

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Master Titulado:

“El rol de *Chlamydophila pneumoniae* en el cáncer de pulmón: una revisión sistemática”

Realizado por:

ERICK ESTEBAN PAREDES CEDEÑO

Directoras del proyecto:

Dra. Paula Solar, Ph.D.

Dámaris P. Intriago-Baldeón, MSc. & DIC.

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 8 de agosto de 2022

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, ERICK ESTEBAN PAREDES CEDEÑO, con cédula de identidad # 131338069-1, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual que correspondan relacionados a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



C.I: 131338069-1

FIRMA Y CÉDULA

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“El rol de *Chlamydomonas reinhardtii* en el cáncer de pulmón: una revisión sistemática”

Realizado por:

ERICK ESTEBAN PAREDES CEDEÑO

como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

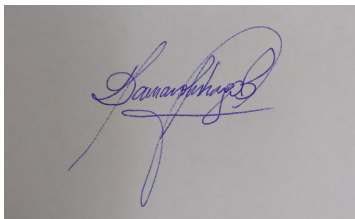
ha sido dirigido por

PAULA SOLAR

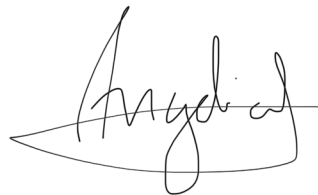
DÁMARIS P. INTRIAGO-BALDEÓN

quienes consideran que constituye un trabajo original de su autor

FIRMA



FIRMA



LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

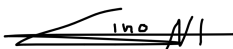
LINO ARISQUETA

MARBEL TORRES

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

el tribunal examinador

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lino Arisqueta', written over a horizontal line.

FIRMA

FIRMA

Quito, 8 de AGOSTO de 2022

DEDICATORIA

Dedicado a todas mis amistades y familiares que trabajan incansablemente por sus metas y sueños. También para todos los jóvenes científicos y profesores de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Internacional SEK.

AGRADECIMIENTO

A mis padres Miriam y Wilson por su inmenso apoyo desde el primer día, a mi pareja Andrea por ser una gran fuente de motivación, a mis tutoras Dámaris y Paula por su paciencia y excelente guía profesional y a mi persona por no rendirme a pesar que tuve mil razones para hacerlo.

Artículo de tesis

El rol de *Chlamydomphila pneumoniae* en el cáncer de pulmón: una revisión sistemática.

Erick Paredes Cedeño¹, Paula Solar (Tutora)^{2*}, Dámaris P. Intriago-Baldeón (Tutora)^{1,3*}

¹ Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK; eparedes.mbme@uisek.edu.ec; damaris.intriago@uisek.edu.ec.

² Instituto de Investigación Interdisciplinar en Ciencias Biomédicas, Universidad SEK Chile; paula.solar@zonavirtual.uisek.cl.

³ Grupo de Investigación en Biomedicina Experimental y Aplicada, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK; damaris.intriago@uisek.edu.ec.

* Autoras de Correspondencia: paula.solar@zonavirtual.uisek.cl; damaris.intriago@uisek.edu.ec.

Resumen: El cáncer de pulmón (CP) es el tipo de cáncer más mortal a nivel mundial. Por ello, esta enfermedad constituye un problema de salud global. Los factores de riesgo asociados al CP son principalmente el tabaquismo, la exposición a agentes carcinógenos presentes en el ambiente y la genética del paciente. Por otro lado, las infecciones bacterianas han demostrado ser un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer que requiere mayor atención. A pesar de que *Helicobacter pylori* es la única bacteria que ha sido categorizada como carcinógeno de grupo I, hay un listado amplio de bacterias que están asociadas a distintos tipos de cáncer. En el CP, *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*) es activamente estudiada y se ha documentado que una infección por *C. pneumoniae* es capaz de inducir la transformación de células sanas a tumorales en modelos *in vitro* e *in vivo*; sin embargo, el mecanismo molecular por el cual ocurre esta transformación celular ha sido escasamente estudiado. En el presente estudio, se realizó una revisión sistemática siguiendo la metodología PRISMA, con el fin de proponer un potencial mecanismo molecular por el cual *C. pneumoniae* induce la transformación de células pulmonares sanas a tumorales. Se encontró que el microARN miR-328 y la proteína quinasa RIPK3, moléculas que se encuentran relacionadas con el tipo de muerte celular denominado necroptosis, pueden ser moduladas durante una infección crónica causada por *C. pneumoniae*. Esto abre un potencial blanco para terapia molecular contra el CP que requiere mayor investigación.

Palabras clave: *Chlamydomphila pneumoniae*; cáncer de pulmón; transformación celular; revisión sistemática; modelo molecular.

Abstract: Lung cancer (LC) is the deadliest type of cancer and is therefore a global health problem. The risk factors for LC are mainly smoking, exposure to carcinogens in the environment, and the patient's genetics. On the other hand, bacterial infections have been shown to be a risk factor for the development of cancer that requires further attention. Although *Helicobacter pylori* is the only bacteria categorized as a group I carcinogen, there is a long list of bacteria that are associated with different types of cancer. In LC, *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*) is actively studied and it has been found that an infection by *C. pneumoniae* is capable of inducing cell transformation in *in vitro* and *in vivo* models. However, the molecular mechanism by which cell transformation occurs has been poorly studied. In the present study, a systematic review was carried out following the PRISMA methodology in order to propose a potential molecular mechanism by which *C. pneumoniae* can induce cell transformation of lung cells. It was found that the microRNA miR-328 and the protein kinase RIPK3, these molecules are related to a type of cell death known as necroptosis, can be modulated in a chronic infection by this pathogen. This opens a potential target for molecular therapy against LC that requires further investigation.

Keywords: *Chlamydomphila pneumoniae*; lung cancer; cell transformation; systematic literature review; molecular modeling.

1. Introducción.

El cáncer de pulmón (CP) es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de tumores malignos en el tejido pulmonar (American Cancer Society, 2019). Al CP, se lo puede clasificar en dos subtipos principales según su origen: CP de células pequeñas y CP de células no pequeñas. El CP de células no pequeñas puede ser clasificado en tres diferentes subtipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes (American Cancer Society, 2019). Alrededor del 80-85% de los casos de cáncer de pulmón son de células no pequeñas; por lo cual, éste es el tipo más común de CP a nivel mundial. Por otra parte, el porcentaje restante (20-15%) corresponde a casos de CPs de células pequeñas. El CP de células pequeñas tiende a crecer y diseminarse con mayor rapidez en el organismo del paciente (American Cancer Society, 2019).

El CP constituye la neoplasia maligna más letal a nivel mundial, tomando en cuenta datos de ambos sexos. En el año 2020, se registraron 9.894.402 muertes por cáncer en el mundo, de las cuales 1.796.144 (18.2%) fueron causadas por el CP. Por otro lado, el CP ocupa el segundo lugar en incidencia después del cáncer de mama a nivel mundial, tomando en cuenta datos de ambos sexos. De los 18.094.716 nuevos casos de cáncer que fueron documentados en el mundo en el año 2020, 2.206.771 (11.4%) correspondieron al CP (Ferlay *et al.*, 2020). En contraste, en Ecuador, el CP se comporta de manera distinta a nivel epidemiológico. De las 15.123 muertes que fueron registradas en el país en el año 2020, 1.069 (7.1%) fallecimientos fueron causados por el CP; por lo tanto, esta patología constituye el tercer cáncer más mortal a nivel nacional, detrás del cáncer de estómago y el cáncer de próstata. Por otra parte, de los 29.273 nuevos casos de cáncer que se registraron a nivel nacional en el año 2020, sólo 1.185 (4%) correspondieron al CP, convirtiéndolo en el cáncer que ocupa el noveno lugar en incidencia en el país (Sung *et al.*, 2020).

Existen diversos factores que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón en los pacientes. Malhotra *et al.* (2016) menciona que los principales factores de riesgo asociados al cáncer de pulmón a nivel mundial son:

- Genética: existencia de antecedentes familiares de esta enfermedad como la presencia de genes de alta penetrancia y polimorfismos genéticos.
- Tabaquismo.
- Dieta: El consumo excesivo de carnes fritas o a la parrilla aumenta la ingesta de carcinógenos como las nitrosaminas que se producen durante su cocción. Además, el consumo de alcohol en altas cantidades puede ser otro factor de riesgo; sin embargo, la información que existe sobre el tema y su relación con el CP sigue siendo controversial.
- Inflamación crónica por infección respiratoria.
- Exposición a radiación ionizante, exposiciones ocupacionales al asbesto, metales pesados, sílice, hidrocarburos aromáticos policíclicos, escape de diesel y la contaminación del aire.

Los tratamientos contra el CP son múltiples y se lo puede clasificar en tradicionales y de precisión. Dentro de los tratamientos tradicionales, se encuentran la extracción quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia. Por otra parte, los tratamientos de precisión involucran estrategias moleculares como los fármacos diseñados para un subtipo específico de CP y la inmunoterapia (Centers for Disease Control and Prevention, 2021). La aplicación de un tratamiento u otro depende del tipo histológico de CP a tratar, así como del estadio en el cual fue diagnosticado en el paciente. Para la estadificación del CP de células pequeñas, primero se usa el sistema internacional TNM; este sistema es usado para determinar el grado de propagación del cáncer en base al tamaño del tumor (T), los nodos linfáticos involucrados (N) y si el cáncer ha hecho metástasis (M). Posteriormente, se clasifica al cáncer detectado en uno de dos grupos: estadio limitado o estadio extendido. Por otra parte, para clasificar el estadio del CP de células no pequeñas también se usa el sistema TNM pero se le designa una de las 5 etapas que van del 0 al IV, siendo 0 una etapa temprana y IV una etapa avanzada (Bernstein, 2021). Para aquellos pacientes cuyo CP fue detectado en etapas tempranas, la resección quirúrgica es el tratamiento a elección. En pacientes con CP de células no pequeñas en estadios tempranos (mayormente en estadio II), se puede aplicar quimioterapia adyuvante luego de la resección quirúrgica (Hirsch *et al.*, 2016; Nasim *et al.*, 2019). A pacientes que no son candidatos para una resección quirúrgica, se puede administrar diversas estrategias terapéuticas como la radioterapia estereotáctica del cuerpo, la ablación tumoral percutánea y la ablación transbronquial por microondas (Nasim *et al.*, 2019). En pacientes con CP en estadio III, se pueden aplicar múltiples terapias como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Por otra parte, en pacientes con estadio IV, el tratamiento más común es la quimioterapia a base de platino con medicamentos como el cisplatino y el carboplatino.

Además de los tratamientos sistémicos, los tratamientos locales son necesarios en caso de obstrucciones pulmonares, ya que debido a que los focos metastásicos pueden causar sintomatología localizada (Nasim *et al.*, 2019). En los últimos años debido al creciente conocimiento molecular sobre los diferentes subtipos de CP, se han desarrollado fármacos para tratar pacientes con CP que presentan tumores con alteraciones moleculares específicas. Otra de las estrategias moleculares que se han desarrollado para tratar el CP es la inmunoterapia. Esta terapia se enfoca en un grupo de ligandos y receptores que inhiben o estimulan la actividad inmunológica (Hirsch *et al.*, 2016; Nasim *et al.*, 2019).

Las infecciones bacterianas crónicas son un importante factor de riesgo en el cáncer debido a los efectos que ejercen las bacterias en el ciclo celular, además de su capacidad de atacar el sistema inmune y causar inmunosupresión (Al-Hilu y Al-Shujairi, 2020). Se ha incrementado el interés por analizar a profundidad la relación bacteria-cáncer a partir del descubrimiento del potencial carcinogénico de la bacteria *Helicobacter pylori* en el contexto del cáncer gástrico y su clasificación como única bacteria en el grupo 1 de carcinógenos del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) (Hansen *et al.*, 2021; Premachandra & Jayaweera, 2022). La aplicación de tratamientos para erradicar a *H. pylori* ha demostrado ser efectiva en la prevención del cáncer gástrico (Sexton *et al.*, 2020). El listado de bacterias que están asociadas con el cáncer no es corto; estas bacterias han sido documentadas en distintas revisiones de literatura científica (Van Elsland y Neefjes, 2018; Al-Hilu y Al-Shujairi, 2020; Sheweita y Alsamghan, 2020; Hansen *et al.*, 2021). En este contexto, se ha descubierto que existe una relación entre la bacteria *Chlamydomphila pneumoniae* (*C. pneumoniae*) y el CP, la cual aún no está completamente dilucidada (Premachandra & Jayaweera, 2022).

C. pneumoniae es un patógeno bacteriano perteneciente al orden Chlamydiales. Este orden agrupa a diversas bacterias intracelulares obligadas que están presentes en parásitos de amebas, peces, reptiles, mamíferos y seres humanos. Una característica esencial que tienen en común todos los miembros de esta clase es su ciclo de desarrollo bifásico, único en el reino bacteriano, que alterna entre una forma infecciosa extracelular, no metabólica y altamente condensada, también conocida como el cuerpo elemental, y una forma intracelular transcripcionalmente activa, no infecciosa o cuerpo reticulado (Roulis *et al.*, 2013).

La mayoría de las personas están expuestas a *C. pneumoniae* a lo largo de su vida; esta bacteria infecta el tracto respiratorio de los seres humanos. A pesar de que la infección por *C. pneumoniae* es predominantemente asintomática o leve, puede resultar en el desarrollo de enfermedades agudas de las vías respiratorias como la bronquitis, la faringitis, la sinusitis y la neumonía. *C. pneumoniae* no solo está involucrada en la infección respiratoria, sino que también contribuye a la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias como la arterioesclerosis, la artritis, el asma, el cáncer de pulmón y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Adicionalmente, *C. pneumoniae* está relacionada con el desarrollo de trastornos neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y la esquizofrenia (Krull *et al.*, 2005; Porritt & Crother, 2016; Richard, 2018).

Varias revisiones sistemáticas de estudios clínicos han asociado a una infección por *C. pneumoniae* con el desarrollo del CP (Laurilla *et al.*, 1997; Hua-Feng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019). También, varios estudios de laboratorio han demostrado que una infección por *C. pneumoniae* induce carcinogénesis en modelos *in vitro* e *in vivo* (Chu *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*, 2014). Adicionalmente, en un estudio clínico realizado por Chu *et al.*, 2014, se evaluó el efecto de la infección por *C. pneumoniae* en pacientes con CP de células no pequeñas en estadio III-IV. Durante este estudio, se añadió la azitromicina, fármaco de primera línea contra *C. pneumoniae*, al tratamiento estándar de quimioterapia. Los resultados de esta investigación mostraron un mayor porcentaje de sobrevivencia de los pacientes en un año, del 45%, sin azitromicina, a un 75% con adición de azitromicina al tratamiento estándar. A pesar de la evidencia científica disponible, existe escasa información sobre el rol de una infección crónica por *C. pneumoniae* en el desarrollo del CP desde un enfoque molecular. Se ha documentado poca información sobre las posibles vías de señalización intracelular que son alteradas en las células hospederas durante una infección crónica por *C. pneumoniae* (Sheweita y Alsamghan, 2020; Hansen *et al.*, 2021).

El CP es un problema de salud global ya que constituye el tipo de cáncer más mortal a nivel mundial. Debido al origen multifactorial de esta enfermedad, su fisiopatología sigue en constante estudio (Ferlay *et al.*, 2020). A pesar de que existe evidencia científica que apunta a que una infección crónica por *C. pneumoniae* puede causar CP, aún se requiere dilucidar cuáles son los mecanismos moleculares que podrían inducir la transformación neoplásica de las células pulmonares infectadas por este patógeno. Una mayor comprensión sobre cómo una infección por *C. pneumoniae* influye en la etiología del CP podría aportar no solo conocimientos más detallados sobre este factor de riesgo, sino que también tiene el potencial de mejorar los sistemas de diagnóstico y las estrategias terapéuticas para los pacientes a largo plazo, ya que contribuirá al descubrimiento de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas. Además, se podrán potenciar los tratamientos existentes.

Este estudio provee conocimientos para establecer futuras investigaciones a nivel *in vitro* e *in vivo* que validen potenciales mecanismos moleculares que podrían inducir transformación neoplásica en células pulmonares infectadas

con *C. pneumoniae*. Asimismo, esta investigación propone un potencial mecanismo molecular de inducción del CP por una infección por *C. pneumoniae*, lo cual podría servir como guía para profundizar los conocimientos sobre la relación bacteria-cáncer en el contexto del CP.

La hipótesis de investigación fue: existen una o varias moléculas asociadas a una infección por *C. pneumoniae* que tienen un rol en la inducción de la transformación de células pulmonares sanas a tumorales .

2. Materiales y Métodos.

2.1 Tipo de estudio.

La presente investigación es una revisión sistemática. Este tipo de investigación evalúa e interpreta los resultados de investigaciones disponibles sobre un tema puntual de interés mediante métodos rigurosos, confiables, sistemáticos y repetibles (Purssell & McCrae, 2020).

2.2 Metodología empleada para realizar la revisión sistemática.

En este estudio, se utilizó la metodología llamada PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses) (Yepes-Núñez *et al.*, 2021). La pregunta de investigación que se planteó fue la siguiente:

¿Cuál es el mecanismo molecular mediante el cual una infección por *C. pneumoniae* podría inducir la transformación de células pulmonares sanas a tumorales ?

2.3 Criterios de elegibilidad de estudios.

2.3.1 Criterios de inclusión de estudios.

En la presente revisión sistemática, se incluyeron estudios primarios que abordan aspectos de la investigación molecular y/o de laboratorio sobre el rol de *C. pneumoniae* en el CP. Se seleccionaron estudios que fueron publicados en idioma inglés y se delimitó una ventana de tiempo de 20 años (desde el año 2002 al año 2022).

2.3.2 Criterios de exclusión de estudios.

No se incluyeron revisiones sistemáticas, meta-análisis, revisiones de literatura, cartas al editor, actas de conferencia, ni capítulos de libros del mismo periodo de tiempo mencionado anteriormente.

2.4 Estrategias de búsqueda de estudios.

La búsqueda de estudios se realizó en las librerías digitales PubMed y Google Scholar. Las palabras clave que fueron utilizadas durante la búsqueda de estudios en las librerías mencionadas fueron: “chlamydia pneumoniae”, “chlamydomydia pneumoniae” y “lung cancer”. Al momento de la búsqueda, se emplearon algoritmos que permitieron identificar estudios que incluían estos términos en su título, palabras clave y/o resumen.

En PubMed, se utilizó el siguiente algoritmo de búsqueda : (“chlamydia pneumoniae”[Title/Abstract] OR “chlamydomydia pneumoniae”[Title/Abstract]) AND “lung cancer”[Title/Abstract]) AND (2002:2022[ptat]).

Por otro lado, en Google Scholar, se empleó el siguiente algoritmo de búsqueda: AND “chlamydia pneumoniae” OR “chlamydomydia pneumoniae” “lung cancer” -“systematic review” -“meta analysis” -“review”-“chapter”.

2.5 Proceso de selección de estudios.

Los estudios que forman parte de esta investigación fueron identificados y seleccionados siguiendo las recomendaciones del diagrama de flujo PRISMA 2020 mencionadas en Yepes-Núñez *et al.*, 2021.

2.6 Proceso de recolección de datos.

La recolección de datos se realizó mediante un análisis exhaustivo de los estudios seleccionados, en el cual se identificaron todas las potenciales moléculas que permitirían proponer un modelo molecular que explique cómo una

infección por *C. pneumoniae* podría inducir la transformación de células pulmonares sanas a tumorales. Estos datos fueron recopilados en tablas que son descritas en la sección Resultados.

2.7 Proceso de análisis de datos.

Las moléculas encontradas en los estudios seleccionados fueron analizadas usando la base de datos KEGG pathway. Esta base de datos está formada por una recopilación de mapas de vías de transducción de señales dibujadas a mano que representan el conocimiento actual sobre las redes de interacción, reacción y relación molecular para: metabolismo, procesamiento de información genética, tratamiento de la información ambiental, procesos celulares, sistemas de organismos, enfermedades humanas y desarrollo de fármacos (KEGG pathway, 2022). Dado que el objetivo de esta investigación fue proponer un mecanismo molecular por el cual una infección por *C. pneumoniae* podría causar la transformación de células pulmonares sanas a tumorales, se buscaron rutas de transducción de señales que incluyeran a varias de las moléculas identificadas y que además estuvieran relacionadas con el desarrollo del cáncer.

2.8 Riesgos del estudio.

Durante la ejecución de esta revisión sistemática, existieron diversos riesgos. Uno de ellos fue la no disponibilidad de un estudio primario seleccionado. Para contrarrestar este problema, se contactó directamente a los autores del estudio para solicitarles una copia del artículo científico que describe los resultados de esa investigación. Otro riesgo asociado a esta investigación fue la selección de estudios de baja calidad. Para reducir estos riesgos, se aplicaron ciertas técnicas para minimizar los sesgos, como el uso de la literalidad y la validez interna de los estudios seleccionados. Se tomaron en cuenta el número de citas y el cuartil de las revistas científicas en las cuales estos estudios fueron publicados.

2.9 Evaluación de la calidad de la revisión sistemática.

Purssell & McCrae (2020) mencionan que para evaluar la calidad de una revisión sistemática, se deben considerar tres aspectos importantes como: la calidad del reporte, la calidad metodológica de los estudios seleccionados y el riesgo de sesgo. Se aplicaron los protocolos establecidos en el modelo PRISMA 2020 para garantizar la calidad del reporte de la revisión sistemática (Yepes-Núñez *et al.*, 2021).

3. Resultados.

En esta sección, se muestra una síntesis de los resultados más relevantes de los siete estudios seleccionados para la elaboración de esta revisión sistemática. Primero, se realizó una caracterización y categorización de los estudios seleccionados. Posteriormente, se extrajeron los principales datos de las investigaciones seleccionadas, con el fin de proponer un mecanismo molecular que podría inducir la transformación de células pulmonares infectadas por *C. pneumoniae* a células tumorales.

Sección 1: Examinación de la evidencia científica.

Caracterización y categorización de los estudios científicos.

Los resultados de la aplicación de la metodología PRISMA (Yepes-Núñez *et al.*, 2021) se detallan en la **Figura 1**. Por otra parte, la **Tabla 1** muestra los datos más importantes de las investigaciones científicas que fueron seleccionadas para el desarrollo de esta revisión sistemática. Se observó que las investigaciones que se enfocaron en una infección por *C. pneumoniae* y su rol en el CP datan de años recientes, ya que el estudio más antiguo fue publicado en el año 2014. Es importante destacar que, de los 7 estudios seleccionados, 5 de ellos fueron publicados en revistas científicas de alto impacto, es decir, revistas que pertenecen a los cuartiles Q1 (n = 1) y Q2 (n = 4), según el ranking SCImago (SCImago, 2022). Los 2 estudios restantes fueron publicados en revistas científicas que pertenecen a los cuartiles Q3 (n = 1) y Q4 (n = 1). Por otra parte, las investigaciones científicas seleccionadas se categorizaron por el tipo de estudio que abarcan. De los 7 estudios científicos, 4 son bioinformáticos, 2 son ensayos que abarcan modelos ya sea *in vitro*, *in vivo* o ambos y 1 estudio es de tipo caso-control.

Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA para la identificación y selección de estudios primarios relacionados con la problemática de investigación.

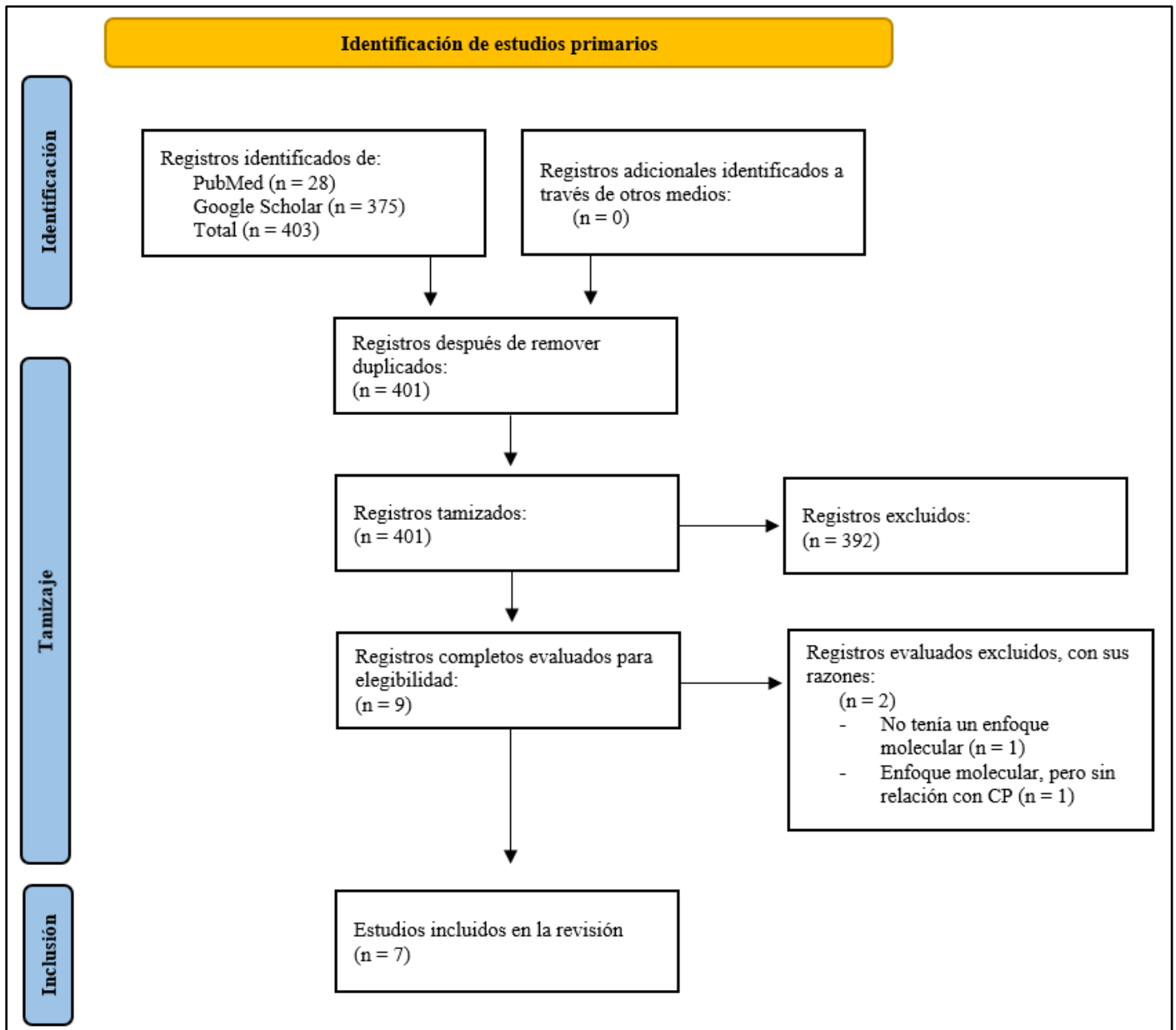


Tabla 1. Descripción de los 7 estudios científicos seleccionados mediante la metodología PRISMA.

Cód.	Título	Revista	Año	Q	Nº Citas	Tipo de estudio
EC01	Transforming activities of <i>Chlamydia pneumoniae</i> in human mesothelial cells (Rizzo <i>et al.</i> , 2014)	International microbiology	2014	Q3	7	Ensayos “ <i>in vitro</i> ”
EC02	Classification and functional analyses of putative conserved proteins from <i>Chlamydomonas pneumoniae</i> CWL029 (Khan <i>et al.</i> , 2015)	Interdiscip Sci Comput Life Sci	2015	Q2	1	Bioinformática
EC03	Systems Biology Approaches for the Prediction of Possible Role of <i>Chlamydia pneumoniae</i> Proteins in the Etiology of Lung Cancer (Khan <i>et al.</i> , 2016)	PLoS One	2016	Q1	17	Bioinformática
EC04	Prediction of <i>Chlamydia pneumoniae</i> protein localization in host mitochondria and cytoplasm and possible involvements in lung cancer etiology: a computational approach (Alshamsan <i>et al.</i> , 2017)	Saudi Pharmaceutical Journal	2017	Q2	9	Bioinformática
EC05	The therapeutic role of inhibition of miR-328 on pulmonary carcinoma induced by <i>Chlamydia pneumoniae</i> through targeting histone H2AX (Shen <i>et al.</i> , 2018)	Cancer Biomarkers	2018	Q2	7	Ensayos “ <i>in vitro</i> ” e “ <i>in vivo</i> ”
EC06	Genome-wide DNA methylation and RNA expression profiles identified RIPK3 as a differentially methylated gene in <i>Chlamydia pneumoniae</i> infection lung carcinoma patients in China (Xiong <i>et al.</i> , 2019)	Cancer Management and Research	2019	Q2	2	Estudio caso-control
EC07	Proteome-wide screening for the analysis of protein targeting of <i>Chlamydia pneumoniae</i> in endoplasmic reticulum of host cells and their possible implication in lung cancer development (Li <i>et al.</i> , 2022)	Biocell	2022	Q4	1	Bioinformática

Sección 2: Identificación de potenciales moléculas bacterianas de *C. pneumoniae*.

Identificación de proteínas bacterianas de *C. pneumoniae* con potencial rol en la transformación de células pulmonares sanas a tumorales mediante estudios bioinformáticos.

Los estudios bioinformáticos se caracterizan por el análisis de grandes cantidades de datos biológicos como secuencias de ADN o proteínas mediante herramientas computacionales. De los 7 estudios relacionados con *C. pneumoniae* y el CP, 4 de estos fueron de tipo bioinformático. El objetivo principal de estas 4 investigaciones (Tabla 1: EC02, EC03, EC04 y EC07) fue predecir proteínas bacterianas que pudiesen tener como blancos los diversos organelos de la célula hospedera (e.g. núcleo, mitocondria, citoplasma y retículo endoplasmático), y que además pudieran alterar funciones celulares vitales que podrían causar la transformación de células pulmonares sanas a tumorales. Por ello, estos estudios presentan similitudes en sus metodologías, de las cuales destaca el análisis de la base de datos proteómica de la cepa bacteriana TW-183, pues esta es la cepa de *C. pneumoniae* que tiene la mayor cantidad de proteínas completas en su proteoma (Total de proteínas: 1112). Además, estos estudios emplearon diversas herramientas bioinformáticas predictivas tales como: **cNLS mapper** (esta herramienta predice con precisión las señales de localización nuclear (NLS) específicas de la ruta de la importina $\alpha\beta$ mediante el cálculo de las puntuaciones de NLS), **BaCeLLo** (es un predictor de cinco clases de localización subcelular de proteínas en eucariotas (vía secretora, citoplasma, núcleo, mitocondria y cloroplasto) y se basa en diferentes vectores de soporte (SVM) organizadas en un árbol de decisión), **Hum-mPLoc 2.0** (esta herramienta predice la localización subcelular de proteínas humanas en 14 ubicaciones: centriolo, citoplasma, citoesqueleto, retículo endoplasmático, endosoma, espacio extracelular, aparato de Golgi, lisosoma, microsoma, mitocondria, núcleo, peroxisoma, membrana plasmática y sinapsis) y **ExpASy** (es un servidor de proteómica para analizar secuencias y estructuras de proteínas; se lo usó para determinar el peso molecular de proteínas bacterianas) (Khan *et al.*, 2016; Alshamsan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2022).

Por otra parte, el estudio EC02 tuvo como objetivo la caracterización funcional de 366 proteínas bacterianas de la cepa CWL029 de *C. pneumoniae* (Khan *et al.*, 2015). Este estudio fue seleccionado para la presente revisión sistemática ya que, a pesar de que no tiene una relación directa con el CP, muestra una proteína bacteriana que tiene la capacidad de alterar rutas bioquímicas en las células hospederas.

Las proteínas bacterianas de *C. pneumoniae* encontradas en los 4 estudios bioinformáticos que podrían tener un rol en la transformación de células pulmonares sanas a tumorales se encuentran detalladas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Listado de las proteínas de *C. pneumoniae* que podrían participar en la transformación de células pulmonares sanas a tumorales.

Cód.	Blanco celular	Proteínas
EC02	Citoplasma	Q9Z7E6 (gamma-glutamyl ligase)
EC03	Núcleo	Subunidad beta de la ADN polimerasa III bacteriano; proteína chaperon DnaJ; DNA gyrase subunit A; single-stranded DNA-binding protein (SSB); primosomal protein; DNA-directed RNA polymerase beta; beta prima subunits; exonuclease V subunit RecB; ribonuclease R; exodeoxyribonuclease VII small subunit; exodeoxyribonuclease VII large subunit; MutS; MutL.
EC04	Citoplasma	Aspartyl-tRNA synthetase; uridylate kinase; ATP-dependent Clp protease; methionine aminopeptidase; ATP-dependent zinc metalloprotease; ATP-dependent protease La; Protoporphyrinogen oxidase; DNA methyltransferase; tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase; SAM dependent methyltransferase; cytidine/uridine-2'-O-)-methyltransferase; ADP/ATP carrier protein 2; Nucleoside diphosphate Kinase; 30S ribosomal protein S1, S6, S5,S20; 50S ribosomal protein L10,L9,L4,L5,L29,L27,L33,L34,L35,L36; Ribonuclease III; Ribonuclease HII; Ribonuclease Z; Ribonuclease G; GTPase HflX; HSP-70; 60 kDa chaperonin; Protein GrpE.
	Mitocondria	Bacterial DNA-binding protein HU; Methyl CpG binding protein; Chromodomain helicase DNA binding protein 1-like (CHD1L); Chromodomain helicase DNA binding protein 5 (CHD5); Inhibitor of DNA-binding protein (ID1); Vascular endothelial growth factor (VEGF); Transcription initiation factor sigma D protein; Transcription repressor protein HrcA; Endonuclease IV; tRNA-ribosyltransferase; methionyl-tRNA formyltransferase; DNA repair protein RecO; Ribonuclease H-III; Ribosome-binding factor A; RNA methyltransferase; Endonuclease III; Endonuclease IV; Translation initiation factor IF-3; Transcription termination associated factor IF-3; DNA-directed DNA polymerase III chain; Methionyl-tRNA; formyltransferase; DNA repair protein RecO; RNA methyltransferase; Endonuclease III; Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase; Acetyltransferase.
EC07	Retículo endoplasmático	Glycogen synthase; glucose-6-phosphate1-dehydrogenase; ABC transporter; phosphatidylserine decarboxylase proenzyme; lipoprotein signal peptidase; glycogen phosphorylase; lipid A disaccharide synthase.

Análisis de la expresión genética de diversos biomarcadores de cáncer en modelos *in vitro* e *in vivo* de CP.

En la presente revisión sistemática, se encontraron 2 estudios preclínicos que abarcan aspectos moleculares sobre el rol de una infección por *C. pneumoniae* en el desarrollo del CP. El primer estudio científico EC01 (**Tabla 1**) tuvo como objetivo evaluar si una infección por *C. pneumoniae* podría contribuir a la transformación celular *in vitro* en células mesoteliales obtenidas de una biopsia pleural de un paciente con mesoteliomas pleurales no malignos, mediante la regulación en ascenso de la expresión génica de biomarcadores que indican la presencia de una transformación neoplásica en curso como la **calretinina** (CR), el **gen Wilm's tumor 1** (WT1) y la **osteopontina** (OPN). Luego de 14 días post-infección de las células mesoteliales con la cepa AR39 de *C. pneumoniae*, se detectó una sobreexpresión de los biomarcadores mencionados anteriormente. Luego, los autores de este estudio evaluaron si la sobreexpresión de CR y WT1 podría promover la invasión celular. Para ello, examinaron la expresión de metaloproteinasas, tales como el **gen gelatinasa MMP-2** y el **gen activador de membrana tipo 1 - MMP (MT1-MMP)**. Los resultados de este estudio demostraron que hubo una fuerte inducción en la expresión de los genes CR y WT1 en las células mesoteliales infectadas por *C. pneumoniae*. Además, el análisis de otros biomarcadores como OPN, MMP-2 y MT1-MMP corroboraron la posible capacidad de promover la transformación celular que tiene una infección por *C. pneumoniae* (Rizzo *et al.*, 2014).

Por otra parte, el estudio EC05 (**Tabla 1**) tuvo como objetivo investigar al microARN **miR-328** y su posible mecanismo de acción *in vitro* en la línea celular de CP inducido por *C. pneumoniae*, A549. En esta investigación, se determinó que la potencial molécula objetivo de miR-328 es la **histona H2AX**, ya que la inhibición de este microARN

aumenta los niveles de expresión proteica de H2AX en la línea celular A549. Además, se observó que los porcentajes de apoptosis celular también aumentaron en los grupos de células A549 donde miR-328 estaba inhibido. Estos resultados fueron comprobados posteriormente en un modelo *in vivo* con ratones machos Sprague Dawley (SD) libres de patógeno específico (SPD), a los cuales se les indujo CP mediante la aplicación de una solución de benzopireno junto con la cepa TW-183 de *C. pneumoniae* (Shen *et al.*, 2018).

Alteración del metiloma en pacientes con CP y con infección por *C. pneumoniae*.

En el estudio científico EC06 (**Tabla 1**), se realizó un análisis integral del transcriptoma y del metiloma en dos grupos de pacientes con CP (el primer grupo de pacientes era positivo para una infección por *C. pneumoniae* y el segundo grupo de pacientes era negativo para la infección), con el fin de explorar la relación entre una infección por *C. pneumoniae* y el CP. Los resultados mostraron una hipometilación de la región promotora del **gen RIPK3**, lo cual incrementó la expresión de RIPK3 en el tejido pulmonar de pacientes con CP que eran positivos para *C. pneumoniae*, en comparación con el tejido adyacente. Esta diferencia en metilación no fue observada en pacientes con CP negativos para *C. pneumoniae*. Adicionalmente, se reportó que las regiones promotoras de otros genes como **NELF (neurofilament)** mostraban hipermetilación, lo cual inhibe la expresión transcriptómica. Por otra parte, **DR5 (dopamine receptor 5)** también mostró menor expresión (Xiong *et al.*, 2019).

Sección 3: Propuesta de potencial mecanismo molecular mediante el cual una infección por *C. pneumoniae* induce la transformación de células pulmonares sanas a tumorales.

Identificación de potenciales vías de transducción de señales que son alteradas en células pulmonares sanas por una infección por *C. pneumoniae* mediante la base de datos KEGG pathway.

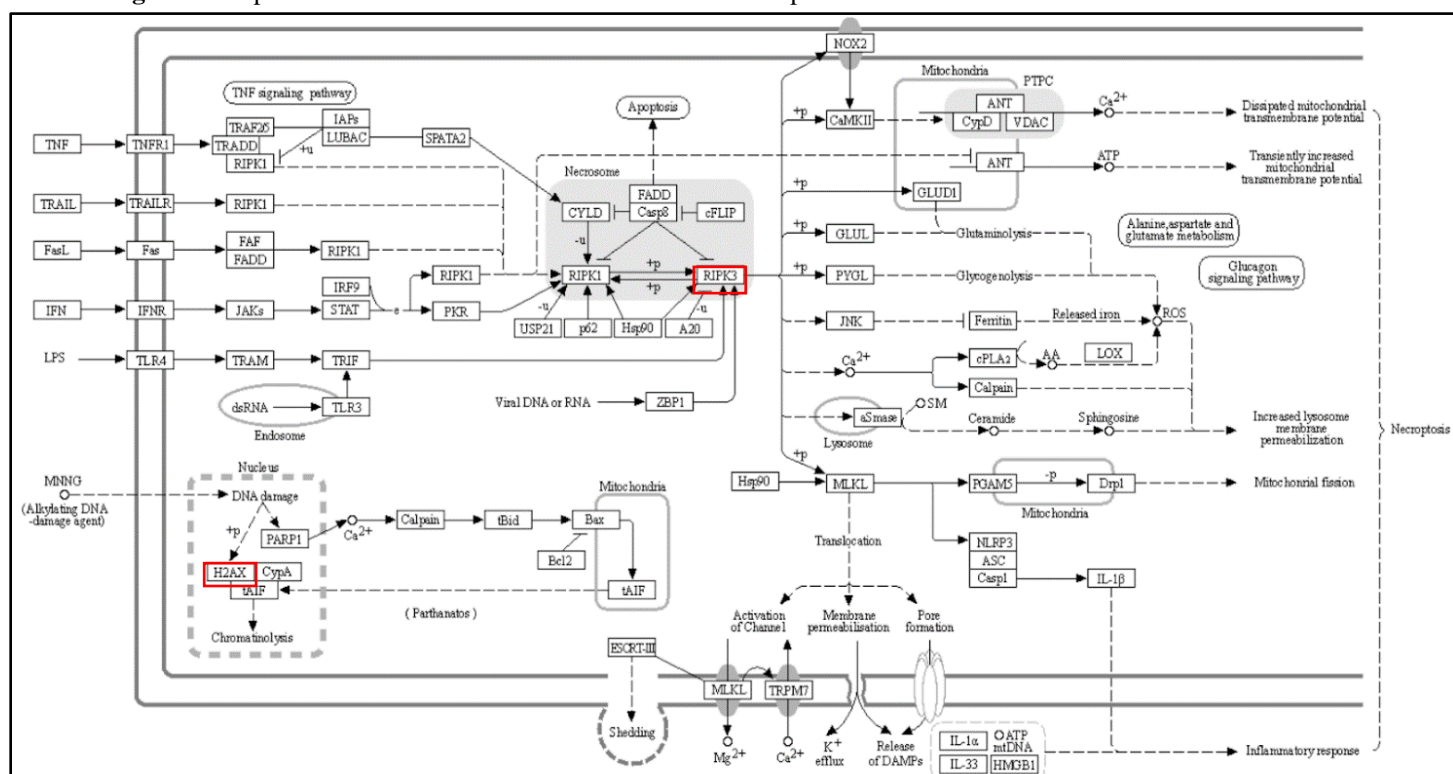
Se identificaron un total de 80 moléculas (70 moléculas provenientes de los estudios bioinformáticos y 10 moléculas provenientes de los estudios *in vitro* e *in vivo* y caso-control) en los estudios científicos seleccionados. De estas 80 moléculas, se eligieron las 10 moléculas que fueron identificadas en los estudios *in vitro/in vivo* y caso control, debido a su nivel de evidencia, para el posterior análisis mediante KEGG pathway, así se encontraron las vías de transducción de señales en donde están involucradas. En la **Tabla 3**, se resumen los resultados del análisis. Se observó que, de las 10 moléculas seleccionadas, 4 han sido descritas en alguna vía de transducción de señales de la base de datos KEGG pathway. Con el fin de obtener una base científica para la elaboración del modelo molecular de inducción de carcinogénesis pulmonar por *C. pneumoniae*, se seleccionaron las vías de transducción de señales que tienen relación con el cáncer, y que además integran a más de 1 de las moléculas seleccionadas. Como resultado, la histona H2AX y la proteína quinasa RIPK3 coincidieron en el mapa de la vía de transducción de señales de un proceso celular llamado **necroptosis** (Ver **Figura 2**).

Tabla 3. Vías de transducción de señales en las cuales participan las distintas moléculas identificadas en los estudios de laboratorio según la base de datos KEGG pathway.

Nombre de la molécula	Tipo de molécula	Vías de transducción de señales involucradas según la base de datos KEGG pathway
Calretinina	Proteína	N/D*
Wilm's tumor 1	Gen	N/D
Osteopontina	Fósforo glicoproteína	N/D
Gelatinasa MMP-2	Gen	<ul style="list-style-type: none"> Relaxin signaling pathway Bladder cancer Diabetic cardiomyopathy GnRH signaling pathway AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications Proteoglycans in cancer Endocrine resistance Leukocyte transendothelial migration Estrogen signaling pathway Pathways in cancer Fluid shear stress and atherosclerosis
Activador de membrana tipo 1 - MMP (MT1-MMP)	Gen	N/D
miR-328	Micro-ARN	N/D
H2AX	Histona	<ul style="list-style-type: none"> Necroptosis Necroptosis NOD-like receptor signaling pathway Cytosolic DNA-sensing pathway TNF signaling pathway Salmonella infection Amyotrophic lateral sclerosis Pathways of neurodegeneration - multiple diseases
RIPK3	Gen	N/D
NELF	Gen	N/D
DR5	Gen	N/D

*N/D: Sin resultados.

Figura 2. Mapa de la vía de transducción de señales de la necroptosis.



Tomada de: Base de datos KEGG Pathway: <https://www.kegg.jp/pathway/map04217> (Fecha de acceso: 4 de Julio, 2022).

4. Discusión.

En la presente revisión sistemática, se encontraron 3 moléculas y 1 vía de señalización de las células hospederas que podrían ser alteradas durante una infección por *C. pneumoniae*, y que permitieron cumplir el objetivo de proponer un potencial mecanismo molecular por el cual una infección por *C. pneumoniae* podría inducir la transformación de células pulmonares sanas a tumorales que eventualmente causarían el CP. Para dilucidar cómo *C. pneumoniae* podría inducir transformación celular y posterior tumorigénesis, primero se analizó el conocimiento actual sobre su mecanismo de infección y persistencia dentro de las células hospederas.

C. pneumoniae es un patógeno bacteriano intracelular obligado que requiere diversos mecanismos moleculares que le permitan sobrevivir dentro de la célula infectada hasta cumplir con su ciclo de vida. Durante una infección por *C. pneumoniae*, este microorganismo entra a la célula hospedera mediante la vía de la endocitosis. *C. pneumoniae* presenta un ciclo de vida compuesto por dos fases. En la primera fase, *C. pneumoniae* se presenta como un cuerpo elemental (CE), el cual corresponde a su forma infecciosa, pero se encuentra metabólicamente inactivo (Villegas *et al.*, 2008). Dentro del contexto pulmonar, las primeras células que son infectadas por *C. pneumoniae* son las células epiteliales y los macrófagos alveolares (Porritt and Crother, 2016). Dentro de la célula hospedera, *C. pneumoniae* forma un fagosoma y puede inhibir la formación del fagolisosoma. Esta característica le permite a *C. pneumoniae* desarrollarse en una vesícula protegida por una membrana, formando así cuerpos de inclusión donde madura a su segunda fase, la cual es conocida como cuerpo reticular (CR) (Villegas *et al.*, 2008). Esta fase es metabólicamente activa; por lo tanto, *C. pneumoniae* puede replicarse y liberar nuevos CE para continuar con su ciclo infeccioso.

Durante una infección por *C. pneumoniae*, se activan diversos procesos celulares con el propósito de erradicar la infección bacteriana. A nivel del sistema inmune innato, se activan los receptores tipo Toll (TLRs) 1, 2, 4, 6 y los receptores NOD 1, 2 que, mediante la vía de señalización de MYD88, promueven la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Shimada *et al.*, 2012). Dentro de estas respuestas inmunes, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que, sumadas a aquellas generadas por la actividad metabólica bacteriana, podrían inducir un estado de estrés oxidativo que causaría daño en el ADN, así como la activación del inflammasoma NLRP3, lo cual agravaría el proceso inflamatorio (Porritt and Crother, 2016). *C. pneumoniae* tiene la capacidad de evadir el sistema inmune dentro de los cuerpos de inclusión en los que se encuentra una vez que ingresa a la célula. Además, *C. pneumoniae* puede infectar células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, células dendríticas derivadas de monocitos, linfocitos y neutrófilos (Porritt and Crother, 2016).

Aparte de evadir el sistema inmune, *C. pneumoniae* también es capaz de evitar la formación del fagolisosoma una vez que ingresa a la célula. La formación del fagolisosoma es un paso fundamental en el proceso de la fagocitosis que, en el contexto de una infección, sirve como mecanismo de defensa que activa el sistema inmune y la respuesta inflamatoria contra el patógeno invasor (Lee *et al.*, 2020). *C. pneumoniae* podría evitar la formación del fagolisosoma mediante la modificación activa de su vesícula hasta ser capaz de fusionarse con vesículas secretoras (Krull *et al.*, 2005). Además, esta evasión podría ser producto de las interacciones entre *C. pneumoniae* y rutas secretoras que incluyen la fosforilación dependiente de MEK y la activación de ERK1/2, acompañadas de la fosforilación dependiente de la quinasa PI3K y la activación de la quinasa Akt, lo cual induce un mecanismo patógeno que le permite a *C. pneumoniae* escapar de la formación del fagolisosoma (Krull *et al.*, 2005).

C. pneumoniae es capaz de alterar vías de señalización de la célula hospedera, con el fin de desarrollar su propio nicho intracelular que le permita asegurar su supervivencia. Debido a la actividad de su sistema secretor tipo 3, *C. pneumoniae* es capaz de liberar moléculas efectoras (de las cuales se sabe muy poco) al citoplasma de la célula hospedera y, de esta manera, “secuestrar” sus vías de señalización intracelular. Esto le permite a *C. pneumoniae* generar un ambiente interno propicio que promueve su supervivencia (Krull *et al.*, 2005; Kern *et al.*, 2009; Porritt and Crother, 2016). Una de las vías de señalización que *C. pneumoniae* puede inhibir es la vía de señalización intrínseca de la apoptosis. Varios estudios han reportado que *C. pneumoniae* es capaz de degradar las proteínas pro-apoptóticas BH3 e inhibir a la proteína citocromo C, la pro-caspasa 3 y la actividad de la caspasa 3. Por otra parte, *C. pneumoniae* puede incrementar la expresión de proteínas anti-apoptóticas como la interleucina 8 (IL-8), el inhibidor de apoptosis (IAP) y la proteína de leucemia mieloide (MCL-1) (Krull *et al.*, 2005; Kern *et al.*, 2009).

El conocimiento disponible sobre la biología de la infección por *C. pneumoniae* sugiere que esta bacteria puede inducir una variedad de mecanismos moleculares, mediante los cuales puede evadir importantes procesos biológicos que protegen a las células a las que infecta; de esta forma, *C. pneumoniae* alcanza un estado conocido como persistencia, el cual es causante de infecciones crónicas. *C. pneumoniae* contribuye a la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias, aparte de las infecciones respiratorias; entre estas enfermedades, se encuentra el CP (Porritt and Crother, 2016).

Los datos obtenidos en esta revisión sistemática en conjunto con la información presentada previamente, permitieron construir un potencial mecanismo molecular que podría explicar cómo una infección por *C. pneumoniae* causaría la transformación de células pulmonares sanas a tumorales.

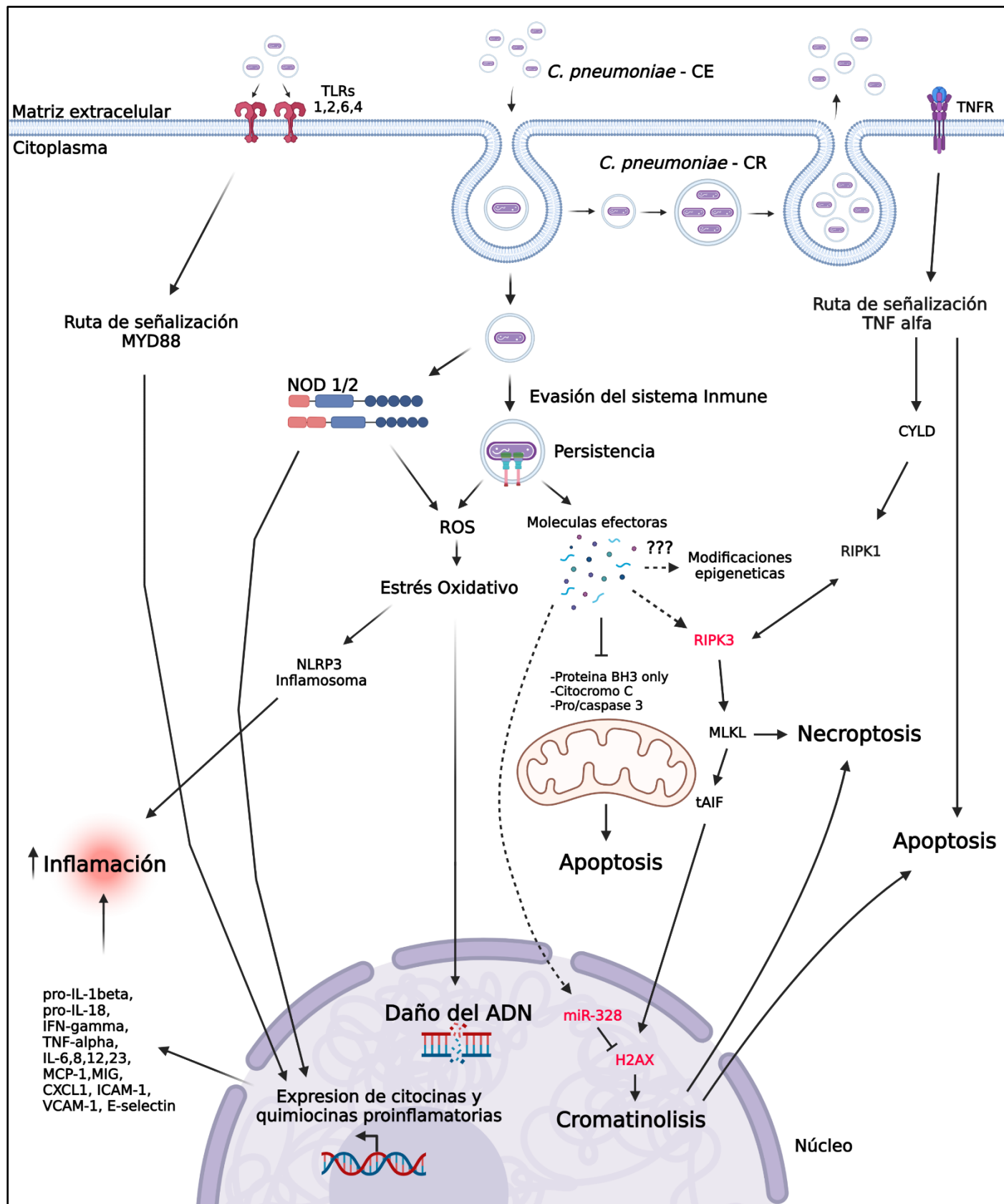
C. pneumoniae puede liberar moléculas efectoras que tienen la capacidad de alterar vías de señalización de la célula hospedera; sin embargo, aún no se han caracterizado a profundidad las moléculas bacterianas específicas que podrían estar vinculadas con los distintos procesos celulares que inducen la transformación neoplásica. La limitada información disponible proviene de varios estudios bioinformáticos que predijeron a nivel computacional potenciales moléculas bacterianas que podrían dirigirse a los distintos organelos celulares y alterar las funciones y vías de señalización asociadas a ellos (Khan *et al.*, 2016; Alshamsan *et al.*, 2017; Li *et al.* 2022). A partir de estos estudios, se obtuvo una lista de 70 proteínas de *C. pneumoniae*, las cuales aún requieren validación experimental a nivel *in vitro*, ya que ciertas proteínas bacterianas tienen homólogos eucariotas que han sido asociados con la carcinogénesis. Por tal motivo, estas proteínas no fueron incluidas dentro del mecanismo molecular.

En base a los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, *in vivo* y caso-control, se puede deducir que la disrupción de los procesos biológicos que se encuentran involucrados en la muerte celular podría ser uno de los principales mecanismos moleculares por los cuales *C. pneumoniae* podría causar la transformación de células pulmonares sanas a tumorales. Aparte de la apoptosis, *C. pneumoniae* podría alterar la necroptosis. La necroptosis es una forma de muerte celular programada que se encuentra bien documentada en la literatura y que inicia con la activación de las quinasas RIPK1 y RIPK3. La necroptosis también puede ser observada aguas abajo de la vía de señalización de TNF alfa en respuesta a infecciones virales o bacterianas (Orozco and Oberst, 2017; Della Torre *et al.*, 2021). Los resultados del estudio de Xiong *et al.* (2019) brindan indicios de que posibles modificaciones epigenéticas afectan la expresión del gen que codifica para la proteína RIPK3, aunque aún no está claro si estas modificaciones afectan el normal funcionamiento de esta quinasa. El rol de RIPK3 en la necroptosis dentro del contexto de las infecciones bacterianas carece de evidencia científica robusta; es probable que el rol de la necroptosis dependa del patógeno y del tipo de célula infectada (Orozco and Oberst, 2017). Por otra parte, en el contexto del cáncer, la función de la necroptosis tampoco es clara, ya que se ha observado que puede tener una función dual. Por un lado, puede inducir la muerte de células tumorales, pero, por otro lado, puede activar vías de señalización alternas que causan inflamación y que promueven la metástasis del cáncer (Della Torre *et al.*, 2021). En resumen, una infección por *C. pneumoniae* podría alterar los procesos de la apoptosis y la necroptosis, dando como resultado el desarrollo de uno de los signos distintivos (“hallmarks”) del cáncer, como es la resistencia a la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Weinberg, 2011).

Siguiendo la línea de las modificaciones epigenéticas, en otro estudio de Shen *et al.* (2018), se reportó que el microARN miR-328 inhibe la expresión de la histona H2AX. Esta histona tiene un rol fundamental en la reparación del ADN, ya que ante un daño en el genoma, H2AX marca la porción de ADN dañado. Esto facilita el reclutamiento local y la retención de factores de reparación del ADN junto con la remodelación de la cromatina para restaurar la integridad genómica (Srivastava *et al.*, 2009). Además, la histona H2AX se asocia con el factor de inducción de apoptosis (AIF) y mediante esta interacción, regula la cromatinólisis y la necroptosis al generar un complejo ciclofilina A (CypA) que degrada el ADN activo (Artus *et al.*, 2010). En base a estos resultados, se podría especular que *C. pneumoniae* tiene la capacidad de alterar el normal funcionamiento de procesos celulares vitales, lo cual puede generar inestabilidad genómica, originando otro de los signos distintivos (“hallmarks”) del cáncer (Hanahan, 2022). Todo esto, junto con la evasión de distintos mecanismos de muerte celular, le permitiría a *C. pneumoniae* sobrevivir dentro de la célula hospedera, y a su vez, causar transformación celular y tumorigénesis a nivel pulmonar.

Una visión global de los diversos mecanismos moleculares por los cuales *C. pneumoniae* podría promover la transformación celular y la tumorigénesis a nivel pulmonar se resumen en la **Figura 3**.

Figura 3. Mecanismos moleculares mediante los cuales una infección por *C. pneumoniae* podría contribuir a la transformación celular y tumorigénesis pulmonar.



En base a los resultados encontrados, con los cuales se propuso el modelo molecular de inducción de transformación celular previamente mencionado y diagramado en la Figura 3, se formuló una hipótesis con su respectivo proceso de validación experimental:

Hipótesis: *C. pneumoniae* modula la expresión de miR-328 y RIPK3.

Validación experimental:

Para evaluar si una infección por *C. pneumoniae* es capaz de modular la expresión genética del microARN miR-328 y la quinasa RIPK3 en células epiteliales pulmonares humanas infectadas, se propone llevar a cabo cultivos primarios de células pulmonares de pacientes con sospecha de cáncer pulmonar pero que fueron descartadas por biopsia y que no tienen presencia de la bacteria, medido por PCR o por presencia de anticuerpos. Las muestras se obtendrían de una biopsia pleural y el cultivo primario se llevaría a cabo siguiendo el protocolo mencionado por Rizzo *et al.* (2014). Luego de obtener el cultivo primario, se analizarían los niveles de expresión de miR-328 mediante RT-qPCR. Se podrían usar los primers empleados por Shen *et al.* (2018). Por otra parte, se analizaría la expresión de RIPK3 a nivel de ARN mensajero (mARN) y proteína. Los niveles de expresión del ARN mensajero de RIPK3 serían evaluados mediante RT-qPCR, mientras que los niveles de expresión proteicos y de fosforilación de RIPK3 serían analizados mediante Western Blotting. Se podría emplear tanto los primers como los anticuerpos para RIPK3 usados por Jing *et al.* (2019).

Luego, se procedería a realizar un co-cultivo de las células pulmonares junto con *C. pneumoniae*, con el propósito de inducir la transformación celular. Para determinar si hubo transformación celular, se podrían analizar marcadores de transformación neoplásica en curso como calteritina, el gen Wilms' tumor 1 y la osteopontina, siguiendo los protocolos de Rizzo *et al.* (2014). La expresión de estos 3 marcadores podría ser evaluada mediante RT-qPCR y Western Blotting. Una vez confirmada la transformación de las células pulmonares, se volvería a analizar los niveles de expresión de miR-328 y RIPK3, siguiendo los métodos mencionados anteriormente. Con los datos sobre los niveles de expresión pre y post infección de miR-328 y RIPK3, se podría conocer si *C. pneumoniae* es capaz de modular la expresión de estas moléculas. Debido a su relación con el miR-328 y con el proceso de necroptosis, se podría analizar la expresión de la histona H2AX por medio de Western Blot como es descrito en Shen *et al.* (2018).

Si la hipótesis es válida, se esperaría observar una sobreexpresión de miR-328 y RIPK3 y una inhibición en la expresión de la histona H2AX en las células pulmonares transformadas.

5. Conclusiones.

Una infección por *C. pneumoniae* puede transformar células pulmonares sanas en células neoplásicas, lo cual convierte a esta infección en un agente etiológico del CP. El mecanismo molecular por el cual *C. pneumoniae* causaría la transformación de estas células se resume de la siguiente manera: en su estrategia de supervivencia intracelular, *C. pneumoniae* causa modificaciones epigenéticas mediante la sobreexpresión de genes que codifican microARNs como miR-328, el cual inhibe la expresión de la histona H2AX, y proteínas como la quinasa RIPK3 en la célula hospedera. Ambas moléculas cumplen funciones claves en distintos tipos de muerte celular como la apoptosis y la necroptosis. Por otra parte, el exceso de ROS y el estado inflamatorio generado durante una infección crónica por *C. pneumoniae* ocasionan daño al ADN en la célula hospedera, el cual se vería exacerbado con la inhibición de la histona H2AX. Como resultado, procesos celulares vitales como la muerte celular y la reparación del ADN podrían alterarse, lo cual favorecería la inducción de varias características asociadas al cáncer, como la inestabilidad genómica y la evasión de la muerte celular.

El estudio de las bases moleculares de *C. pneumoniae* y su relación con el CP aún se encuentra en etapas muy tempranas. Esto se ve reflejado en la poca información disponible sobre este tema en las distintas bases de datos como PubMed y Google Scholar. *C. pneumoniae* puede liberar moléculas efectoras al citoplasma de la célula infectada y modificar vías de señalización como una estrategia para promover su supervivencia. Sin embargo, es crucial determinar cuáles son estas moléculas bacterianas que tienen dichas funciones, ya que esto permitirá comprender con mayor profundidad la infección por *C. pneumoniae* y su relación con el CP. A la fecha de la escritura de este reporte de investigación, existe una lista de 70 proteínas bacterianas que fueron encontradas en estudios bioinformáticos, las cuales requieren validación experimental. Esto podría ser llevado a cabo en futuras investigaciones.

Finalmente, en este estudio, se destacó el rol de la proteína quinasa RIPK3 y el proceso de la necroptosis. Las funciones de RIPK3 y la necroptosis han sido bien documentadas en la literatura; sin embargo, en el contexto de una infección bacteriana y del cáncer, la evidencia científica disponible es poco concluyente. Por otra parte, no hay

información disponible sobre el rol de RIPK3 y la necroptosis en una infección por *C. pneumoniae*; de todas formas, si existe evidencia sobre su rol en el CP. Esto indica que se requiere llevar a cabo estudios adicionales que permitan lograr una mayor comprensión sobre este proceso celular, ya que podría constituir una potencial diana terapéutica.

Contribución de los Autores: “Conceptualización, P.S.; metodología, E.P.; software, P.S.; validación, análisis formal, P.S y, E.P.; recursos, P.S.; curadoría de data, E.P.; escritura—preparación del borrador o draft original, P.S., D.I. y E.P.; escritura—revisión y edición, P.S., D.I. y E.P.; visualización final, P.S., D.I. y E.P.; supervisión, P.S., D.I.; administración y gestión de proyecto, D.I. “Todos los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito.”

Financiamiento/Fondos: “Esta investigación no recibió financiación externa”.

Conflictos de Interés: Declarar conflictos de interés o indicar “Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

Referencias citadas

- Al-Hilu, S. A., & Al-Shujairi, W. H. (2020). Dual Role of Bacteria in Carcinoma: Stimulation and Inhibition. *International journal of microbiology*, 2020, 4639761. <https://doi.org/10.1155/2020/4639761>
- Alshamsan, A., Khan, S., Imran, A., Aljuffali, I. A., & Alsaleh, K. (2017). Prediction of *Chlamydia pneumoniae* protein localization in host mitochondria and cytoplasm and possible involvements in lung cancer etiology: a computational approach. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 25(8), 1151–1157. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.05.007>
- American Cancer Society (2019). What Is Lung Cancer? | Types of Lung Cancer. Cancer.org. Retrieved 23 May 2022, from <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html>.
- Artus, C., Boujrad, H., Bouharrou, A., Brunelle, M. N., Hoos, S., Yuste, V. J., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namane, A., England, P., Lorenzo, H. K., & Susin, S. A. (2010). AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *The EMBO journal*, 29(9), 1585–1599. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.43>
- Bernstein, S. (2021). Lung Cancer Stages: Why and How Your Cancer Is Staged. WebMD. Retrieved 29 July 2022, from <https://www.webmd.com/lung-cancer/guide/lung-cancer-stages>
- Chu, D. J., Guo, S. G., Pan, C. F., Wang, J., Du, Y., Lu, X. F., & Yu, Z. Y. (2012). An experimental model for induction of lung cancer in rats by *Chlamydia pneumoniae*. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 13(6), 2819–2822. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.6.2819>
- Chu, D. J., Yao, D. E., Zhuang, Y. F., Hong, Y., Zhu, X. C., Fang, Z. R., Yu, J., & Yu, Z. Y. (2014). Azithromycin enhances the favorable results of paclitaxel and cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Genetics and molecular research: GMR*, 13(2), 2796–2805. <https://doi.org/10.4238/2014.April.14.8>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [18 March 2022].
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hansen, J. P., Ali, W. M., Sivadasan, R., & Rajeeve, K. (2021). Bacteria-Cancer Interface: Awaiting the Perfect Storm. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1321. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101321>
- Hua-Feng, X., Yue-Ming, W., Hong, L., & Junyi, D. (2015). A meta-analysis of the association between *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer risk. *Indian journal of cancer*, 52 Suppl 2, e112–e115. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.172506>
- Jing, L., Zhai, M. E., Cui, J., Fan, X. Y., Cheng, Y. Y., Jiang, J. L., & Chen, Z. N. (2019). CNOT3 contributes to cisplatin resistance in lung cancer through inhibiting RIPK3 expression. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 24(7-8), 673–685. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01550-y>
- KEGG PATHWAY Database. Genome.jp. (2022). Retrieved 5 August 2022, from <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

16. Khan, S., Imran, A., Khan, A. A., Abul Kalam, M., & Alshamsan, A. (2016). Systems Biology Approaches for the Prediction of Possible Role of *Chlamydia pneumoniae* Proteins in the Etiology of Lung Cancer. *PloS one*, *11*(2), e0148530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148530>
17. Laurila, A. L., Anttila, T., Läärä, E., Bloigu, A., Virtamo, J., Albanes, D., Leinonen, M., & Saikku, P. (1997). Serological evidence of an association between *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer. *International journal of cancer*, *74*(1), 31–34. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19970220\)74:1<31::aid-ijc6>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970220)74:1<31::aid-ijc6>3.0.co;2-1)
18. Lee, H. J., Woo, Y., Hahn, T. W., Jung, Y. M., & Jung, Y. J. (2020). Formation and Maturation of the Phagosome: A Key Mechanism in Innate Immunity against Intracellular Bacterial Infection. *Microorganisms*, *8*(9), 1298. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091298>
19. Li, Y., Khan, S., Ahmad Chaudhary, A., Ahmed Rudayni, H., Malik, A., & Shami, A. (2022). Proteome-wide screening for the analysis of protein targeting of *Chlamydia pneumoniae* in endoplasmic reticulum of host cells and their possible implication in lung cancer development. ProQuest. Retrieved 8 April 2022, from <http://dx.doi.org/10.32604/biocell.2022.016509>.
20. Nasim, F., Sabath, B. F., & Eapen, G. A. (2019). Lung Cancer. *The Medical clinics of North America*, *103*(3), 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.006>
21. Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European respiratory journal*, *48*(3), 889–902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
22. Porritt, R. A., & Crother, T. R. (2016). *Chlamydia pneumoniae* Infection and Inflammatory Diseases. *Forum on immunopathological diseases and therapeutics*, *7*(3-4), 237–254. <https://doi.org/10.1615/ForumImmunDisTher.2017020161>
23. Purssell E, McCrae N. How to Perform a Systematic Literature Review. Cham:Springer International Publishing (2020). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-49672-2>
24. Premachandra, N. M., & Jayaweera, J. (2022). *Chlamydia pneumoniae* infections and development of lung cancer: systematic review. *Infectious agents and cancer*, *17*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13027-022-00425-3>
25. Richard S. A. (2018). Pivotal Pathogenic and Biomarker Role of *Chlamydia pneumoniae* in Neurovascular Diseases. *Current neurovascular research*, *15*(3), 262–273. <https://doi.org/10.2174/1567202615666180717161807>
26. Rizzo, A., Carratelli, C. R., De Filippis, A., Bevilacqua, N., Tufano, M. A., & Buommino, E. (2014). Transforming activities of *Chlamydia pneumoniae* in human mesothelial cells. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, *17*(4), 185–193. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.221>.
27. Roulis, E., Polkinghorne, A., & Timms, P. (2013). *Chlamydia pneumoniae*: modern insights into an ancient pathogen. *Trends in microbiology*, *21*(3), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.009>
28. SCImago, (n.d.). SJR — SCImago Journal & Country Rank [Portal]. Retrieved Date: 6 Julio 2022, from <http://www.scimagojr.com>
29. Sexton, R. E., Al Hallak, M. N., Diab, M., & Azmi, A. S. (2020). Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. *Cancer metastasis reviews*, *39*(4), 1179–1203. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09925-3>
30. Shen, M., Cai, L., Jiang, K., Xu, W., Chen, Y., & Xu, Z. (2018). The therapeutic role of inhibition of miR-328 on pulmonary carcinoma induced by *Chlamydia pneumoniae* through targeting histone H2AX. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, *10*.3233/CBM-181999. Advance online publication. <https://doi.org/10.3233/CBM-181999>
31. Sheweita, S. A., & Alsamghan, A. S. (2020). Molecular Mechanisms Contributing Bacterial Infections to the Incidence of Various Types of Cancer. *Mediators of inflammation*, *2020*, 4070419. <https://doi.org/10.1155/2020/4070419>
32. Shimada, K., Crother, T. R., & Arditi, M. (2012). Innate immune responses to *Chlamydia pneumoniae* infection: role of TLRs, NLRs, and the inflammasome. *Microbes and infection*, *14*(14), 1301–1307. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.08.004>
33. Srivastava, N., Gochhait, S., de Boer, P., & Bamezai, R. (2009). Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutation research*, *681*(2-3), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.08.003>
34. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
35. van Elsland, D., & Neefjes, J. (2018). Bacterial infections and cancer. *EMBO reports*, *19*(11), e46632. <https://doi.org/10.15252/embr.201846632>

36. Villegas, E., Sorlózano, A., Camacho, A., & Gutiérrez, J. (2008). *Chlamydomphila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis [Chlamydomphila pneumoniae: from its proteomics to arteriosclerosis]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 26(10), [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(08\)75279-0](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(08)75279-0)
37. Wang, C., Zhang, N., & Gao, L. (2019). Association between *Chlamydia pneumoniae* infection and lung cancer: a meta-analysis. *Translational cancer research*, 8(8), 2813–2819. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.10.35>
38. West, L., Vidwans, S. J., Campbell, N. P., Shrager, J., Simon, G. R., Bueno, R., Dennis, P. A., Otterson, G. A., & Salgia, R. (2012). A novel classification of lung cancer into molecular subtypes. *PloS one*, 7(2), e31906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031906>
39. Xiong, W. M., Xu, Q. P., Xiao, R. D., Hu, Z. J., Cai, L., & He, F. (2019). Genome-wide DNA methylation and RNA expression profiles identified RIPK3 as a differentially methylated gene in *Chlamydia pneumoniae* infection lung carcinoma patients in China. *Cancer management and research*, 11, 5785–5797. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S186217>