, cuya densidad promedio fue de $0,9 \pm 4,5$ NEBs/mmMB, en comparación al

grupo control de ese mismo día, cuya densidad promedio fue de $0,4 \pm 1,0$ NEBs/mmMB. La densidad promedio en los otros dos días de estudio fue de $0,2 \pm 0,6$ NEBs/mmMB en el grupo con infección del día 45 *versus* $0,5 \pm 1,1$ NEBs/mmMB en el grupo control, y de $0,3 \pm 1,3$ NEBs/mmMB en el grupo control, sin embargo, en los días 45 y 60 no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Además, se comparó la densidad de NEBs entre los días 45 y 75 de infección con el objetivo de estudiar la progresión de los cambios en la densidad celular, y se observó un aumento significativo en la densidad de NEBs en el grupo con infección en el día 75 con respecto al día 45 (Figura 7B). Los valores son expresados como promedio+desviación estándar en todas las cuantificaciones de NEBs debido a la presencia de gran cantidad de vías aéreas sin NEBs, por lo cual, la comparación de medianas+rango intercuartílico no habría permitido observar las diferencias.

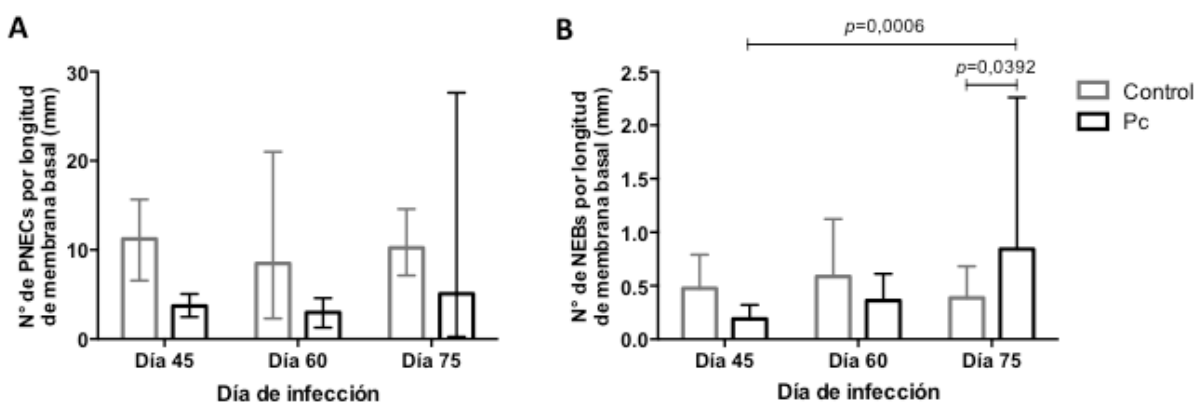


Figura N°7. Densidad de células neuroendocrinas pulmonares en vía aérea total de pulmón de rata. Se determinó la densidad de células neuroendocrinas mediante su cuantificación en relación a longitud de membrana basal (mm), en cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-CGRP procedentes de ratas control y con infección, a distintos tiempos de infección. **A.** Densidad de PNECs en vía aérea según día de infección y grupo de estudio. $n=4-5$. Los resultados son presentados como mediana \pm rango intercuartílico. **B.** Densidad de NEBs en vía aérea según día de infección y grupo de estudio. $n=4-5$. Los datos son presentados como promedio + SD.

En segundo lugar, dado que la vía aérea se divide en segmentos con distintas características fisiológicas que determinan la respuesta fisiopatológica durante la infección [van den Berge *et al.*, 2011], se estudió la densidad de células neuroendocrinas en los distintos segmentos de la vía aérea. Para esto, la vía aérea

fue dividida, en base al diámetro de corte transversal, en vía aérea pequeña, entre 50-250 μm , y vía aérea mayor, diámetro mayor a 250 μm . No se observaron bronquiolos terminales, es decir, vías aéreas de diámetro menor a 50 μm .

En cuanto a la vía aérea pequeña, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la densidad de PNECs entre los grupos con infección y los grupos control, para ninguno de los días de infección estudiados (Figura 8A). Sin embargo, se observó un aumento estadísticamente significativo en la densidad de NEBs en el grupo con infección del día 75, cuya densidad promedio fue de $0,5 \pm 1,2$ NEBs/mmMB, en comparación al grupo control de ese mismo día, cuya densidad promedio fue de $0,2 \pm 0,6$ NEBs/mmMB. La densidad promedio de NEBs para los otros dos días fue de $0,2 \pm 0,5$ NEBs/mmMB en el grupo con infección del día 45 *versus* $0,4 \pm 0,9$ NEBs/mmMB en el grupo control, y $0,3 \pm 0,8$ NEBs/mmMB en el grupo con infección del día 60 *versus* $0,4 \pm 0,9$ NEBs/mmMB en el grupo control, sin embargo, en los días 45 y 60 no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Además, se observó un incremento significativo en la densidad de NEBs en el grupo con infección en el día 75 con respecto al día 45 de infección (Figura 8B).

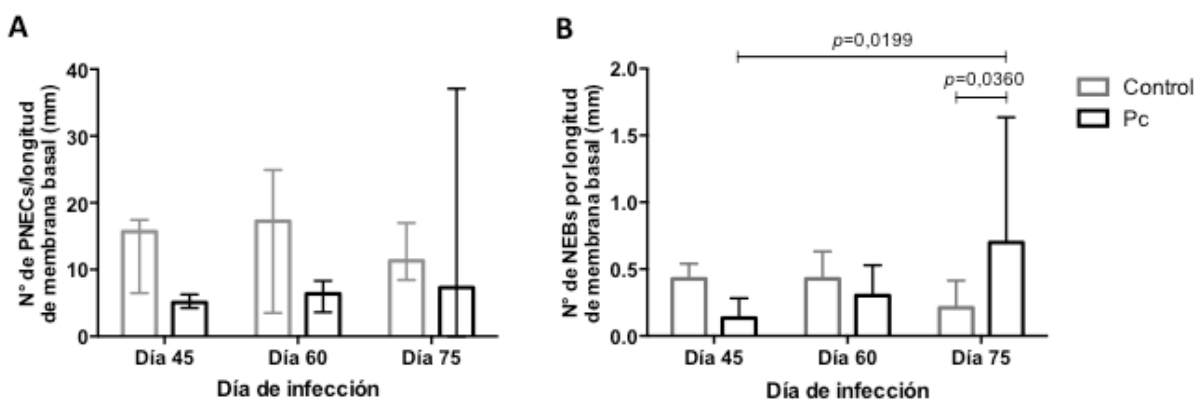


Figura N°8. Densidad de células neuroendocrinas pulmonares en vía aérea pequeña de pulmón de rata. Se determinó la densidad de células neuroendocrinas mediante su cuantificación en relación a longitud de membrana basal (mm), en vías aéreas con un diámetro entre 50 y 250 μm , de cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-CGRP procedentes de ratas control y con infección, a distintos tiempos de infección. **A.** Densidad de PNECs en vía aérea pequeña según día de infección y grupo de estudio. $n= 4-5$. Los resultados son presentados como mediana \pm rango intercuartílico. **B.** Densidad de NEBs en vía aérea pequeña según día de infección y grupo de estudio. $n= 4-5$. Los datos son presentados como promedio + SD.

En relación a la vía aérea mayor, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la densidad de PNECs entre los grupos con infección y los grupos control, para ninguno de los días de infección estudiados (Figura 9A). Similarmente, no se observaron cambios significativos en la densidad de NEBs entre los grupos con infección y los grupos control, para ninguno de los días de infección estudiados (Figura 9B). El día 60 no se consideró en la cuantificación de la densidad de NEBs por la baja cantidad de vías aéreas obtenidas.

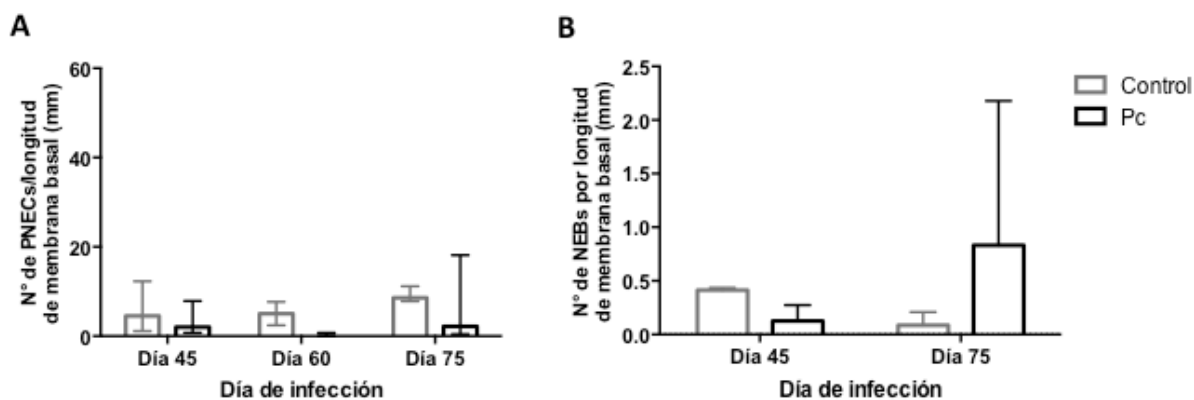


Figura N°9. Densidad de células neuroendocrinas pulmonares en vía aérea mayor de pulmón de rata. Se determinó la densidad de células neuroendocrinas mediante su cuantificación en relación a longitud de membrana basal (mm), en vías aéreas con un diámetro mayor a 250 μm , de cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-CGRP procedentes de ratas control y con infección, a distintos tiempos de infección. **A.** Densidad de PNECs en vía aérea mayor según día de infección y grupo de estudio. $n = 2-4$. Los resultados son presentados como mediana \pm rango intercuartílico. **B.** Densidad de NEBs en vía aérea mayor según día de infección y grupo de estudio. $n = 2-4$. Los datos son presentados como promedio + SD.

Estudios han mostrado una relación entre algunas enfermedades pulmonares y la presencia de hipertrofia de células neuroendocrinas, como indicador de patología [Cutz et al., 2007], por lo tanto, se determinó el tamaño de los NEBs durante la infección cuantificando su altura. De forma inicial, al estudiar NEBs en cortes histológicos, se observó una tendencia de los NEBs a presentar mayor altura en los grupos con infección de los días 60 y 75 en comparación a sus grupos control respectivos (Figura 10).

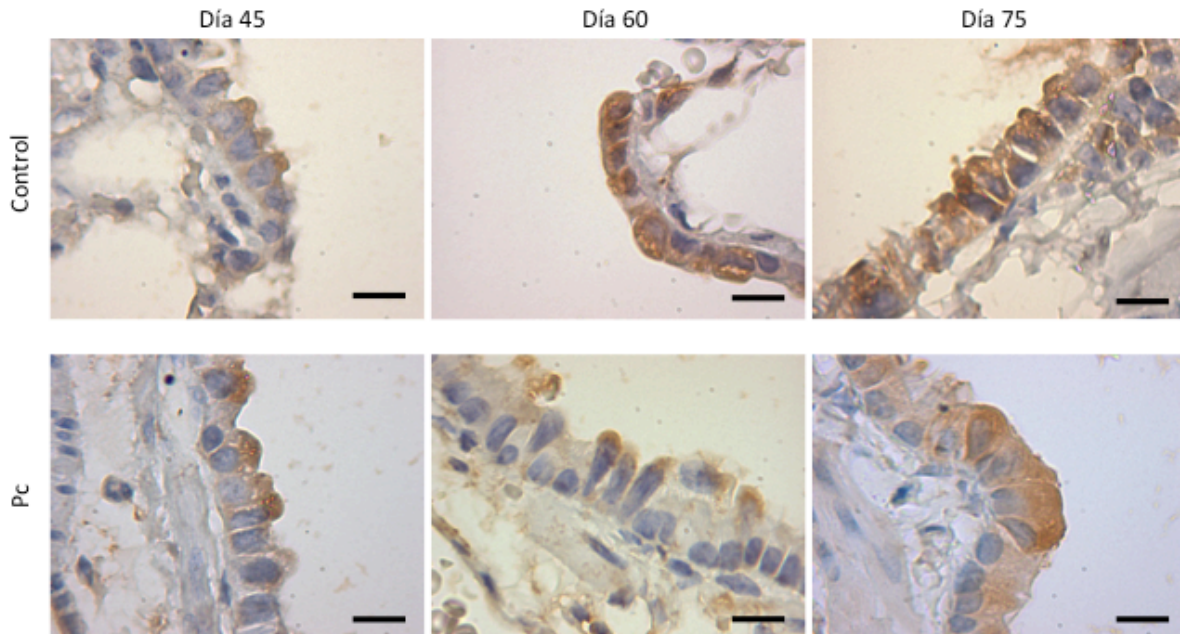


Figura N°10. Imágenes representativas de la altura de los NEBs en el epitelio de la vía aérea de pulmón de rata. Cortes histológicos de pulmón de rata fueron marcados con anticuerpo anti-CGRP mediante inmunohistoquímica. Se muestran imágenes representativas de grupos de células inmunorreactivas a CGRP, indicadores de NEBs, (amplificación 100x) correspondientes al grupo control en la primera fila, y al grupo con infección (Pc) en la segunda fila. La primera columna muestra NEBs procedentes del día 45 de infección, la segunda columna muestra NEBs del día 60, y la tercera muestra NEBs del día 75 de infección.

Para la cuantificación de la altura de NEBs, se midió la distancia entre la membrana basal y el borde apical de los grupos de células inmunorreactivas a CGRP en el epitelio de la vía aérea total, considerando el punto más alto de un NEB (Figura 11A). Los resultados muestran un aumento significativo en la altura de los NEBs en el día 60 de infección, cuya altura fue de $12,9 \mu\text{m}$, en comparación al grupo control, cuya altura fue de $9,0 \mu\text{m}$. La altura de NEBs para los otros días de infección fue de $11,2 \mu\text{m}$ en el día 45 de infección versus $10,9 \mu\text{m}$ en el grupo control, y $12,5 \mu\text{m}$ en el día 75 de infección *versus* $11,6 \mu\text{m}$ en el grupo control, sin embargo, en los días 45 y 75 no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 11B).

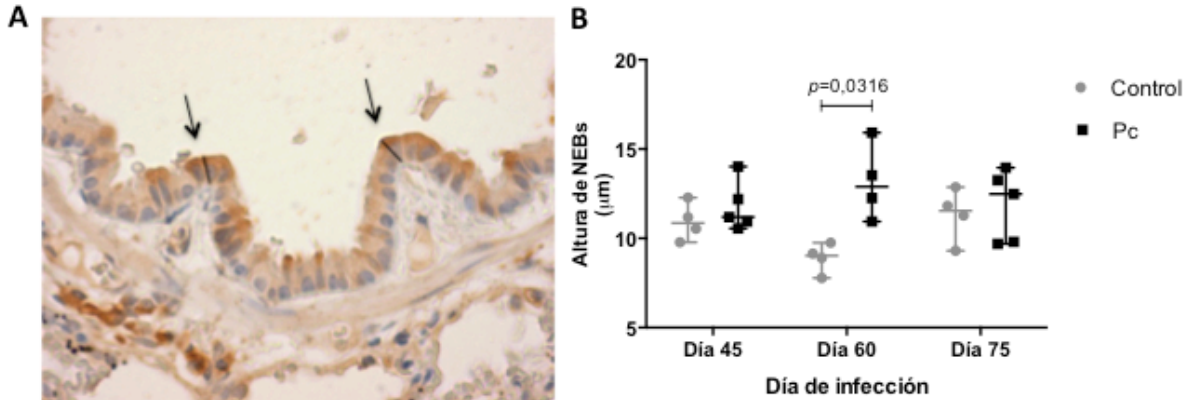


Figura N°11. Tamaño de NEBs en la vía aérea total de pulmón de rata. Se determinó el tamaño de los NEBs, como indicador de hipertrofia, mediante la cuantificación de su altura en cortes histológicos marcados con anticuerpo anti-CGRP, procedentes de ratas control y con infección, a distintos tiempos de infección. **A.** Figura representativa del método de cuantificación de la altura de los NEBs, midiendo la distancia entre la membrana basal y el punto apical más alto de un NEB (flechas). **B.** Altura de los NEBs en la vía aérea, según día de infección y grupo de estudio. n= 4-5. Los resultados son presentados como mediana \pm rango intercuartílico.

Dada la asociación entre la densidad de NEBs y la densidad de nervios que inervan estas estructuras en la vía aérea [Van Genechten *et al.*, 2004], la importancia de esta asociación en la fisiología de los NEBs [Brouns *et al.*, 2009], sumado a la descripción de aumento en la cantidad de nervios inmunorreactivos a sustancia P durante la infección por VRS [Dakhama *et al.*, 2005], se buscó determinar la densidad de nervios inmunorreactivos a sustancia P en la vía aérea durante la infección por *Pneumocystis*. Sin embargo, no fue posible visualizar nervios inmunorreactivos a sustancia P siguiendo las condiciones de trabajo mencionadas previamente, sólo se obtuvo en algunos casos una marca epitelial sugerente de células epiteliales inmunorreactivas a sustancia P, no obstante, esta marca fue inespecífica.

2. Resultados asociados al objetivo específico 2

“Determinar los niveles del péptido de secreción GRP en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por *P. carinii*”

En vista de los resultados obtenidos, es decir, incremento significativo en la densidad y tamaño de NEBs en grupos con infección, y dado el rol que tendrían estas células en la enfermedad respiratoria [Zhou *et al.*, 2011, Zhou *et al.*, 2013, Ashour *et al.*, 2006] se buscó estudiar otro de sus productos de secreción, que permitiera determinar el papel de estas células durante la infección por *Pneumocystis*. Algunas investigaciones han mostrado que el neuropéptido GRP, secretado principalmente por las células neuroendocrinas en el pulmón [Zhou *et al.*, 2011], induce broncoconstricción, media la respuesta inflamatoria, e induce proliferación de fibroblastos y del epitelio de la vía aérea [Ashour *et al.*, 2006, Subramaniam *et al.*, 2003, Zhou *et al.*, 2011, Haley *et al.*, 1998, Sunday *et al.*, 2004]. Por lo tanto, se cuantificó la concentración de GRP en tejido pulmonar durante la infección primaria por *Pneumocystis carinii*, mediante ELISA. No se observaron cambios estadísticamente significativos en la concentración de GRP entre grupos con infección y grupos control, para ninguno de los días de infección observados (Figura 12).

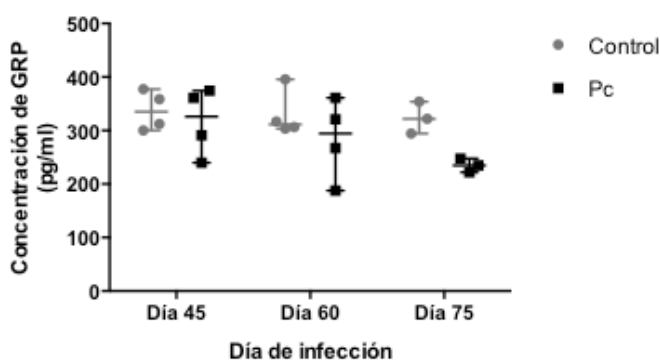


Figura N°12. Concentración de GRP en tejido pulmonar de rata.

Se cuantificó la concentración de GRP en tejido pulmonar procedente de ratas control y con infección, a distintos tiempos de infección, mediante ELISA. n= 3-4. Los resultados son presentados como mediana \pm rango intercuartílico.

3. Resultados asociados al objetivo específico 3

“Determinar los niveles de expresión de mRNA de CGRP y del receptor GRPR, y frecuencia de ratas que expresan mRNA de GRP en pulmones de rata, a distintos tiempos de la infección primaria por P. carinii”

Puesto que se observó un incremento significativo de células positivas para CGRP, se investigó si este incremento de CGRP es, en parte, debido a un aumento en la expresión del gen de CGRP. Además, dado que no se encontraron cambios en la concentración de GRP en pulmón durante la infección, se estudió si los niveles de expresión del gen de GRP también se mantenían sin cambios durante la infección. Para esto, se determinó la expresión de mRNA de CGRP y la frecuencia de ratas que expresan mRNA de GRP en tejido pulmonar de rata mediante qRT-PCR normalizado a gen de actina y RT-PCR convencional, respectivamente, a distintos tiempos de la infección. RT-PCR convencional fue utilizado dadas las dificultades para obtener resultados con qRT-PCR.

En primer lugar, se observó un incremento de 2,8 veces en los niveles de expresión de mRNA de CGRP en el día 75 de infección con respecto al grupo control, el cual fue estadísticamente significativo. Por otro lado, el nivel de expresión del día 75 de infección fue significativamente mayor con respecto al día 45 (Figura 13).

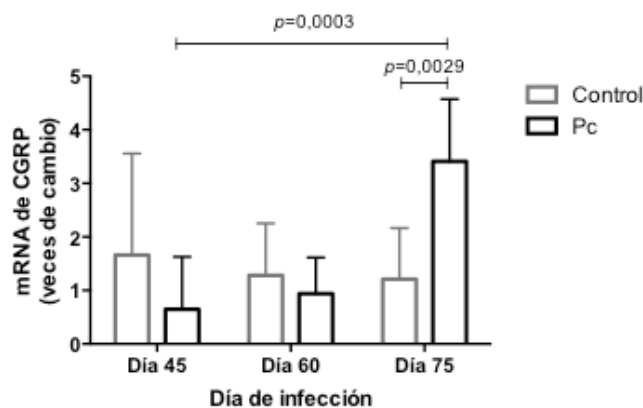


Figura Nº13. Niveles de expresión de mRNA de CGRP

Se cuantificaron los niveles de mRNA de CGRP normalizados a gen de actina en tejido pulmonar procedente de ratas control y con infección, a distintos tiempos de infección, mediante qRT-PCR. n= 3-4. Los datos son presentados como veces de cambio en relación al promedio del grupo control. Para cada grupo se muestra promedio + SD.

En segundo lugar, se observó un mayor porcentaje de ratas que expresaron mRNA de GRP en el grupo con infección, en comparación al grupo control (Figura 14 y Tabla 1). El mayor porcentaje de ratas que expresaron mRNA de GRP se observó en el día 60 de infección, alcanzando un 100% del total de ratas de ese grupo (Tabla 1).

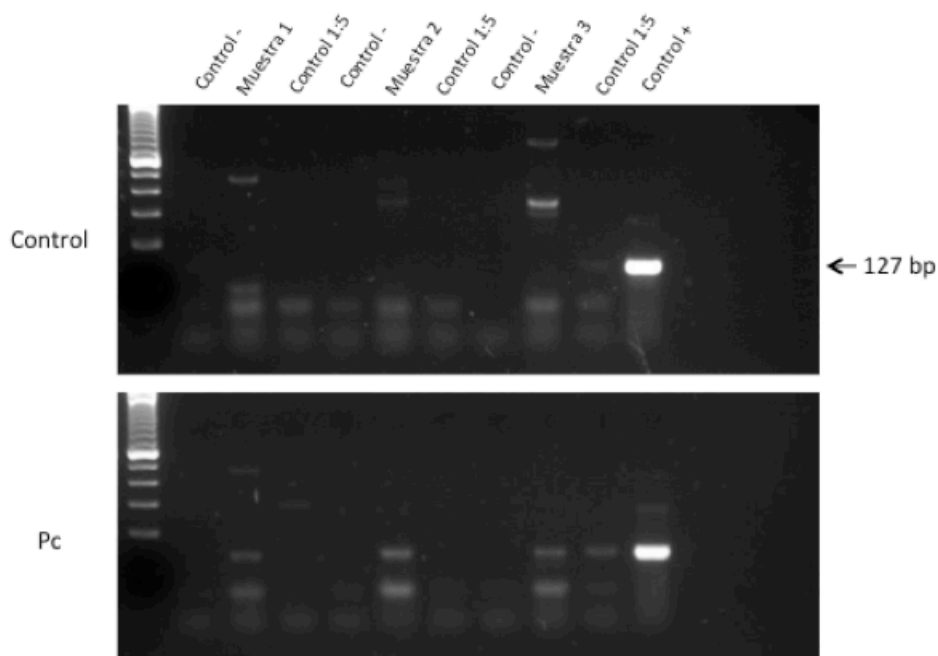


Figura N°14. Figuras representativas de la expresión de mRNA de GRP

La expresión de mRNA del gen de GRP fue determinada mediante PCR convencional en tejido de rata. Se muestran imágenes representativas de geles de electroforesis de 3 muestras provenientes de ratas control (arriba) y Pc (abajo). Cada una de las muestras fue estudiada con sus respectivos controles negativos y diluciones 1:5. El control positivo fue tejido de estómago. En el grupo control es posible observar que las tres muestras son negativas, sin embargo, la muestra 3 fue considerada positiva debido a la banda observada en su dilución 1:5. En el grupo Pc se observa que las tres muestras son positivas.

Tabla N°1. Frecuencia de ratas que expresan mRNA de GRP según grupo de tratamiento y día de infección

Se determinó la presencia de ratas que expresan mRNA de GRP en tejido pulmonar procedente de ratas control y con infección, a distintos tiempos de infección, mediante RT-PCR convencional. n= 3-5. Los datos son presentados como frecuencia absoluta y relativa de ratas que expresan mRNA de GRP.

Día de infección	Grupo de tratamiento			
	Control		Pc	
	Nº	%	Nº	%
Día 45	2/3	67	1/5	20
Día 60	1/3	33	4/4	100
Día 75	1/5	20	2/3	67

Trabajos previos han mostrado un aumento de expresión de mRNA de receptor de GRP, GRPR, asociado a inflamación [Zhou *et al.*, 2011, Czepielewski *et al.*, 2012]. Dada la relevancia de la acción del péptido neuroendocrino GRP durante la enfermedad respiratoria, y puesto que no se observaron cambios en la concentración de GRP durante la infección, se decidió estudiar la expresión génica del receptor GRPR.

Se cuantificó la expresión de mRNA de GRPR en tejido pulmonar de rata mediante qRT-PCR, normalizado a gen de actina, a distintos tiempos de la infección. Se observó un incremento de 7,2 veces en los niveles de expresión de mRNA en el grupo con infección en el día 75 con respecto al grupo control para ese mismo día. Este aumento fue estadísticamente significativo. Adicionalmente, se encontró un aumento estadísticamente significativo en la expresión de mRNA de GRPR en el día 75 con respecto al día 45 de infección (Figura 15).

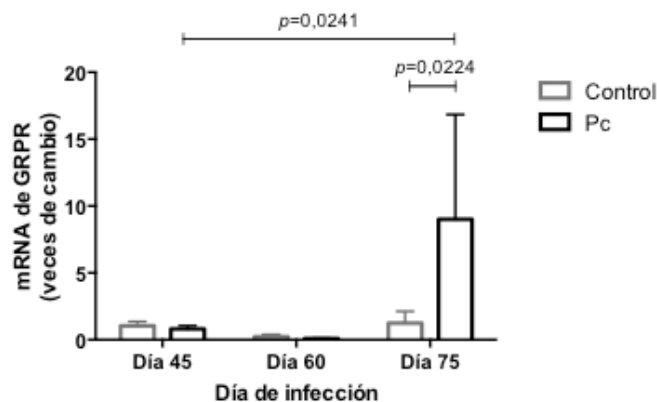


Figura N°15. Niveles de expresión de mRNA de GRPR

Se cuantificaron los niveles de mRNA de GRPR normalizados a gen de actina en tejido pulmonar procedente de ratas control y con infección, a distintos tiempos de infección, mediante qRT-PCR. n= 2-4. Los datos son presentados como veces de cambio en relación al promedio del grupo control. Para cada grupo se muestra promedio + SD.

VI. DISCUSIÓN

El sistema neuroendocrino pulmonar se ha vinculado a la respuesta patológica de la vía aérea durante algunas enfermedades pulmonares, en este sentido, podría relacionarse con la patogenia de la infección respiratoria, particularmente con la infección por *Pneumocystis*. En este contexto, los principales hallazgos de este estudio son: presencia de hiperplasia e hipertrofia de grupos de células inmunorreactivas a CGRP, indicadoras de NEBs, y aumento en la expresión génica de los neuropéptidos CGRP, GRP, y del receptor GRPR en un modelo de infección primaria por *Pneumocystis* en ratas inmunocompetentes.

Estos resultados indican que la infección por *Pneumocystis* se asociaría a hiperplasia de NEBs en el epitelio de la vía aérea, lo que es concordante con hallazgos de investigaciones llevadas a cabo en neumonía intersticial idiopática, displasia broncopulmonar, modelos de hiperreactividad bronquial y en infección [Ito *et al.*, 2002, Johnson *et al.*, 1993, Zhou *et al.*, 2011, Yancheva *et al.*, 2015]. Algunos estudios asocian la hiperplasia de estas células con inflamación y reparación del daño en la vía aérea [Yancheva *et al.*, 2015, Sunday *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 2011, Ashour *et al.*, 2006], sugiriendo que estas células podrían formar parte de la respuesta inflamatoria durante la infección, y de la reparación tisular posterior.

Los valores de densidad de NEBs obtenidos en la vía aérea fueron similares a los encontrados por otra investigación [Reynolds *et al.*, 2000], mientras que los valores de densidad de PNECs fueron superiores a los reportados en la literatura [Hong *et al.*, 2001, Reynolds *et al.*, 2000]. No obstante lo anterior, el estudio morfológico reportado en la literatura ha sido realizado siguiendo diferentes métodos, lo cual dificulta la comparación de resultados. La mayor densidad de NEBs se observó en el día 75 de infección, día en que se observa la mayor carga de *P. carinii*, y los mayores cambios patológicos asociados a la infección primaria, como infiltrados peribronquiales y perivasculares, incremento en el grosor epitelial, aumento en el contenido de mucus en el epitelio, y depósitos de reticulina y colágeno (manuscrito en preparación). Adicionalmente, se observó un incremento progresivo en la densidad de NEBs, desde el día 45 hacia el día 75 de infección, que también se relaciona con el incremento progresivo de la carga de *P. carinii* y de los

cambios mencionados en el pulmón. Esto sugiere que las células neuroendocrinas podrían ser inducidas a incrementar su número por algún mediador que conforme parte de la respuesta del hospedero frente a la infección, por ejemplo, un mediador de la inflamación, tal como ha sido demostrado en líneas celulares neuroendocrinas mediante estímulo con TNF α [Haley *et al.*, 1998] y, además, estas células podrían ejercer alguna función durante la infección, como mediadoras de la inflamación, broncoconstricción, o durante la reparación posterior [Zhou *et al.*, 2011, Ashour *et al.*, 2006, Subramaniam *et al.*, 2003].

Si bien se observó hiperplasia de NEBs durante la infección, no se observaron cambios en la densidad de PNECs, sugiriendo que son los NEBs quienes podrían formar parte de la patogenia de la infección respiratoria. Esto constituye un aspecto relevante, dado que los NEBs poseen funciones como quimiorreceptores en la vía aérea, gracias a que estas estructuras se encuentran inervadas y poseen un sistema sensor de oxígeno, que responde a la hipoxia secretando aminas y péptidos [Colebrooke *et al.*, 2002, Fu *et al.*, 2002, Fu *et al.*, 2000, Van Lommel *et al.*, 1998].

La vía aérea se divide en segmentos que incrementan progresivamente su diámetro transversal total hacia la periferia pulmonar, donde se localizan los bronquiolos terminales y respiratorios, confiriéndole a los distintos segmentos de la vía diferentes características fisiológicas [van den Berge *et al.*, 2011], que determinan finalmente la respuesta fisiopatológica. Dada la importancia fisiológica propia de cada segmento, se decidió estudiar la densidad de células neuroendocrinas por segmento. De esta manera, se observó hiperplasia de NEBs en la vía aérea pequeña, no así, en la vía aérea mayor, por lo tanto, la vía aérea pequeña es la que principalmente contribuyó a la hiperplasia de NEBs. Este hallazgo es de gran importancia debido a la notable contribución de los cambios que ocurren en la vía aérea distal, a la expresión clínica de la enfermedad respiratoria, principalmente, a la obstrucción bronquiolar.

La hipertrofia celular ha sido considerada un indicador de incremento en la actividad secretora celular [Homer *et al.*, 2002], sin embargo, en el caso de los quimiorreceptores, específicamente en el caso de los NEBs, esta hipertrofia podría considerarse como un indicador de hipoxia [Cutz *et al.*, 2007]. Los resultados de esta

tesis muestran hipertrofia de NEBs, que fue significativa en el día 60 de infección. Este hallazgo coincide con reportes de hipertrofia de NEBs en síndrome infantil de muerte súbita, donde este cambio morfológico es vinculado a una falla en los sensores de oxígeno [Cutz et al., 2007]. Así, la hipertrofia observada en esta tesis podría vincularse, eventualmente, a hipoxia durante la infección primaria por *Pneumocystis*.

La hipoxemia es una variable fisiopatológica frecuente durante la neumonía por *Pneumocystis* en inmunosuprimidos [Fatti et al., 2006], sin embargo no existen estudios publicados que demuestren la presencia de hipoxia tisular durante la infección por *Pneumocystis* en inmunocompetentes. Por lo tanto, sería de gran relevancia complementar estos hallazgos con la determinación de la presencia de marcadores de hipoxia tisular, como los factores HIF (Hypoxic-inducible factor), HIF-1 α y HIF-2 α , con el objetivo de profundizar el estudio de este aspecto durante la infección primaria. Este tópico reviste importancia, por un lado, por el daño tisular asociado a la hipoxia, y por otro, porque HIF podría tener un rol como mediador de la inflamación y edema, tal como lo señalan estudios realizados en modelo animal de injuria pulmonar aguda y de inflamación alérgica de la vía aérea [Tang et al., 2014, Huerta-Yepez et al., 2011]. En apoyo a lo anterior, se ha observado un incremento de los niveles de HIF-1 α y HIF-2 α en personas asmáticas expuestas a alérgeno [Huerta-Yepez et al., 2011]. HIF-1 α también ha sido vinculado a hiperplasia de células caliciformes y secreción de mucinas *in vitro*. Cabe señalar que el método de medición de tamaño de NEBs utilizado en esta tesis difiere del reportado en la literatura, el cual es realizado mediante la cuantificación del área de cada NEB [Cutz et al., 2007], pero este método no fue usado debido a las dificultades encontradas para trazar los límites de los NEBs en el epitelio, resultando más reproducible la medición de altura de cada NEB.

El incremento en la densidad y tamaño de NEBs observado en esta tesis justifica la descripción de la densidad de inervación de estos NEBs, no sólo por la relación entre estas dos estructuras, NEBs y fibras nerviosas [Van Genechten et al., 2004], sino también porque se ha descrito un aumento de nervios inmunorreactivos a sustancia P durante la infección por VRS [Dakhama et al., 2005]. Sin embargo, las

condiciones metodológicas utilizadas en esta tesis no permitieron la visualización de nervios inmunorreactivos a sustancia P. El estudio de un mayor número de cortes histológicos por rata que los usados en esta tesis podría haber facilitado la visualización de fibras nerviosas, dado que la densidad de estas estructuras es muy baja [Van Genechten *et al.*, 2004]. En este sentido, la utilización de inmunofluorescencia indirecta sumada a microscopía confocal, podrían permitir la visualización de fibras nerviosas, sin embargo, estas técnicas no fueron realizadas en este trabajo de tesis debido a la necesidad de tejido congelado, del cual no se dispuso. Por otra parte, se ha reportado en la literatura la presencia de células epiteliales inmunorreactivas a sustancia P, aunque esta marca parece ser de muy baja intensidad [Dakhama *et al.*, 2005]. Sin embargo, en esta tesis no se observó marca epitelial de sustancia P, sólo se apreció un marca en el epitelio de la vía aérea de baja intensidad pero inespecífica. Así, mayores estudios son necesarios para determinar la densidad de inervación de los NEBs durante la infección por *Pneumocystis*.

El incremento en la densidad de células inmunorreactivas a CGRP observado también indicó un aumento en los niveles del neuropéptido CGRP durante la infección por *P. carinii* en el día 75 de infección, aunque estos niveles no fueron determinados mediante técnicas cuantitativas. El resultado es coincidente con estudios que han mostrado mayores niveles de este péptido en modelos de injuria pulmonar e hiperreactividad en la vía aérea [Wu *et al.*, 2007, Aoki-Nagase *et al.*, 2002], notablemente, en modelos de enfermedad que se caracterizan por una respuesta inmune predominantemente tipo Th2, similar a lo que ocurriría con la respuesta inmune durante la infección por *Pneumocystis* [Swain *et al* 2012]. Más aún, CGRP induce diferenciación de linfocitos hacia células Th2 [Wu *et al.*, 2007, Aoki-Nagase *et al.*, 2002]. Contrario a lo señalado, un estudio desarrollado en modelo de infección por VRS en ratones mostró una reducción en los niveles de CGRP [Dakhama *et a.*, 2005]. Considerando que el tipo de respuesta inmune en la infección por VRS también se caracteriza por ser de tipo Th2, podrían haber otros factores que expliquen esta diferencia.

Puesto que se ha demostrado que CGRP induce inflamación e indirectamente broncoconstricción [Mikami *et al.*, 2013, Tokoyoda *et al.*, 2004, Springer *et al.*, 2004], los resultados obtenidos sugieren que este péptido podría tener un rol durante la infección pulmonar. Además de los niveles peptídicos, se observó un incremento en los niveles de mRNA de CGRP durante la infección por *Pneumocystis*, sugiriendo que uno de los mecanismos que explicaría el aumento en los niveles del péptido sería la inducción de la expresión génica de CGRP durante la infección. No obstante lo anterior, hasta la fecha no se conocen los mecanismos que regulan la transcripción del gen de CGRP en el pulmón, por lo tanto, sería de gran importancia dilucidar estos mecanismos y determinar su relación con la infección.

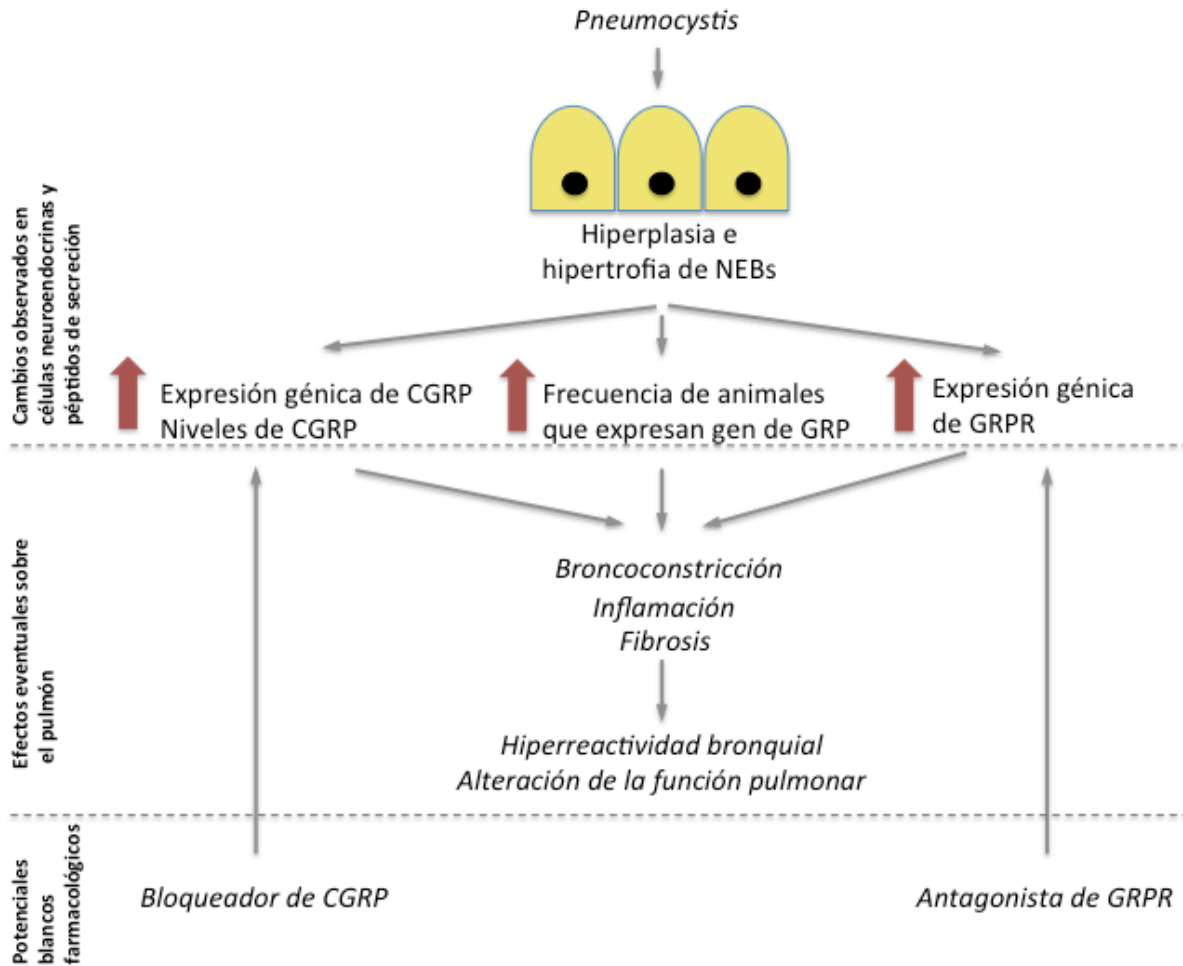
Otro neuropéptido importante en la patología de la enfermedad pulmonar es GRP, puesto que actúa como broncoconstrictor [Zhou *et al.*, 2011], mediador proinflamatorio [Subramaniam *et al.*, 2003] e inductor de fibrosis [Ashour *et al.*, 2006], no obstante, no se observaron cambios en la concentración de GRP en el pulmón durante la infección por *P. carinii*. Sin embargo, el mRNA de GRP fue más frecuentemente expresado en animales infectados, principalmente en el día 60 de infección, aunque estos niveles de expresión no lograron ser cuantificados, pese a haberse intentado mediante qRT-PCR. Esta dificultad podría haber estado relacionada a la baja abundancia de este mRNA en ratas adultas [Spindel *et al.*, 1987]. El resultado obtenido sugiere que los niveles peptídicos de GRP podrían ser regulados por otros mecanismos que no han sido descritos en la literatura y que no fueron investigados en este trabajo de tesis, por ejemplo, síntesis y degradación de GRP, sin embargo, este aspecto requiere más investigación.

A pesar de no haberse encontrado cambios en los niveles peptídicos de GRP en el tejido pulmonar, la expresión del gen del receptor GRPR se incrementó durante la infección por *Pneumocystis*, específicamente en el día 75 de infección. Dado que se ha observado un incremento en la expresión génica y activación del receptor GRPR en células del sistema inmune luego del estímulo con ozono [Zhou *et al.*, 2011], los resultados de esta tesis sugieren que el receptor GRPR podría estar implicado en la respuesta inflamatoria durante la infección respiratoria, sin embargo, mayores estudios son requeridos para determinar los niveles proteicos del receptor

GRPR, los mecanismos regulatorios que explican el aumento en la expresión del gen de GRPR, y la función de este receptor durante la infección.

Si bien en este trabajo de tesis se encontraron cambios en cuerpos neuroepiteliales, el péptido de secreción CGRP y el receptor GRPR, la función de estos elementos del sistema neuroendocrino pulmonar durante la infección por *Pneumocystis* debería ser estudiada. En este sentido, el uso de antagonistas de receptor de CGRP, como CGRP(8-37) [Dakhama *et al.*, 2002], bloqueadores de CGRP, como anticuerpos monoclonales anti-CGRP [Bowler *et al.*, 2013], o antagonistas de receptor GRPR [Dal-Pizzol *et al.*, 2006] podrían entregar evidencia al respecto. Por otro lado, la modulación de estos blancos farmacológicos podría favorecer la prevención o reducción de cambios patológicos durante la infección primaria por *Pneumocystis*. Finalmente, dado que el estudio de los cambios patológicos durante la infección primaria por *Pneumocystis* en humanos se encuentra en investigación, la utilidad eventual de la modulación farmacológica del sistema neuroendocrino pulmonar durante esta infección en humanos debería ser considerada.

En conclusión, los resultados de esta tesis muestran que la infección primaria por *Pneumocystis* en ratas inmunocompetentes se asocia a estímulo del sistema neuroendocrino pulmonar, expresado como hiperplasia e hipertrofia de grupos de células inmunorreactivas a CGRP, indicadoras de NEBs, aumento en la frecuencia de animales que expresan mRNA de GRP, y aumento en la expresión génica de CGRP y del receptor GRPR. Estos resultados sugieren que las células neuroendocrinas pulmonares, sus péptidos de secreción y/o sus receptores podrían contribuir a la patogenia de la infección primaria por *Pneumocystis carinii* en inmunocompetentes. El péptido de secreción CGRP y el receptor GRPR podrían tener un importante rol en la respuesta broncoconstrictora, inflamación y reparación o remodelación tisular durante y posterior a la infección. Sin embargo, la función de estas células, de sus péptidos de secreción y/o receptores durante la infección debe ser estudiada. Aún así, estos péptidos y/o sus receptores surgen como posibles blancos terapéuticos, que podrían cobrar relevancia durante la infección respiratoria (Resumen gráfico).



Resumen gráfico. Cambios observados en el sistema neuroendocrino pulmonar asociados a la infección primaria por *Pneumocystis carinii* en ratas inmunocompetentes, su posible impacto en la patogenia de la infección en el hospedero, y eventuales blancos de acción farmacológica. La infección primaria por *Pneumocystis carinii* se asocia a hiperplasia e hipertrofia de grupos de células inmunorreactivas a CGRP, indicadoras de NEBs, aumento en la frecuencia de animales que expresan el gen de GRP, y aumento en la expresión génica de CGRP y del receptor GRPR. Tanto los NEBs, su péptido de secreción CGRP como el receptor GRPR podrían contribuir a la inflamación y broncoconstricción, y consecuentemente a la hiperreactividad de la vía aérea observada durante la infección por *Pneumocystis*. Adicionalmente, CGRP y/o el receptor GRPR podrían participar en la remodelación durante y posterior a la infección. Así, estos dos blancos moleculares serían susceptibles de ser modulados farmacológicamente, específicamente, mediante el uso de un bloqueador de CGRP o un antagonista de GRPR.

VII. REFERENCIAS

- Adriaensen, D.; Timmermans, J.P.; Brouns, I.; Berthoud, H.R.; Neuhuber, W.L. and Scheuermann, D.W. "Pulmonary intraepithelial vagal nodose afferent nerve terminals are confined to neuroepithelial bodies: an anterograde tracing and confocal microscopy study in adult rats". *Cell Tissue Res.* 293: 395–5, 1998.
- Aguayo, S.M.; King, T.E. Jr.; Waldron, J.A. Jr.; Sherritt, K.M.; Kane, M.A. and Miller, Y.E. "Increased pulmonary neuroendocrine cells with bombesin-like immunoreactivity in adult patients with eosinophilic granuloma". *J Clin Invest.* 86: 838-44, 1990.
- An, C.L.; Gigliotti, F and Harmsen, A.G. "Exposure of immunocompetent adult mice to *Pneumocystis carinii* f. sp. muris by cohousing: growth of *P. carinii* f. sp. muris and host immune response". *Infect Immun.* 71: 2065-70, 2003.
- Aoki-Nagase, T.; Nagase, T.; Oh-Hashi, Y.; Shindo, T.; Kurihara, Y.; Yamaguchi, Y.; *et al.* "Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283: L963-70, 2002.
- Ashour, K.; Shan, L.; Lee, J.H.; Schlicher, W.; Wada, K.; Wada, E.; *et al.* "Bombesin inhibits alveolarization and promotes pulmonary fibrosis in newborn mice". *Am J Respir Crit Care Med.* 173: 1377-85, 2006.
- Atzori, C.; Aliouat, E.M.; Bartlett, M.S.; Dujardin, L.; Cargnel, A. and Dei-Cas, E. "Current *in vitro* culture systems for *Pneumocystis*". *FEMS Immunol Med Microbiol.* 22: 169-72, 1998.
- Bédard, T.; Mountney, C.; Kent, P.; Anisman, H. and Merali, Z. "Role of gastrin-releasing peptide and neuromedin B in anxiety and fear-related behavior". *Behav Brain Res.* 179: 133-40, 2007.
- Bowler, K.E.; Worsley, M.A.; Broad, L.; Sher, E.; Benschop, R.; Johnson, K.; *et al.* "Evidence for anti-inflammatory and putative analgesic effects of a monoclonal antibody to calcitonin gene-related peptide". *Neuroscience.* 228: 271-82, 2013.
- Brouns, I.; Oztay, F.; Pintelon, I.; De Proost, I.; Lembrechts, R.; Timmermans, J.P.; *et al.* "Neurochemical pattern of the complex innervation of neuroepithelial bodies in mouse lungs". *Histochem Cell Biol.* 131: 55–74, 2009.
- Cadieux, A.; Monast, N.P.; Pomerleau, F.; Fournier, A. and Lanoue, C. "Bronchoprotector properties of calcitonin gene-related peptide in guinea pig and human airways. Effect of pulmonary inflammation". *Am J Respir Crit Care Med.* 159: 235-43, 1999.
- Chabé, M.; Dei-Cas, E.; Creusy, C.; Fleurisse, L.; Respaldiza, N.; Camus, D.; *et al.* "Immunocompetent hosts as a reservoir of *pneumocystis* organisms: histological and RT-PCR data demonstrate active replication". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 23: 89-97, 2004.
- Champion, H.C.; Bivalacqua, T.J.; Toyoda, K.; Heistad, D.D.; Hyman, A.L. and Kadowitz, P.J. "*In vivo* gene transfer of prepro-calcitonin gene-related peptide to the lung attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in the mouse". *Circulation.* 101: 923-30, 2000.
- Colebrooke, R.L.; Smith, I.F.; Kemp, P.J. and Peers, C. "Chronic hypoxia remodels voltage-gated Ca²⁺ entry in a human airway chemoreceptor cell line". *Neurosci Lett.* 318: 69–72, 2002.
- Cornelio, D.B.; Roesler, R. and Schwartzmann, G. "Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy". *Ann Oncol.* 18: 1457-66, 2007.

Cushion, M.T. and Stringer, J.R. "Stealth and opportunism: alternative lifestyles of species in the fungal genus *Pneumocystis*". *Annu Rev Microbiol.* 64: 431-52, 2010.

Cutz, E.; Perrin, D.G.; Pan, J.; Haas, E.A. and Krous, H.F. "Pulmonary neuroendocrine cells and neuroepithelial bodies in sudden infant death syndrome: potential markers of airway chemoreceptor dysfunction". *Pediatr Dev Pathol.* 10: 106-16, 2007.

Czepielewski, R.S.; Porto, B.N.; Rizzo, L.B.; Roesler, R.; Abujamra, A.L.; Pinto, L.G.; et al. "Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 547-52, 2012.

Dakhama, A.; Kanehiro, A.; Mäkelä, M.J.; Loader, J.E.; Larsen, G.L. and Gelfand, E.W. "Regulation of airway hyperresponsiveness by calcitonin gene-related peptide in allergen sensitized and challenged mice". *Am J Respir Crit Care Med.* 165: 1137-44, 2002.

Dakhama, A.; Park, J.W.; Taube, C.; El Gazzar, M.; Kodama, T.; Miyahara, N.; et al. "Alteration of airway neuropeptide expression and development of airway hyperresponsiveness following respiratory syncytial virus infection". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288: L761-70, 2005.

Dal-Pizzol, F.; Di Leone, L.P.; Ritter, C.; Martins, M.R.; Reinke, A.; Pens Gelain, D.; et al. "Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis". *Am J Respir Crit Care Med.* 173: 84-90, 2006.

Dumoulin, A.; Mazars, E.; Seguy, N.; Gargallo-Viola, D.; Vargas, S.; Cailliez, J.C.; et al. "Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19: 671-8, 2000.

Emanuel, R.L.; Torday, J.S.; Mu, Q.; Asokanathan, N.; Sikorski, K.A. and Sunday, M.E. "Bombesin-like peptides and receptors in normal fetal baboon lung: roles in lung growth and maturation". *Am J Physiol.* 277: L1003-L17, 1999.

Fatti, G.L.; Zar, H.J. and Swingler, G.H. "Clinical indicators of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) in South African children infected with the human immunodeficiency virus". *Int J Infect Dis.* 10: 282-5, 2006.

Fu, X.W.; Nurse, C.A.; Wong, V. and Cutz, E. "Hypoxia-induced secretion of serotonin from intact pulmonary neuroepithelial bodies in neonatal Rabbit". *J Physiol.* 539: 503-10, 2002.

Fu, X.W.; Wang, D.; Nurse, C.A.; Dinauer, M.C. and Cutz, E. "NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: Evidence from K⁺current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice". *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 4374-79, 2000.

Furlong, S.T.; Koziel, H.; Bartlett, M.S.; McLaughlin, G.L.; Shaw, M.M. and Jack, R.M. "Lipid transfer from human epithelial cells to *Pneumocystis carinii* *in vitro*". *J Infect Dis.* 175: 661-8, 1997.

Gigliotti, F.; Harmsen, A.G. and Wright, T.W. "Characterization of transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* through immunocompetent BALB/c mice". *Infect Immun.* 71: 3852-6, 2003.

Guha, A.; Vasconcelos, M.; Cai, Y.; Yoneda, M.; Hinds, A.; Qian, J.; et al. "Neuroepithelial body microenvironment is a niche for a distinct subset of Clara-like precursors in the developing airways". *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 12592-7, 2012.

Haley, K.J.; Patidar, K.; Zhang, F.; Emanuel, R.L. and Sunday, M.E. "Tumor necrosis factor induces neuroendocrine differentiation in small cell lung cancer cell lines". *Am J Physiol.* 275: L311-21, 1998.

Hauser, P.M.; Burdet, F.X.; Cissé, O.H.; Keller, L.; Taffé, P.; Sanglard, D.; et al. "Comparative

genomics suggests that the fungal pathogen *pneumocystis* is an obligate parasite scavenging amino acids from its host's lungs". PLoS One. 5:e15152, 2010.

Hernandez-Novoa, B.; Bishop, L.; Logun, C.; Munson, P.J.; Elnekave, E.; Rangel, Z.G.; *et al.* "Immune responses to *Pneumocystis murina* are robust in healthy mice but largely absent in CD40 ligand-deficient mice". J Leukoc Biol. 84: 420-30, 2008.

Hogan, B.L. "Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many?" Development. 133: 2455-65, 2006.

Homer, R.J.; Zheng, T.; Chupp, G.; He, S.; Zhu, Z.; Chen, Q.; *et al.* "Pulmonary type II cell hypertrophy and pulmonary lipoproteinosis are features of chronic IL-13 exposure". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 283: L52-9, 2002.

Hong, K.; Reynolds, S.; Giangreco, A.; Hurley, Ch.M. and Strip, B.R. "Clara Cell Secretory Protein-Expressing Cells of the Airway Neuroepithelial Body Microenvironment Include a Label-Retaining Subset and Are Critical for Epithelial Renewal after Progenitor Cell Depletion". Am J Respir Cell Mol Biol. 24: 671-81, 2001.

Huerta-Yepey, S.; Baay-Guzman, G.J.; Bebenek, I.G.; Hernandez-Pando, R.; Vega, M.I.; Chi, L.; *et al.* "Hypoxia inducible factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis". Allergy. 66: 909-18, 2011.

Ito, T.; Ogura, T.; Ogawa, N.; Udaka, N.; Hayashi, H.; Inayama, Y.; *et al.* "Modulation of pulmonary neuroendocrine cells in idiopathic interstitial pneumonia". Histol Histopathol. 17: 1121-7, 2002.

Johnson, D.E.; Anderson, W.R. and Burke, B.A. "Pulmonary neuroendocrine cells in pediatric lung disease: alterations in airway structure in infants with bronchopulmonary dysplasia". Anat Rec. 236: 115-9, 1993.

Kawanami, Y.; Morimoto, Y.; Kim, H.; Nakamura, T.; Machida, K.; Kido, T.; *et al.* "Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of alveolar epithelial cells". Respir Res. 10: 1-8, 2009.

Kresse, A.; Jacobowitz, D.M. and Skofitsch, G. "Distribution of calcitonin gene-related peptide in the central nervous system of the rat by immunocytochemistry and in situ hybridization histochemistry". Ann N Y Acad Sci. 657: 455-7, 1992.

Lach, E.; Haddad, E.B. and Gies, J.P. "Contractile effect of bombesin on guinea pig lung *in vitro*: involvement of gastrin-releasing peptide-preferring receptors". Am J Physiol. 264: L80-6, 1993.

Larson, S.D.; Schelegle, E.S.; Hyde, D.M. and Plopper, Ch.G. "The three-dimensional distribution of nerves along the entire intrapulmonary airway tree of the adult rat and the anatomical relationship between nerves and neuroepithelial bodies". Am J Respir Cell Mol Biol. 28: 592-99, 2003.

Li, M.; Wetzel-Strong, S.E.; Hua, X.; Tilley, S.L.; Oswald, E.; Krummel, M.F.; *et al.* "Deficiency of RAMP1 attenuates antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice". PLoS One. 9: e102356, 2014.

Ma, W.; Dumont, Y.; Vercauteren, F. and Quirion, R. "Lipopolysaccharide induces calcitonin gene-related peptide in the RAW264.7 macrophage cell line". Immunology. 130: 399-409, 2010.

Martin, C.; Ullrich, V. and Uhlig, S. "Effects of the thromboxane receptor agonist U46619 and endothelin-1 on large and small airways". Eur Respir J. 16: 316-23, 2000.

Mikami, N.; Matsushita, H.; Kato, T.; Kawasaki, R.; Sawazaki, T.; Kishimoto, T.; *et al.* "Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell

functions". J Immunol. 186: 6886-93, 2011.

Mikami, N.; Miyagi, Y.; Sueda, K.; Takatsuji, M.; Fukada, S.; Yamamoto, H.; *et al.* "Calcitonin gene-related peptide and cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A pathway promote IL-9 production in Th9 differentiation process". J Immunol. 190: 4046-55, 2013.

Mikami, N.; Watanabe, K.; Hashimoto, N.; Miyagi, Y.; Sueda, K.; Fukada, S.; *et al.* "Calcitonin gene-related peptide enhances experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting Th17-cell functions". Int Immunol. 24: 681-91, 2012.

Montes-Cano, M.A.; Chabe, M.; Fontillon-Alberdi, M.; de-Lahorra, C.; Respaldiza, N.; Medrano, F.J.; *et al.* "Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans". Emerg Infect Dis. 15: 125-7, 2009.

Morris, A.; Scieurba, F.C.; Lebedeva, I.P.; Githaiga, A.; Elliott, W.M.; Hogg, J.C.; *et al.* "Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization". Am J Respir Crit Care Med. 170: 408-13, 2004.

Novak, J.; Escobedo-Morse, A.; Kelley, K.; Boose, D.; Kautzman-Eades, D.; Meyer, M.; *et al.* "Nicotine effects on proliferation and the bombesin-like peptide autocrine system in human small cell lung carcinoma SHP77 cells in culture". Lung Cancer. 29: 1-10, 2000.

Olivar, T.; Razzaque, Z.; Nwagwu, M. and Longmore, J. "Neurogenic vasodilation in rabbit basilar isolated artery: involvement of calcitonin-gene related peptide". Eur J Pharmacol. 395: 61-8, 2000.

Oliveira, P.G.; Grespan, R.; Pinto, L.G.; Meurer, L.; Brenol, J.C.; Roesler, R.; *et al.* "Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis". Arthritis Rheum. 63: 2956-65, 2011.

Oslund, K.L.; Hyde, D.M.; Putney, L.F.; Alfaro, M.F.; Walby, W.F.; Tyler, N.K.; *et al.* "Activation of calcitonin gene-related peptide receptor during ozone inhalation contributes to airway epithelial injury and repair". Toxicol Pathol. 37: 805-13, 2009.

Patel, O.; Shulkes, A. and Baldwin, G.S. "Gastrin-releasing peptide and cancer". Biochim Biophys Acta. 1766: 23-41, 2006.

Plummer, H.K. III.; Sheppard, B.J. and Schuller, H.M. "Interaction of tobacco-specific toxicants with nicotinic cholinergic regulation of fetal pulmonary neuroendocrine cells: implications for pediatric lung disease". Exp Lung Res. 26: 121-35, 2000.

Ponce, C.A.; Gallo, M.; Bustamante, R. and Vargas, S.L. "*Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population". Clin Infect Dis. 50: 347-53, 2010.

Reynolds, S.D.; Giangreco, A.; Power, J.H.T. and Stripp, B.R. "Neuroepithelial Bodies of Pulmonary Airways Serve as a Reservoir of Progenitor Cells Capable of Epithelial Regeneration". Am J Pathol. 156: 269-78, 2000.

Reynolds, S.D.; Hong, K.U.; Giangreco, A.; Mango, G.W.; Guron, Ch.; Morimoto, Y.; *et al.* "Conditional Clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 278: L1256-L63, 2000.

Rezin, G.T.; Petronilho, F.C.; Araújo, J.H.; Gonçalves, C.L.; Daufenbach, J.F.; Cardoso, M.R.; *et al.* "Gastrin-releasing peptide receptor antagonist or N-acetylcysteine combined with omeprazol protect against mitochondrial complex II inhibition in a rat model of gastritis". Basic Clin Pharmacol Toxicol. 108: 214-9, 2011.

Rochlitzer, S.; Veres, T.Z.; Kühne, K.; Prenzler, F.; Pilzner, C.; Knothe, S.; *et al.* "The neuropeptide

calcitonin gene-related peptide affects allergic airway inflammation by modulating dendritic cell function". Clin Exp Allergy. 41: 1609-21, 2011.

Rosenfeld, M.G.; Emeson, R.B.; Yeakley, J.M.; Merillat, N.; Hedjran, F.; Lenz, J.; et al. "Calcitonin gene-related peptide: a neuropeptide generated as a consequence of tissue-specific, developmentally regulated alternative RNA processing events". Ann N Y Acad Sci. 657: 1-17, 1992.

Sanchez, C.A.; Chabé, M.; Aliouat, el M.; Durand-Joly, I.; Gantois, N.; Conseil, V.; et al. "Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does". Med Mycol. 45: 701-7, 2007.

Schildgen, V.; Mai, S.; Khalfaoui, S.; Lüsebrink, J.; Pieper, M.; Tillmann, R.L.; et al. "*Pneumocystis jirovecii* can be productively cultured in differentiated CuFi-8 airway cells". MBio. 5: e01186-14, 2014.

Shan, L.; Aster, J.C.; Sklar, J. and Sunday, M.E. "Notch-1 regulates pulmonary neuroendocrine cell differentiation in cell lines and in transgenic mice". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 292: L500-9, 2007.

Shan, L.; Emanuel, R.L.; Dewald, D.; Torday, J.S.; Asokanathan, N.; Wada, K.; et al. "Bombesin-like peptide receptor gene expression, regulation, and function in fetal murine lung". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 286: L165-73, 2004.

Shipley, T.W.; Kling, H.M.; Morris, A.; Patil, S.; Kristoff, J.; Guyach, S.E.; et al. "Persistent *pneumocystis* colonization leads to the development of chronic obstructive pulmonary disease in a nonhuman primate model of AIDS". J Infect Dis. 202: 302-12, 2010.

Shriver, S.P.; Bourdeau, H.A.; Gubish, C.T.; Tirpak, D.L.; Davis, A.L.; Luketich, J.D.; et al. "Sex-specific expression of gastrin-releasing peptide receptor: relationship to smoking history and risk of lung cancer". J Natl Cancer Inst. 92: 24-33, 2000.

Siegfried, J.M.; DeMichele, M.A.; Hunt, J.D.; Davis, A.G.; Vohra, K.P. and Pilewski, J.M. "Expression of mRNA for gastrin-releasing peptide receptor by human bronchial epithelial cells. Association with prolonged tobacco exposure and responsiveness to bombesin-like peptides". Am J Respir Crit Care Med. 156: 358-66, 1997.

Spindel, E.R.; Sunday, M.E.; Hofler, H.; Wolfe, H.J.; Habener, J.F. and Chin, W.W. "Transient elevation of messenger RNA encoding gastrin-releasing peptide, a putative pulmonary growth factor in human fetal lung". J Clin Invest. 80: 1172-9, 1987.

Springall, D.R. and Polak, J.M. "Quantitative microscopical methods for the identification and localisation of nerves and neuroendocrine cell markers in mammalian lung". Microsc Res Tech. 37: 92-100, 1997.

Springer, J.; Amadesi, S.; Trevisani, M.; Harrison, S.; Dinh, Q.T.; McGregor, G.P.; et al. "Effects of alpha calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery". Regul Pept. 118: 127-34, 2004.

Springer, J.; Geppetti, P.; Fischer, A. and Groneberg, D.A. "Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator". Pulm Pharmacol Ther. 16: 121-30, 2003.

Subramaniam, M.; Sugiyama, K.; Coy, D.H.; Kong, Y.; Miller, Y.E.; Weller, P.F.; et al. "Bombesin-like peptides and mast cell responses: relevance to bronchopulmonary dysplasia?" Am J Respir Crit Care Med. 168: 601-11, 2003.

Sunday, M.E.; Shan, L. and Subramanian, M. "Immunomodulatory functions of the diffuse neuroendocrine system: implications for bronchopulmonary dysplasia". Endocr Pathol. 15: 91-106,

2004.

Sunday, M.E.; Yoder, B.A.; Cuttita, F.; *et al.* "Bombesin –like peptide mediates lung injury in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia". J Clin Invest. 102: 584-94, 1998.

Swain, S.D.; Meissner, N.; Han, S. and Harmsen, A. "*Pneumocystis* infection in an immunocompetent host can promote collateral sensitization to respiratory antigens". Infect Immun. 79: 1905-14, 2011.

Swain, S.D.; Meissner, N.N.; Siemsen, D.W.; McInnerney, K. and Harmsen, A.G. "*Pneumocystis* elicits a STAT6-dependent, strain-specific innate immune response and airway hyperresponsiveness". Am J Respir Cell Mol Biol. 46: 290-8, 2012.

Tang, M.; Tian, Y.; Li, D.; Lv, J.; Li, Q.; Kuang, C.; *et al.* "TNF- α mediated increase of HIF-1 α inhibits VASP expression, which reduces alveolar-capillary barrier function during acute lung injury (ALI)". PLoS One. 9: e102967, 2014.

Tokoyoda, K.; Tsujikawa, K.; Matsushita, H.; Ono, Y.; Hayashi, T.; Harada, Y.; *et al.* "Up-regulation of IL-4 production by the activated cAMP/cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A) pathway in CD3/CD28-stimulated naive T cells". Int Immunol. 16: 643-53, 2004.

Van den Berge, M.; ten Hacken, N.H.; Cohen, J.; Douma, W.R. and Postma D.S. "Small airway disease in asthma and COPD: clinical implications". Chest. 139: 412-23, 2011.

Van Genechten, J.; Brouns, I.; Burnstock, G.; Timmermans, J.P. and Adriaensen, D. "Quantification of neuroepithelial bodies and their innervation in fawn-hooded and Wistar rat lungs". Am J Respir Cell Mol Biol. 30: 20-30, 2004.

Van Lommel, A. "Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB): chemoreceptors and regulators of lung development". Paediatr Respir Rev. 2: 171–76, 2001.

Van Lommel, A.; Bolle, T.; Fannes, W. and Lauweryns, J.M. "The pulmonary neuroendocrine system: The past decade". Arch Histol Cytol. 62: 1-16, 1999.

Van Lommel, A.; Lauweryns, J.M. and Berthoud, H.R. "Pulmonary neuroepithelial bodies are innervated by vagal afferent nerves: an investigation with *in vivo* anterograde Dil tracing and confocal microscopy". Anat Embryol. 197: 325–30, 1998.

Vargas, S.L.; Hughes, W.T.; Santolaya, M.E.; *et al.* "Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants". Clin Infect Dis. 32: 855–61, 2001.

Vargas, S.L.; Ponce, C.A.; Gallo, M.; Pérez, F.; Astorga, J.F.; Bustamante, R.; *et al.* "Near-universal prevalence of *Pneumocystis* and associated increase in mucus in the lungs of infants with sudden unexpected death". Clin Infect Dis. 56: 171-9, 2013.

Weichselbaum, M.; Sparrow, M.; Hamilton, E.; Thompson, P. and Knight, D. "A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium". Respir Res. 6: 115-25, 2005.

Wu, H.; Guan, C.; Qin, X.; Xiang, Y.; Qi, M.; Luo, Z.; *et al.* "Upregulation of substance P receptor expression by calcitonin gene-related peptide, a possible cooperative action of two neuropeptides involved in airway inflammation". Pulm Pharmacol Ther. 20: 513-24, 2007.

Xie, W.; Fisher, J.T.; Lynch, T.J.; Luo, M.; Evans, T.I.; Neff, T.L.; *et al.* "CGRP induction in cystic fibrosis airways alters the submucosal gland progenitor cell niche in mice". J Clin Invest. 121: 3144-58, 2011.

Yancheva, S.G.; Velani, A.; Rice, A.; Montero, A.; Hansell, D.M.; Koo, S.; *et al.* "Bombesin staining in neuroendocrine cell hyperplasia of infancy (NEHI) and other childhood interstitial lung diseases (chILD)". *Histopathology*. 2015.

Yeger, H.; Pan, J.; Fu, X.W.; Bear, C. and Cutz, E. "Expression of CFTR and Cl⁻ conductances in cells of pulmonary neuroepithelial bodies". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 281: L713–L721, 2001.

Zhou, S.; Nissao, E.; Jackson, I.L.; Leong, W.; Dancy, L.; Cuttitta, F.; *et al.* "Radiation-induced lung injury is mitigated by blockade of gastrin-releasing peptide". *Am J Pathol*. 182: 1248-54, 2013.

Zhou, S.; Potts, E.N.; Cuttitta, F.; Foster, W.M. and Sunday, M.E. "Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108: 2100-5, 2011.