



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

**Efecto del humo de leña sobre el potencial de membrana
mitocondrial y los niveles de ATP en fibroblastos de
pulmón humano normal**

ALUMNO: Alexandra Rivera Sanabria

MATRÍCULA: 2183029489

ASESOR INTERNO: Dra. Julia Pérez Ramos

ASESOR EXTERNO: M. en C. Lilia Carina Becerril Berrocal

LUGAR DE REALIZACIÓN:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”

Unidad de Investigación Laboratorio de Biología Celular

Departamento de Fibrosis Pulmonar

FECHA DE INICIO: 3-octubre-2022

FECHA DE TERMINACIÓN: 3-abril-2023

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS:	3
2. INTRODUCCIÓN:	5
3. MARCO TEÓRICO:	7
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	20
5. OBJETIVOS:	21
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL:	22
7. RESULTADOS:	27
8. DISCUSIÓN:	31
9. CONCLUSIÓN:	33
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	34
12. Vo. Bo. DEL CONTENIDO ACADEMICO:	37

1. ABREVIATURAS

μm	micrómetros
ΔpHm	Gradiente de pH mitocondrial
$\Delta\text{UF/mg}$	Cambio en las unidades de fluorescencia por miligramo
$\Delta\Psi\text{m}$	Potencial de membrana mitocondrial
ADP	Adenosín difosfato
ANT	Transportador de nucleótidos de adenina
ATCC	Colección Americana de Tipos de Cultivo
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca^{2+}	Calcio
CO_2	Dióxido de carbono
CypD	Ciclofilina D
DMEM	Medio de águila modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
DRP	Proteína relacionada con la dinamina
EHL	Extracto de humo de leña
FADH_2	Flavín adenín dinucleótido
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FGM2	Medio de crecimiento de fibroblastos 2
FIS	Proteína de fisión mitocondrial
GTP	Guanosín trifosfato
H^+	Protón
H_2O	Agua
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HBSS	Solución Salina Equilibrada de Hank's
HL	Humo de leña
HPF	Fibroblastos de pulmón humano
HR2	Dominio héptada repetitiva
MFN	Mitofusina
mg	miligramos
ml	mililitros
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
mPTP	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
mV	milivoltios
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
nm	nanómetros

OPA
pH
RE
RIPA
RNA
ROS
UMC
VDAC
µg
µL

Dinamina mitocondrial como GTPasa
Potencial de hidrógeno
Retículo endoplasmático
Buffer de extracción y lisis
Ácido ribonucleico
Especie reactiva de oxígeno
Uniportador mitocondrial de calcio
Canal aniónico dependiente de voltaje
microgramos
microlitros

2. INTRODUCCIÓN

La exposición al humo de biomasa representa la segunda causa de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC). El material de biomasa más utilizado es la madera, conocida también como leña. Alrededor del 40% de la población mundial sigue utilizando combustibles sólidos, entre ellos la leña, para cocinar o calentar sus hogares. Diversos estudios han mostrado que la exposición crónica al humo de leña es un factor de riesgo para el desarrollo de EPOC (1,2). En algunas zonas del mundo este factor puede ser más importante que la exposición al humo de cigarro. Estudios previos han demostrado que la exposición al humo de leña en animales como el cobayo, inducen disfunción mitocondrial, evaluada por una disminución en parámetros respiratorios y actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones de mitocondrias aisladas de pulmones (3). Además, se ha reportado que el extracto de humo de leña induce estrés oxidante, favoreciendo la apoptosis de células epiteliales de pulmón humano (4). A pesar de estos hallazgos, hasta la fecha se desconoce si el extracto de humo de leña induce cambios estructurales y morfológicos en la red mitocondrial y si estos están asociados a cambios en los niveles de expresión de proteínas implicadas en procesos como la biogénesis mitocondrial que favorecerían al incremento en los niveles de estrés oxidante y apoptosis celular.

Uno de los enfoques experimentales que se pueden utilizar para abordar el efecto del humo de leña directamente sobre la fisiología celular de los fibroblastos u otras células pulmonares, es la exposición in vitro a extractos de humo de leña.

Además, estudios previos demostraron que la exposición de cobayos a humo de leña a tiempos cortos induce en mitocondrias aisladas de pulmón un incremento en la generación de ROS y disfunción mitocondrial, la cual fue evaluada por disminución en el índice de control respiratorio y una disminución en la actividad de los complejos respiratorios I y IV de la cadena de transporte de electrones (5).

Evidencia reciente muestra que los cambios en el control de calidad mitocondrial son factores críticos en muchas enfermedades pulmonares, incluyendo EPOC, asma, hipertensión pulmonar, daño de pulmón agudo, cáncer de pulmón y en la susceptibilidad a fibrosis pulmonar (6). Actualmente, se sabe que las mitocondrias forman una red interconectada que va cambiando su tamaño de manera rápida y continúa dependiendo de las demandas

metabólicas celulares. El control de calidad mitocondrial modula el destino y la homeostasis celular. La disminución del control de la calidad da como resultado disfunción mitocondrial, incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), disminución en la producción de ATP y en algunas ocasiones induce apoptosis vía intrínseca (6).

A pesar de que diversos trabajos han demostrado que el EHL induce alteraciones en la función mitocondrial, incremento en la producción de ROS e incremento en la apoptosis vía intrínseca, aún se desconoce el efecto que induce directamente sobre el potencial de la membrana mitocondrial. Por ello en el presente trabajo analizaremos si el EHL induce cambios en la morfología de la mitocondria y si estos cambios están asociados con la disminución en los niveles de expresión de proteínas asociadas con los procesos de biogénesis, fisión y fusión mitocondrial, en fibroblastos de pulmón humano.

3. MARCO TEÓRICO

Características del humo de leña.

¿Qué es el humo de leña?

El humo de leña (HL) es una mezcla compleja de gases, líquidos y partículas sólidas (aerosol) producida por la combustión incompleta de la leña y otros productos de la madera como el carbón vegetal, los pellets de madera, el aserrín, etc., a temperaturas elevadas y oxígeno reducido. Mientras que la combustión completa de la madera requiere un suministro adecuado de oxígeno y produce dióxido de carbono y agua sin humo visible, la combustión incompleta da como resultado la producción de humo. Además de los principales productos de combustión (dióxido de carbono y agua), el humo de leña consta de más de 200 compuestos orgánicos distintos, muchos de los cuales han demostrado tener efectos agudos o crónicos en la salud de los seres humanos expuestos. De estos, el material particulado, especialmente el material particulado fino, es el más preocupante. Otros componentes peligrosos del humo de leña son el monóxido de carbono, los óxidos nitrosos, el formaldehído y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), incluidos carcinógenos como el benzopireno (5).

Composición química del humo de leña

El HL contiene aproximadamente 400 gases, productos químicos y partículas que se liberan en la combustión (Tabla 1), entre ellos destacan, altos niveles de monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, dioxinas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Los HAP en HL dependen de la fuente de madera, las condiciones de la incineración y la fase de combustión. La composición del HL también difiere del humo que se libera cuando se incinera la biomasa, incluido el carbón, las hojas, los cultivos o los desechos animales (7).

Tabla 1. Composición química del humo de leña

<i>Especies</i>	<i>Gramos por kilogramo de leña</i>
<i>Monóxido de carbono</i>	80-370
<i>Metano</i>	14-25
<i>Compuestos orgánicos volátiles (C2-C7)</i>	7-27
<i>Aldehídos</i>	0.6-5.4
<i>Furanos sustituidos</i>	0.15-1.7
<i>Benceno</i>	0.6-4.0
<i>Bencenos alquilados</i>	1-6
<i>Tolueno</i>	0.15-1.0
<i>Ácido acético</i>	1.8-2.4
<i>Ácido fórmico</i>	0.06-0.08
<i>Óxidos de nitrógeno (NO, NO₂)</i>	0.2-0.9
<i>Dióxido de azufre</i>	0.16-0.24
<i>Cloruro de metilo</i>	0.01-0.04
<i>Naftalina</i>	0.24-1.6
<i>Naftalenos sustituidos</i>	0.3-2.1
<i>Monoaromáticos oxigenados</i>	1-7
<i>Masa total de partículas</i>	7-30
<i>Carbono orgánico</i>	2-20
<i>HAP oxigenados</i>	0.15-1
<i>Varios HAP</i>	
<i>Benzo[a]pireno</i>	3×10^{-4} - 5×10^{-3}
<i>Dibenzo[a,h]pireno</i>	3×10^{-4} - 1×10^{-3}
<i>Dibenz[a,h]antraceno</i>	2×10^{-5} - 2×10^{-3}
<i>Partículas de carbono elemental</i>	0.3-5
<i>Alcanos normales (C24-C30)</i>	1×10^{-3} - 6×10^{-3}
<i>Diterpenoides y triterpenoides cíclicos</i>	
<i>Ácido dehidroabiético</i>	0.01-0.05
<i>Ácido isopimarico</i>	0.02-0.10
<i>Lupenona</i>	2×10^{-3} - 8×10^{-3}
<i>Friedelin</i>	4×10^{-6} - 2×10^{-5}
<i>Dioxinas cloradas</i>	1×10^{-5} - 4×10^{-5}
<i>Ácidez de partículas</i>	7×10^{-3} - 7×10^{-2}

Fuente: U.S. Environmental Protection Agency. A summary of the emissions Characterization and non-cancer respiratory effects of wood smoke. Washington, DC: Environmental Protection Agency; 1993. Publication No. EPA-453/R-93-036.

Los HAP son hidrocarburos aromáticos con dos o más anillos de benceno fusionados en varias configuraciones estructurales y no contienen heteroátomos ni llevan sustituyentes. Aquellos que contienen hasta cuatro anillos se denominan HAP ligeros y los que contienen más de cuatro anillos son HAP pesados y se caracterizan por ser más estables y tóxicos. Se sospecha que la exposición a largo plazo a los HAP aumenta los riesgos de daño celular a través de la mutación genética y la mortalidad cardiopulmonar. La figura 1 muestra los efectos de la exposición a corto y largo plazo de los PAH en humanos (8).

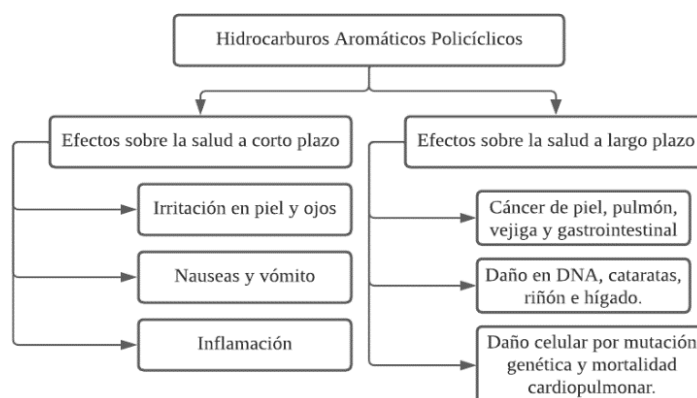


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra los efectos en la salud a corto y largo plazo de la exposición a los HAP. **Fuente:** Abdulazeez T. Lawal | Peter Fantke (Reviewing Editor) (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review, Cogent Environmental Science, 3:1, DOI: 10.1080/23311843.2017.1339841

Combustibles de biomasa

La biomasa es la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos de origen biológico procedentes de actividades forestales, agrícolas y ganaderas hasta residuos domésticos e industriales. Los combustibles de biomasa se utilizan ampliamente para cocinar y calentar hogares en los países en desarrollo, según las estimaciones actuales de la Organización Mundial de la Salud, alrededor del 52% de la población mundial utiliza combustibles sólidos de biomasa (7). Además, tienen efectos adversos para la salud (Torres et al., 2016) ya que el humo derivado de esta combustión de biomasa, principalmente del humo de leña (HL), procedente de incineración doméstica e incendios forestales, es un factor de riesgo global para la salud porque puede provocar estrés oxidativo, inflamación y remodelación de la matriz extracelular (MEC), lo que puede desencadenar diversas

enfermedades pulmonares, como bronquitis, neumonía, insuficiencia respiratoria aguda y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (7).

EPOC y su relación con el humo de leña.

Los combustibles de biomasa provienen de materia orgánica, se utilizan como fuente de energía, incluyen: madera, estiércol y carbón; y son considerados de baja eficiencia por generar una mezcla de altos niveles de productos tóxicos. Existe evidencia creciente de que la exposición al humo de combustibles de biomasa, especialmente de leña o madera, es también una causa relevante, aunque poco estudiada de la EPOC, que afecta en gran medida a países en vías de desarrollo debido a su bajo costo y facilidad de acceso; es el material más común tanto para cocinar como para uso de calefacción (9,10,11). Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que, a nivel mundial, alrededor de 3,000 millones de personas utilizan en sus hogares combustibles de biomasa (12). En México, cerca de 27 millones de personas utilizan combustibles de biomasa en sus hogares y mueren prematuramente por enfermedades atribuibles a la contaminación del aire en el hogar como consecuencia del uso de combustibles sólidos para cocinar (13).

A la contaminación de espacios cerrados, se le conoce como intramuros. Afecta particularmente a mujeres y niños, en quienes se ha visto una mayor prevalencia de síntomas respiratorios de EPOC comparado con las personas que no usan combustibles de biomasa; esto se debe al tiempo prolongado que pasan dentro de sus hogares, así mismo los combustibles de biomasa son usados con frecuencia para cocinar o como calefacción. Los decesos de pacientes no fumadores diagnosticados con EPOC, en países subdesarrollados son atribuibles al humo de biomasa; se calcula que aproximadamente el 75% de estas muertes se da en mujeres (14,11).

La quema de madera da lugar a contaminantes como, el monóxido y dióxido de carbono, el metano, compuestos orgánicos volátiles, óxidos de nitrógeno, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), así como material particulado (PM) (15,16).

La exposición al humo leña se ha considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades pulmonares. Particularmente, las mujeres son afectadas, debido al uso diario de estas fuentes de combustible para cocinar. Diversos estudios, han señalado que, en el caso del humo de leña, el riesgo para desarrollar EPOC aumenta significativamente con el tiempo

de exposición (14,11). Se conoce que la combustión incompleta de los combustibles de biomasa, generan una gran variedad de partículas y compuestos orgánicos, que se inhalan con facilidad. Se ha evaluado que estas partículas participan en la inducción y el mantenimiento de un estado inflamatorio en las vías respiratorias (17).

El humo de leña y su posible relación con el desequilibrio de la dinámica mitocondrial.

A pesar de que los trastornos de la dinámica mitocondrial están implicados en enfermedades neurodegenerativas, neoplásicas, endocrinas (diabetes) y cardiovasculares (hipertensión pulmonar, ductus arterioso persistente, etc.). La disfunción mitocondrial también es vista en enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington, donde los niveles de fisión se encuentren en niveles altos y hay una alteración de la fusión resultando en fragmentación mitocondrial (18), el trabajo va centrado al estudio de estos procesos en enfermedades pulmonares relacionadas con el extracto de humo de leña.

Estudios anteriores han demostrado que la exposición al humo de la madera es capaz de generar estrés oxidativo en el tejido pulmonar, y esto puede implicar un fallo a nivel mitocondrial, dada su estrecha relación con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (19). De acuerdo con Andrew y colaboradores, lo que hacen estas partículas de humo de madera es secuestrar el hierro de la célula huésped, lo que resulta en una interrupción de la homeostasis del metal y está pérdida de metal da como resultado niveles altos de estrés oxidativo lo que daría respuesta al aumento en los niveles de ROS. El exceso de los niveles de ROS puede alterar la función celular normal y promover el daño irreversible a lípidos, ácidos nucleicos y a proteínas celulares (19).

En investigaciones de Zhengke Wang y colaboradores, en una revisión sobre el extracto de humo de cigarro se observó que esta exposición al tabaco alteró la morfología mitocondrial al acortar las redes mitocondriales y causar la acumulación perinuclear de mitocondrias dañadas en células endoteliales microvasculares de pulmón primario de rata. También observaron que el humo de cigarro aumentó la fisión mitocondrial probablemente al disminuir Drp1-S637 y aumentar FIS1, Fosforilación de Drp1-S616, translocación mitocondrial y tetramerización y fusión mitocondrial reducida probablemente al disminuir Mfn2 en células endoteliales microvasculares de pulmón y pulmones de ratón. El humo de

cigarro también causó aumento del estrés oxidativo mitocondrial y reducción de la respiración mitocondrial. Todo esto podría estar relacionado con los efectos del humo de leña sobre la dinámica mitocondrial.

La mitocondria

Estructura de la mitocondria

La mitocondria es un organelo que se encuentra dentro de las células eucariotas, formada por un sistema de doble membrana, una externa que separa el espacio intermembrana del citosol y otra interna que forma crestas en la matriz (Fig. 2) (20). Es de tamaño y forma variable dependiendo del tipo celular. Pudiendo llegar a medir hasta $10\ \mu\text{m}$ y tener un diámetro de entre 0.5 y $1\ \mu\text{m}$. En los fibroblastos, por ejemplo, suelen ser filamentos largos de 1 a $10\ \mu\text{m}$ de longitud con un diámetro de aproximadamente $700\ \text{nm}$ (20). El número de mitocondrias presentes en una célula también varía, dependiendo de los requerimientos energéticos de la célula que las contiene.

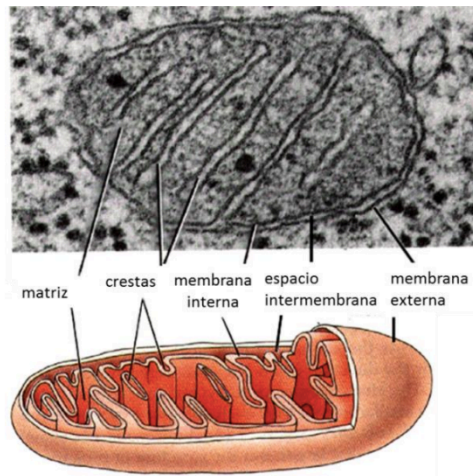


Figura 2. Estructura mitocondrial. La imagen superior muestra una fotografía de microscopía electrónica de una mitocondria donde se aprecia la doble membrana, las crestas y la matriz mitocondriales, como se esquematiza en la imagen inferior.

La membrana mitocondrial externa (MME) es porosa y es atravesada libremente por iones y moléculas pequeñas sin carga a través de proteínas de membrana llamadas porinas, como el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC). Las moléculas más grandes, especialmente las proteínas, tienen que ser transportadas por translocasas. Debido a esta porosidad no hay potencial de membrana a través de MME (22).

Por otro lado, la membrana mitocondrial interna (MMI) es una barrera natural selectiva, ya que incluso pequeños iones y moléculas requieren el uso de proteínas de transporte específicas. Como resultado de su selectividad iónica, se acumula un potencial de membrana electroquímico de aproximadamente 180 mV (22). Además, se localizan proteínas que catalizan las reacciones redox de la cadena respiratoria y el complejo enzimático ATP sintasa que cataliza la producción de ATP en la matriz.

El espacio intermembrana presenta diversas enzimas que utilizan el ATP que sale de la matriz para fosforilar moléculas. Además, contiene moléculas esenciales como la carnitina, necesaria para la activación de los ácidos grasos y la entrada de éstos en la matriz mitocondrial para su posterior oxidación. Y la matriz mitocondrial contiene numerosas enzimas, incluyendo las necesarias para la descarboxilación oxidativa del piruvato, la β -oxidación de ácidos grasos y para el ciclo de Krebs (23, 24). También se encuentra el DNA mitocondrial (DNAm). Este orgánulo posee una cualidad que lo hace único, y es que conserva su propio DNA.

El DNAm es una molécula circular de 16 kb que contiene 37 genes: 13 genes que codifican para subunidades de proteínas de los complejos de la cadena respiratoria I, III, IV y V, 22 RNA de transferencia mitocondriales y 2 RNA ribosómicos necesarios para la expresión de los genes mitocondriales (25).

Funciones de la mitocondria

Las mitocondrias están involucradas en numerosas vías metabólicas pero su principal función es la producción de energía en forma de ATP mediante la respiración mitocondrial, a través de la cadena de transporte de electrones que junto con la fosforilación oxidativa producen más del 90% del ATP (26). Este proceso utiliza la energía liberada en la oxidación de nutrientes para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generándose un gradiente electroquímico y de pH.

La cadena de transporte de electrones consiste en una serie de transportadores organizados en 4 complejos multiproteicos localizados en la MMI: Complejo I NADH-ubiquinona oxidoreductasa, complejo II Succinato-Coenzima Q oxidoreductasa, complejo III Coenzima Q-Citocromo *c* oxidoreductasa y el complejo IV Citocromo *c* oxidasa. Los electrones liberados en la reducción del NADH en el complejo I son transferidos a la

ubiquinona o coenzima Q. La forma reducida difunde libremente por la membrana y transfiere los electrones al complejo III. Alternativamente los electrones pueden entrar al complejo II por reducción del cofactor FADH_2 . El complejo III transfiere electrones al citocromo *c*, molécula localizada en el espacio intermembrana. El complejo IV capta los electrones del citocromo y los transfiere al oxígeno, el último aceptor de electrones, produciendo H_2O . Durante el proceso de transferencia de electrones se bombea H^+ al espacio intermembrana, generándose el gradiente que se mencionó anteriormente, usado por la ATP sintasa para generar ATP cuando los protones son transportados a través de este canal hacia la matriz mitocondrial. Durante este proceso se pueden generar especies reactivas de oxígeno (22).

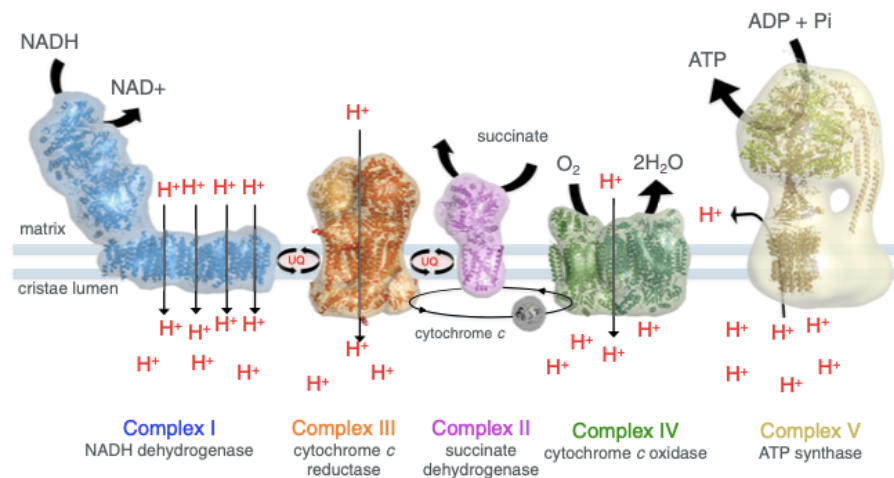


Figura 3. Complejos proteicos de membrana de la cadena respiratoria. Los complejos I (NADH/ubiquinona oxidoreductasa, azul), II (succinato deshidrogenasa, rosa), III (citocromo *c* reductasa, naranja), IV (citocromo *c* oxidasa, verde) y la ATP sintasa mitocondrial (complejo V). Recuperado de Külbrandt (2015).

También regula el funcionamiento de las cascadas de señalización intracelular, ejecutan la β -oxidación de ácidos grasos, participan en el metabolismo de los aminoácidos, la síntesis de piridina y las modificaciones de fosfolípidos (23,24).

Así también, actúa como almacén de cationes en condiciones de aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma por lo que su funcionamiento puede afectar la comunicación entre células, ya que la señalización intracelular utiliza segundos mensajeros y cascadas enzimáticas reguladas por estos. El calcio es un segundo mensajero ampliamente utilizado en todos los tipos celulares. Interviene en una gran variedad de procesos celulares, como la expresión génica, la contracción muscular, la secreción, la proliferación o la muerte celulares

(27). En la mitocondria, la captación de Ca^{2+} se da a través del uniportador mitocondrial de calcio (UMC) y se localiza en la MMI donde forma un poro. El potencial negativo de la MMI generado por la cadena de transporte de electrones se usa para introducir Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. Una de las funciones de este metabolito es la activación del metabolismo mitocondrial. Es un activador de tres enzimas clave en el ciclo de Krebs, mediante el cual la mitocondria obtiene poder reductor para generar ATP (28).

Además, puede participar en algunos procesos de regulación celular, ya que puede desencadenar la activación de la ruta intrínseca de la apoptosis, ya que las proteínas proapoptóticas tienen como diana la mitocondria; y la muerte celular ante situaciones de estrés celular (27).

Biogénesis mitocondrial

La homeostasis mitocondrial se conserva por la coordinación de dos procesos opuestos: la generación de nuevas mitocondrias por biogénesis mitocondrial, y la eliminación de mitocondrias dañadas por mitofagia (29). La biogénesis mitocondrial es un proceso biológico complejo que implica la expresión de más de 1000 genes, la cooperación de dos genomas y la alteración de aproximadamente un 20% de proteínas celulares y se puede definir como el crecimiento y la división de mitocondrias preexistentes. Esta influenciada por múltiples factores, tanto endógenos como exógenos entre los que destacan el ejercicio, restricción calórica, baja temperatura, estrés oxidativo, la división, renovación y diferenciación celulares. Durante el proceso de biogénesis las ROS, la dinámica mitocondrial (Figura 4) y la estructura de los microtúbulos juegan un papel muy importante (29).

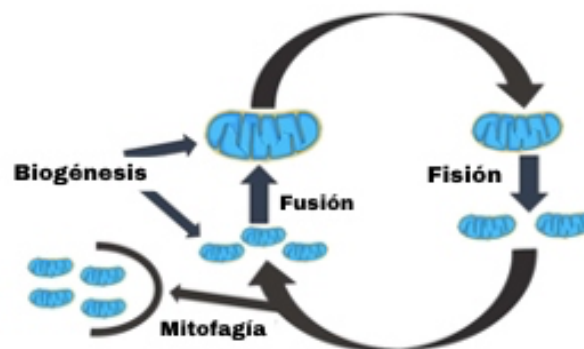


Figura 4. Diagrama esquemático de los eventos dinámicos que regulan el tamaño, la forma y el número de mitocondrias en las células. Las células crean nuevas mitocondrias por el proceso de biogénesis, una mitocondria se divide espontáneamente en dos mitocondrias por fisión mitocondrial, dos mitocondrias pueden

combinarse para formar una mitocondria más grande por fusión mitocondrial, y las mitocondrias fragmentadas o no fusionadas se eliminan de la célula por mitofagia.

Las mitocondrias están dinámicamente interconectadas, lo que les permite compartir membranas, solutos, metabolitos, proteínas y gradientes electroquímicos. Pero también pueden compartir orgánulos celulares como el retículo endoplásmico y los lisosomas (30). Esta conexión les permite formar redes tubulares, que se someten a un equilibrio dinámico y regulado a través de dos procesos muy importantes: la fusión y la fisión (Figura 4) (31). La fusión se produce cuando se unen dos mitocondrias adyacentes, mientras que la fisión separa una mitocondria en dos. Por supuesto que, estos eventos se contrarrestan; la inactivación de uno conduce a la acción del otro (30).

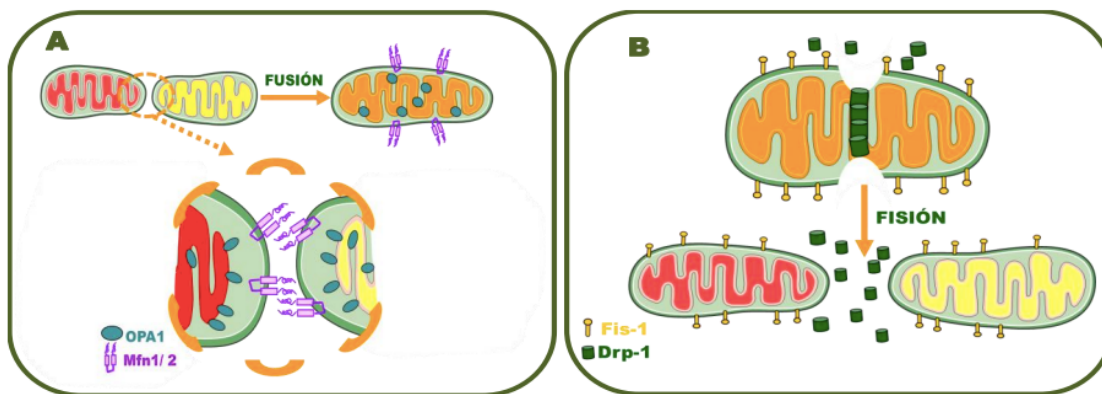


Figura 5. Fusión y fisión mitocondrial. (A) Representación del proceso de fusión mitocondrial. Mfn1/2 son proteínas mitocondriales localizadas en la membrana mitocondrial externa (color morado) con un dominio GTPasa citosólico. OPA1 (elipse azul) es una GTPasa del espacio intermembrana. Mfn1/2 y OPA1 coordinan la fusión mitocondrial como se muestra en la figura: la mezcla de una matriz roja con una amarilla da lugar a una naranja. (B) Representación del proceso de fisión mitocondrial. Fis1 se localiza por toda la membrana externa mitocondrial de manera uniforme al contrario que Drp1 que está presente principalmente en el citosol y de forma puntual en las mitocondrias.

Estos procesos están mediados por GTPasas de la familia de las dinaminas (21). La fusión está coordinada por la MFN1, MFN2 ubicadas en la MME y la GTPasa de atrofia óptica (OPA1) ubicada en la MMI (30). La mitofusina 1 y 2 son proteínas que regulan la arquitectura de la red mitocondrial mediante la inmovilización y la fusión de mitocondrias vecinas. MFN1 muestra dos dominios transmembrana localizados hacia el extremo c-termina de la proteína,

cerca de un dominio héptada repetitiva (HR2) que media el primer paso de la fusión mitocondrial, que consiste en la interacción e inmovilización de dos mitocondrias vecinas a través de la formación de un dímero entre dos MFN. Complejos diméricos que pueden ser homotípicos (MFN1-MFN1 o MFN2-MFN2) o heterotípicos (MFN1-MFN2).

Por otro lado, la MFN2 es una proteína integral de membrana con los extremos N-terminal y C-terminal expuestos en el citosol. Contiene un HR2 localizado en la región C-terminal y la actividad GTPasa localizada en el extremo n-terminar es crucial para su actividad de fusión. En cuanto a OPA1, esta es responsable de la fusión de las MMI (31). La fisión, sin en cambio, está mediada por DRP1 y otras proteínas como FIS1. Este proceso comienza cuando el RE se recluta en el sitio de constricción, marcado por el DNAmT. Luego, múltiples proteínas unidas a la MME (FIS1, MFF, MiD49 y MiD51) reclutan DRP1 en la superficie de las mitocondrias, lo que ayuda en la constricción mediada por RE (Fig. 6) (30).

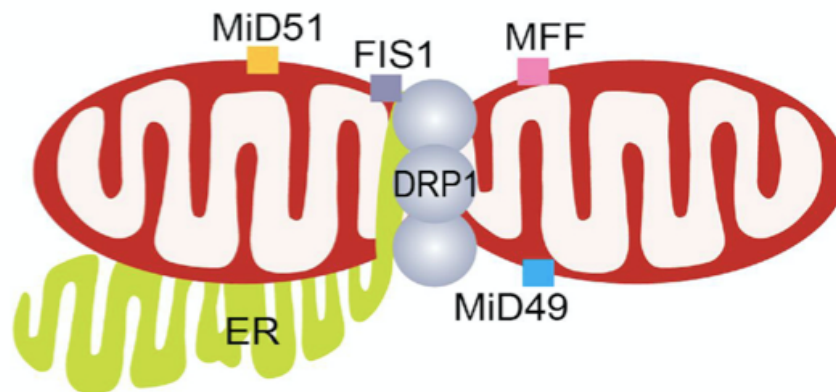


Figura 6. Esquema de Fisión mitocondrial.

Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es una parte muy importante para el funcionamiento mitocondrial. Participa en la fosforilación oxidativa como intermediario en el proceso de almacenamiento de energía en la MMI como parte de la fuerza motriz de protones que impulsa la parte rotatoria de ATP sintasa (32). Las mitocondrias generan ATP utilizando la fuerza motriz de protones, generada por la reducción de sustratos oxidables a través de la cadena de transporte de electrones. La transferencia reductora de estos electrones a través de los complejos de proteínas de la MMI proporciona la energía para impulsar protones en contra de su gradiente de concentración, lo que da como resultado una

acumulación neta de H^+ fuera de la membrana, que luego regresa por la ATP sintasa (Complejo V), produciendo así ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

La fuerza total que impulsa los protones es una combinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y el gradiente de pH mitocondrial (ΔpH_m) (33).

Entre otros factores, $\Delta\Psi_m$ juega un papel clave en la homeostasis mitocondrial (Figura 6). Es una fuerza impulsora en el transporte bidireccional de constituyentes cargados, incluidos iones (que no son H^+), proteínas y ácidos nucleicos (32). Es un regulador central de la salud celular ya que proporciona el gradiente de carga requerido para la obtención de Ca^{2+} mitocondrial y regula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (33). Así mismo, es un regulador crítico a través de la eliminación selectiva de mitocondrias disfuncionales en el proceso de mitofagia, cuando los valores de $\Delta\Psi$ caen sustancialmente hasta cierto límite, reportando una disminución en su funcionalidad ya que una reducción a largo plazo a niveles críticos conlleva no solo la muerte de la mitocondria, sino también de la célula en su conjunto (32).

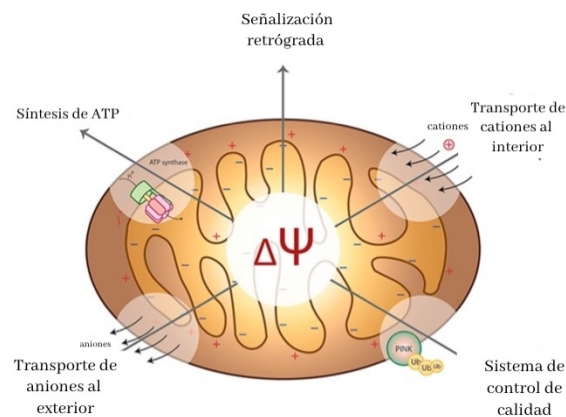


Figura 7. Procesos en los que se ve involucrado el potencial de membrana mitocondrial.

Despolarización de la membrana mitocondrial

La despolarización es una disminución del valor absoluto del potencial de membrana causada por la apertura de canales que permiten el flujo de iones positivos hacia la célula. Esto a nivel de cadena de transporte de electrones provoca una caída en la producción de ATP y la producción excesiva de ROS y finalmente la inhibición de la respiración. Al producirse excesivamente ROS se libera masivamente Ca^{2+} de la matriz, lo que provoca la hinchazón de esta por la presión osmótica. Como consecuencia, las crestas mitocondriales causan brechas

en la MME y la salida de proteínas del espacio intermembranoso al citosol. Los componentes de ambas membranas se acoplan para formar poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), estructuras responsables de disipar el potencial electroquímico utilizado para la síntesis de ATP, así como el transporte de iones, solutos y macromoléculas (34). Este mPTP está compuesto por tres proteínas, el canal aniónico sensible a potencial (VDAC) ubicado en la MME, el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en la MMI y Ciclofilina D (CypD).

Se sabe que el mPTP se abre por sobrecarga de ion calcio mitocondrial, por estrés oxidativo, por aumento del pH y por aumento de magnesio. Aperturas transitorias de este poro tienen como objetivo liberar el exceso de ion calcio que se acumula en la matriz mitocondrial, pero son las aperturas prologadas las que provocan permeabilización de las mitocondrias y liberación de factores proapoptóticos. La disrupción del potencial de membrana eventualmente desencadena la liberación del citocromo-c al citosol, de forma que se interrumpe el flujo de electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria, lo que produce un incremento en la generación de ROS. Sin embargo, una vez en el citosol, el citocromo-c participa en la formación de una estructura citosólica denominada apoptosoma al unirse al Apaf-1 que normalmente esta inactivo. Al mismo tiempo se reclutan unidades de procaspasa-9, que quedan unidas a Apaf-1. Este complejo, formado por citocromo-c/Apaf-1/caspasa-9 es un potente activador de las caspasas, de modo que puede considerarse que opera como un enlace entre las señales iniciadoras de apoptosis. Debido a esto, mPTP se ha vinculado a muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis (5). Por lo tanto, $\Delta\Psi_m$ es un parámetro esencial de la función mitocondrial que se puede utilizar como indicador de la salud celular, ya que las mitocondrias están inherentemente involucradas en el proceso apoptótico de las células (34).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición al humo de biomasa representa la segunda causa de enfermedades crónicas obstructivas crónicas de pulmón. El material de biomasa más utilizado es la madera, conocida también como leña. Diversos estudios han mostrado que la exposición al humo de leña induce cambios patológicos en el pulmón a largo plazo, siendo su principal, efecto el desarrollo de EPOC; sin embargo, las características clínicas y cambios fisiológicos después de la exposición se desconocen parcialmente. Algunos de los efectos de la exposición al humo de leña atmosférico incluyen inflamación en las vías aéreas, aumento del estrés oxidante, tos, disnea y alteraciones en la función pulmonar, lo que puede dar origen al desarrollo de enfermedades pulmonares. La OMS reporta que aproximadamente 2.7 billones de personas alrededor del mundo, principalmente en áreas rurales utilizan fuentes de biomasa para satisfacer sus necesidades energéticas de su hogar [35].

La mitocondria participa en diversas funciones celulares como son: la producción de energía, la modulación del estado redox, el balance osmótico, la homeostasis del Ca^{2+} y la comunicación entre organelos. Además, interviene en la respuesta celular ante diversos tipos de estrés fisiológico y genético, así como en los procesos de proliferación celular y la senescencia. La disfunción mitocondrial ha sido implicada en diversas enfermedades, debido a que las alteraciones en su funcionamiento están implicadas en disminución de los niveles energéticos de la célula e incremento en los niveles de ROS.

Recientemente se ha demostrado que las partículas de humo de leña formadas durante la combustión inducen el secuestro de hierro en la mitocondria, teniendo como resultado un incremento del estrés oxidante, lo cual favorece el daño en células pulmonares (19). Además, se ha reportado que la exposición al extracto de humo de leña en cobayos induce disminución en la actividad de los complejos mitocondriales I y IV en mitocondrias aisladas de pulmón (19). A pesar de estos hallazgos aún se desconoce cuál es el efecto directo del extracto de humo de leña en la red mitocondrial y si dicho extracto induce cambios en las proteínas implicadas en el proceso de biogénesis mitocondrial, que favorezcan a la perpetuación del daño celular.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del extracto de humo de leña sobre los procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial en fibroblastos de pulmón humano normal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un modelo agudo de exposición al extracto de humo de leña en cultivos de fibroblastos de pulmón humano normal.
2. Analizar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial en fibroblastos de pulmón humano normal estimulados con EHL por microscopía de fluorescencia utilizando el colorante JC-1.
3. Determinar de manera cuantitativa en fibroblastos de pulmón humano normal estimulados con EHL los niveles de ATP/ADP a través de un ensayo de luminiscencia.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Obtención del Extracto del Humo de Leña (EHL)

Se utilizó la madera de las ramas del árbol *Casuarina equisetifolia* (madera dura), las cuales fueron fragmentadas en porciones de 2 a 3 cm con diámetros aproximadamente de 5 mm. Se pesaron 5g de madera y se incineraron completamente en una parrilla eléctrica contenida en un bote metálico que fue sellado parcialmente y conectada a un sistema de vacío, de esta forma el humo producido por la incineración se hizo fluir y burbujear en el medio de cultivo contenido en un matraz Kitasato de 500 mL, que a su vez se conectó a una bomba de vacío. El humo se burbujeó en 100 mL de medio de cultivo Ham (F-12) libre de suero. Posteriormente el pH fue ajustado a 7.2 y se esterilizó usando un filtro tipo Millipore con poro de 0.22 micrómetros. La solución resultante fue considerada como el extracto de humo de leña al 100%. Para evitar la variabilidad entre experimentos, se elaboraron alícuotas del extracto del humo de leña (EHL) que se almacenaron a -20°C, hasta su uso.

En experimentos paralelos se preparó un EHL 100% similar, pero usando agua desionizada, la misma agua que se usa para preparar el medio de cultivo de las células. Este 100% EHL soluble en agua se usó para analizar los HAP.

Caracterización de los compuestos químicos del Extracto del Humo de Leña (EHL).

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS, por sus siglas en inglés), es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles. Se realizó la caracterización de los componentes químicos del EHL mediante GC/MS en soluciones del mismo EHL, para identificar compuestos disueltos en agua.

Modelo agudo de exposición al extracto de humo de leña en cultivos de fibroblastos de pulmón humano normal.

Una vez que se obtuvo el EHL al 100%, se realizaron las siguientes diluciones porcentuales: 1.0% y 2.5% las cuales fueron usadas para realizar el ensayo.

Cultivo de fibroblastos de pulmón humano normal.

Fibroblastos de pulmón humano fueron obtenidos de líneas comerciales (HPF, CCD-8, CCD-16 y CCD19) y líneas primarias obtenidas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Línea celular primaria N2 (obtenida de una lobectomía realizada en el INER): Los fibroblastos se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm² (Cornee, COSTAR) con el medio de cultivo Ham (F-12), (Gibco,BRL), suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y 10% de suero fetal bovino (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.), incubándose con una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ /95% aire a 37 °C hasta lograr un 80% de confluencia.

Línea celular HPF: Línea comercial de fibroblastos de pulmón humano normal. Marca Promocell Cat. No. C-12361. Mujer caucásica de 44 años. Crecidos en medio de cultivo FGM2 Fibroblast Growth Medium 2, Marca PromoCell. Cat C-39320. Enriquecido con los suplementos: FCS-10 (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.), hbFGF-0.5, insulín-2.5, marca Promocell incluidos en el kit del medio de cultivo. Se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm² (Cornee, COSTAR), incubándose con una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ /95% aire a 37 °C hasta lograr un 80% de confluencia.

Líneas comerciales de fibroblastos de pulmón humano normal CCD-8, CCD-16, CCD-19 adquiridas al ATCC: Cultivadas en medio DMEM marca Gibco, suplementado con penicilina (100 ug/ml), estreptomicina (100µg/ml) y 10% suero fetal bovino (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.). Se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm² (Cornee, COSTAR), incubándose con una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ /95% aire a 37 °C hasta lograr un 80% de confluencia.

Los experimentos fueron realizados durante los primeros pasajes (6-8).

Evaluación del Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

El potencial de membrana mitocondrial se midió utilizando el colorante catiónico liposoluble JC-1 (Thermo Fisher, T3168) que se acumula de manera dependiente del potencial de membrana. Las mitocondrias polarizadas están marcadas por una tinción fluorescente de color rojo. En la despolarización, la tinción de color rojo se reemplaza por fluorescencia de

color verde, por lo tanto, la despolarización mitocondrial se mide por una disminución en la relación de intensidad de fluorescencia rojo/verde.

Diseño del experimento:

Una vez que los cultivos de fibroblastos llegaron a confluencia, se aspiró el medio de cultivo y se levantaron utilizando tripsina EDTA (Sigma).

Las células fueron contadas y ajustadas a 20,000 células/ml, estas fueron sembradas en cajas de 24 pozos negras especiales para medir fluorescencia, marca lumox®.

Para el estímulo con EHL, se prepararon dos stocks EHL uno al 1% y otro de 2.5% en medio de cultivo F-12 Ham con SFB al 10%. Los pozos fueron distribuidos de la siguiente manera:

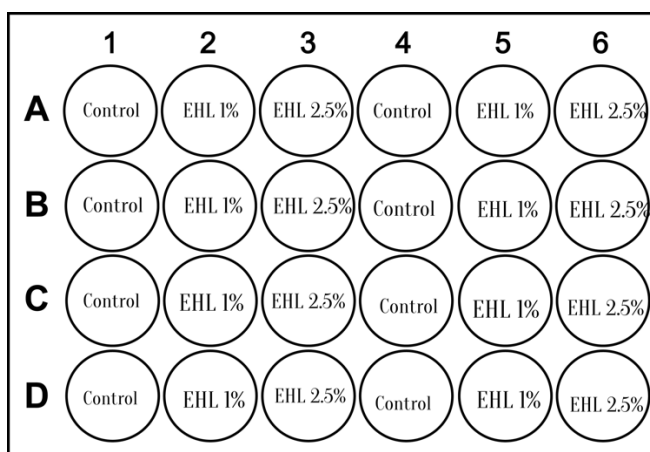


Figura 8. Esquema de distribución de los pozos control, los pozos estimulados con EHL 1% y EHL 2.5%.

Una vez añadido el extracto se incubaron las placas durante 24 horas a 37 °C. Para la tinción con el colorante catiónico JC-1 (Thermo Fisher, T3168), se preparó el reactivo de acuerdo con la siguiente relación: por cada 6 ml de medio de cultivo sin SFB, 3 µl de JC-1 (concentración de 0.3 µg/ml). Se agregó 1 ml de la solución preparada en cada uno de los pozos, previamente lavados con 1 ml de HBSS (Solución balanceada de Hank's). Una vez agregado el colorante catiónico se incubó por 30 minutos a 37°C.

Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 1 ml de HBSS y se estimularon con el agente desacoplante FCCP (100uM) u Oligomicina (5uM) que es un inhibidor de la ATP sintasa, siguiendo el diseño de la Figura 9. Después los fibroblastos se observaron con un microscopio confocal usando el objetivo de 20x y se realizó la lectura por microscopia de fluorescencia en un equipo BioTek Cytation 5 en el que se leyó la intensidad de fluorescencia

tanto la verde (520nm) como la roja (572nm) para detectar el cambio de emisión y se obtuvieron fotos representativas de cada pozo para el análisis cuantitativo y cualitativo. Los resultados se expresaron como el cambio en las unidades de fluorescencia/mg de proteína (Δ UF/mg).

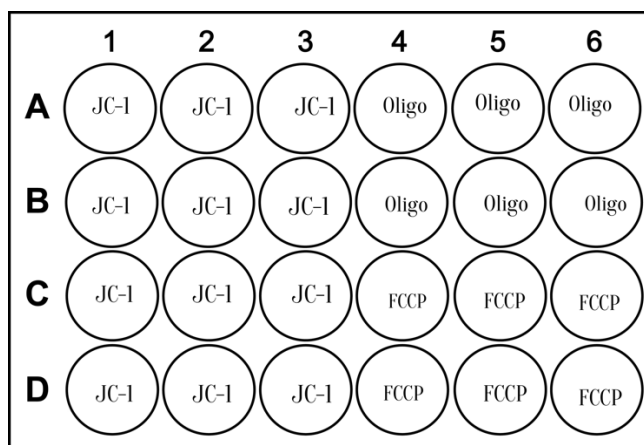


Figura 9. Esquema de distribución del tratamiento con JC-1, oligomicina y FCCP.

Ensayo para la cuantificación de proteínas

En cajas de 24 pozos para cultivo se sembraron 20,000 células/por pozo, y fueron estimuladas con EHL al 1% y al 2.5% en medio de cultivo F-12 Ham con SFB al 10%, los pozos fueron distribuidos igual que la Figura 8. Las células fueron incubadas por 24 horas con el estímulo, y posteriormente se lisaron con buffer de lisis RIPA e inhibidores de proteasas. Para cuantificar la concentración de proteínas se utilizó el reactivo de ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) que involucra la adición de un colorante ácido (Coomassie) a la solución proteínica y fue medida a 595 nm en un lector Elisa (Accuris SmartReader 96). Extrapolando el resultado obtenido en una curva estandarizada de albúmina de suero bovino.

Producción de ATP

La producción de ATP se midió utilizando el kit de determinación de ATP Molecular Probes marca Invitrogen Ref: A22066. El ensayo se basa en la determinación cuantitativa de ATP con luciferasa de luciérnaga recombinante (nivel máximo de emisión \sim 560 nm a pH 7.8). Este ensayo es extremadamente sensible, puede detectar hasta 0,1 picomoles de ATP

existente o de ATP a medida que se forma en sistemas cinéticos. Para este ensayo, se sembraron 6000/células por pozo de fibroblastos de las líneas N2, CCD-16 y HPF en una placa blanca de 96 pozos con un fondo transparente, las células fueron estimuladas con diferentes dosis de EHL (1% y 2.5%) por 24 h . El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La medición de la bioluminiscencia se registró utilizando un lector de microplacas multimodal (Synergy HTX BioTek, Winooski, VT, E.U.) en el modo iluminómetro.

5. RESULTADOS

Efecto del EHL en el potencial de membrana mitocondrial.

Para determinar si el EHL inducen cambios en el potencial de membrana mitocondrial, fibroblastos pulmonares normales y estimulados con diferentes dosis de EHL (1% y 2.5%) fueron teñidos con el colorante JC-1. El compuesto JC-1 es un colorante fluorescente, catiónico, liposoluble que forma agregados de manera dependiente del potencial mitocondrial (agregados de color rojo). Los cambios en la fluorescencia del compuesto JC-1 fueron medidos por el equipo Cytation 5, el cual permite medir cuantitativamente la fluorescencia emitida por diferentes longitudes de onda (rojo/verde) y a su vez permite tomar imagen de las células por fluorescencia. Nuestros resultados mostraron en la línea de fibroblastos control CCD16 (Figura 10), que la administración de las distintas dosis de EHL (1 y 2.5%) disminuye de manera significativa el $\Delta\psi_m$.

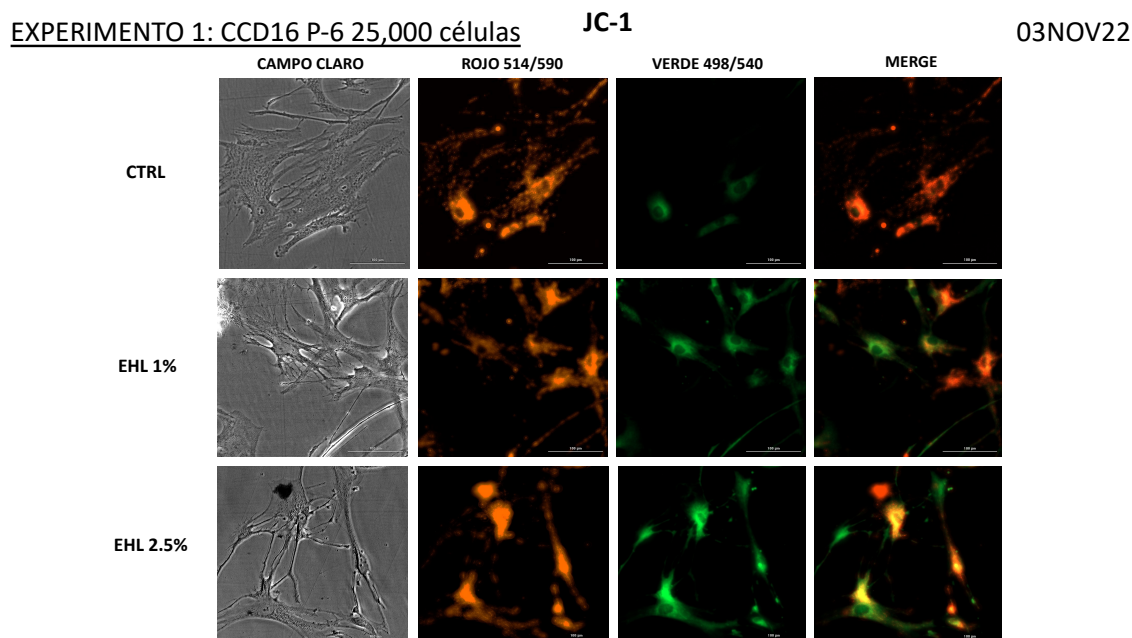


Figura 10. Microscopía de fluorescencia de fibroblastos pulmonares normales y estimulados con EHL al 1 y 2.5%. En la imagen se observa en el panel de lado izquierdo las imágenes de campo claro tomadas con el equipo Cytation 5, la fluorescencia en color rojo fue adquirida con el filtro (ext 514 emi 590), mientras que la fluorescencia en verde fue adquirida con FITC (ext 498 emi 540) y en el último panel observamos el merge de las 2 fluorescencias. La administración de EHL induce un incremento en la fluorescencia verde lo cual es indicativo de pérdida del potencial.

Para asegurar que el colorante estaba funcionando en condiciones óptimas, comparamos la fluorescencia de JC-1 en fibroblastos control y estimulados con EHL después del tratamiento con oligomicina o FCCP. La oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa, induce la hiperpolarización de las mitocondrias y aumenta la formación de agregados, mientras que la FCCP disipa el potencial transmembranal, conduciendo a la pérdida del gradiente electroquímico, evitando la formación de agregados de JC-1 (aumento de la fluorescencia verde). Como se puede apreciar en la Figura 11. La administración del EHL desde el 1% incrementa la fluorescencia verde, lo cual nos indica una disminución del potencial de membrana mitocondrial siendo más evidente en la dosis de 2.5%.

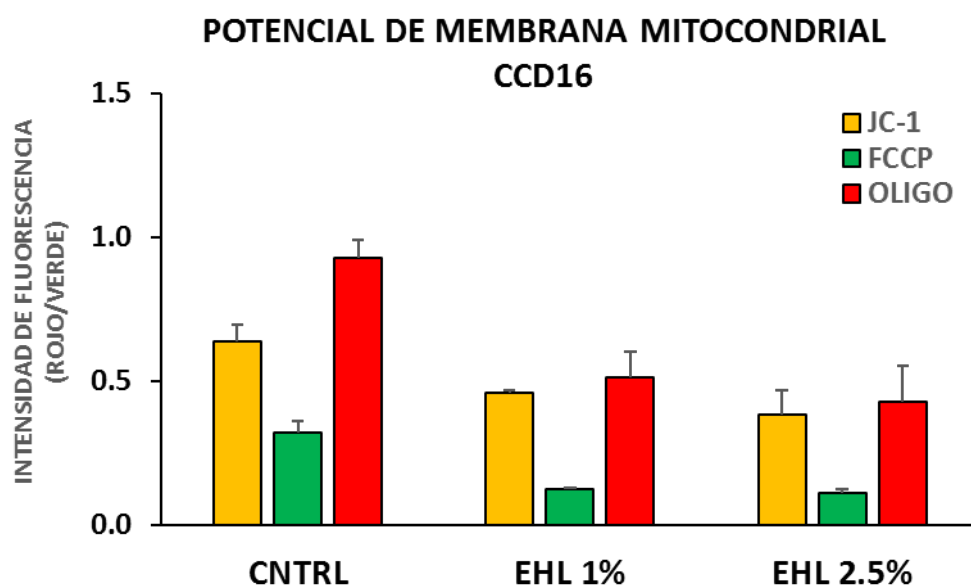


Figura 11. Determinación cuantitativa del potencial de membrana mitocondrial por los cambios en la intensidad de fluorescencia del compuesto JC-1. En la gráfica se observa que el EHL induce pérdida del potencial de membrana en fibroblastos pulmonares normales a las dosis de 1 y 2.5%, en células CCD16 pasaje (P-6). Como controles se utilizó FCCP (verde) para inducir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y Oligomicina (rojo) como un hiperpolarizante celular incrementando el potencial de membrana.

Este resultado fue confirmado con la medición cuantitativa de la fluorescencia emitida por el colorante, la cual fue determinada por la adquisición de la fluorescencia en verde (FITC) y la roja (Texas Red), a través de la medición de la intensidad de fluorescencia por espectrofotometría. Como se puede observar en la Figura 12.

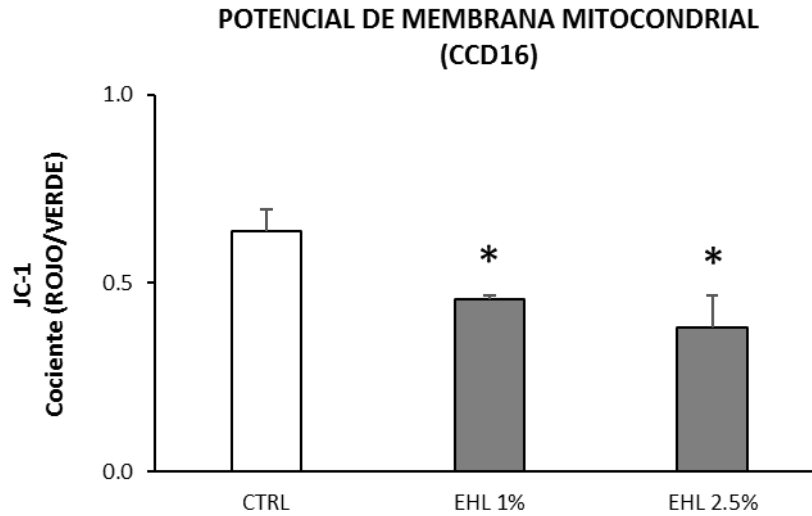


Figura 12. La intensidad de fluorescencia de JC-1 disminuye en fibroblastos estimulados con las distintas dosis de EHL (1% y 2.5%). Mientras que la administración de FCCP induce la pérdida del potencial, siendo más evidente en los fibroblastos estimulados con EHL.

También se analizó otra línea de fibroblastos pulmonares normales (CCD8). En este caso los cambios en el potencial de membrana mitocondrial inducidos por el EHL no son tan evidentes (Figura 13) como en la línea celular CCD-16. Por lo que se analizarán más líneas para ver si el EHL induce pérdida del potencial solo en algunas líneas celulares.

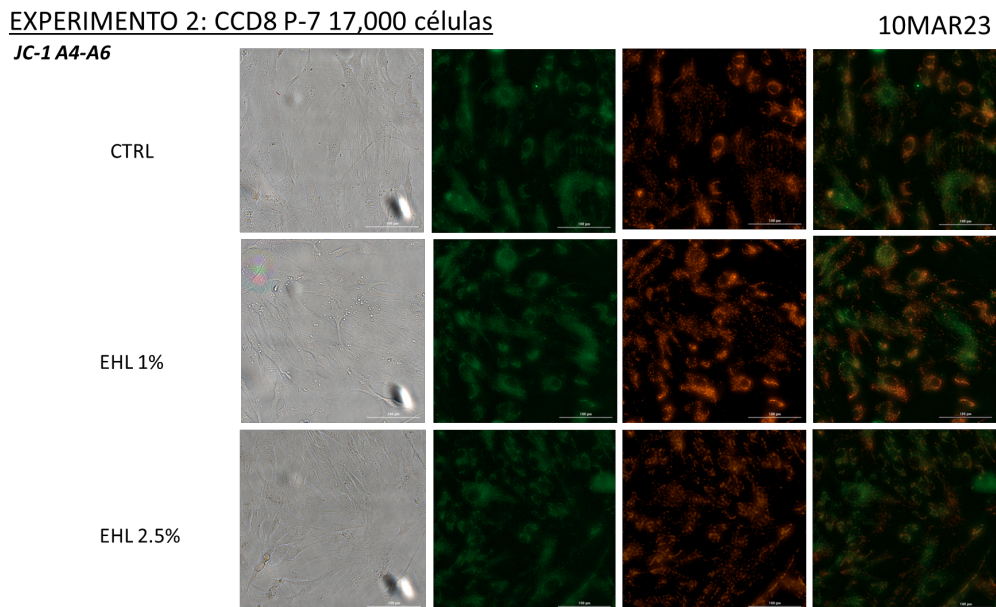


Figura 13. Microscopía de fluorescencia de fibroblastos pulmonares normales y estimulados con EHL al 1 y 2.5%. En la imagen se observa en el panel de lado izquierdo las imágenes de campo claro tomadas con el equipo Cytation 5, la fluorescencia en color rojo fue adquirida con el filtro (ext 514 emi 590), mientras que la

fluorescencia en verde fue adquirida con FITC (ext 498 emi 540) y en el último panel observamos el merge de las 2 fluorescencias. En la línea de fibroblastos pulmonares normales CCD8, observamos una ligera disminución del potencial de membrana mitocondrial en la dosis de 2.5% EHL con respecto al grupo control.

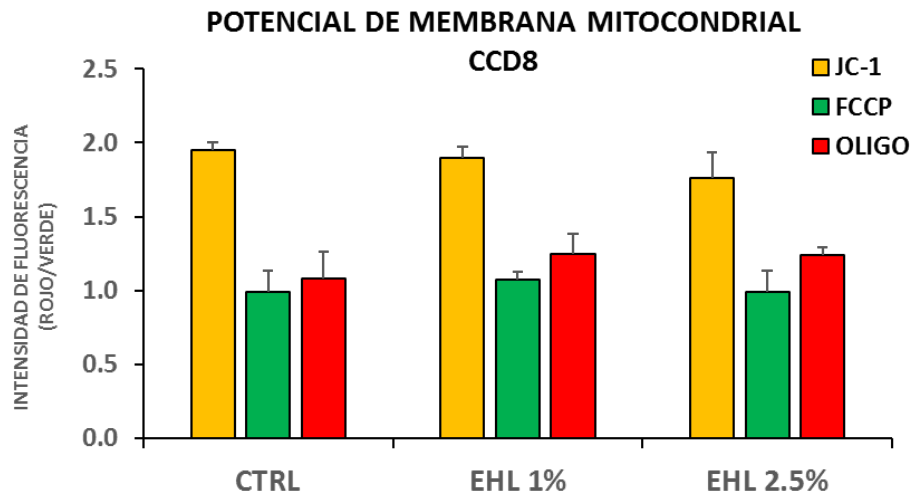
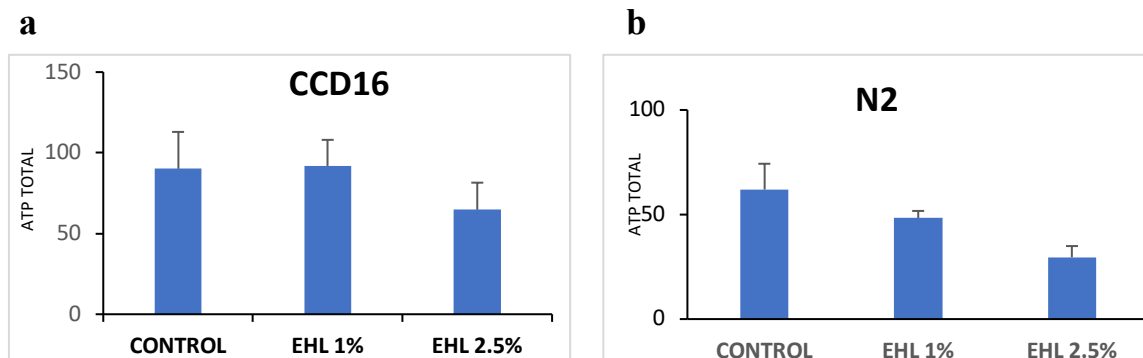


Figura 14. Determinación cuantitativa del potencial de membrana mitocondrial por los cambios en la intensidad de fluorescencia del compuesto JC-1. En la gráfica se observa que el EHL a 2.5% induce una ligera despolarización de la membrana en fibroblastos pulmonares normales en comparación con el grupo control. Como controles se utilizó FCCP (verde) para inducir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y Oligomicina (rojo) como un hiperpolarizante celular incrementando el potencial de membrana.

Efecto del EHL en la producción de ATP.

Por otra parte, cuantificamos la producción de ATP en los fibroblastos control y en los fibroblastos estimulados con 1 y 2.5% de EHL mediante un ensayo de luminiscencia y los resultados que obtuvimos es que los fibroblastos estimulados con 2.5% de EHL tienen una concentración de ATP total más baja en comparación con el grupo control (Figura 15).



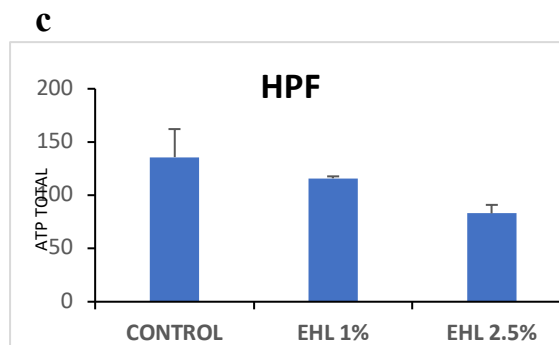


Figura 15. La producción de ATP se cuantificó mediante el ensayo de luminiscencia en los fibroblastos control y los estimulados con EHL a diferentes dosis. El análisis se realizó en 3 líneas celulares **a)** CCD-16 **b)** N2 **c)** HPF. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM.

6. DISCUSIÓN.

Diversos estudios han mostrado que la exposición crónica al humo de leña es un factor de riesgo para el desarrollo de EPOC (2,4). Recientemente, diversas líneas de investigación sugieren que la desregulación del sistema de control de calidad mitocondrial contribuye a la patogénesis de enfermedades pulmonares entre ellas EPOC (2). La exposición al EHL en cobayos induce disfunción mitocondrial en células totales de pulmón. Sin embargo, se desconoce si el efecto del EHL sobre fibroblastos induce alteraciones en los procesos de biogénesis mitocondrial que favorezcan el incremento de estrés oxidante. En este sentido nuestros resultados mostraron que el EHL induce alteraciones en el potencial de la membrana mitocondrial de los fibroblastos de pacientes sanos.

Un hallazgo importante en nuestro trabajo fue que los fibroblastos expuestos a 2.5% de EHL mostraron una disminución en la producción de ATP total. Las alteraciones en la respiración y los cambios en los niveles de ATP están asociadas con cambios en la morfología mitocondrial Benard et al., 2007 demostraron que el silenciamiento de la proteína DRP1 en células Hela resulta en alteraciones morfológicas de la red mitocondrial. Este efecto había sido anteriormente reportado por Hoffmann y colaboradores en un modelo de línea de células epiteliales bronquiales humanas BEAS-2B, pero inducidas con extracto de humo de cigarro (CSE), en el cual los autores muestran que el CSE al 1% induce cambios sólidos en la estructura mitocondrial, incluida la fragmentación, la ramificación y la cantidad de crestas.

Debido a esto y a que se ha reportado que el EHL induce estrés oxidante (19) y una de las principales fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) es la mitocondria, nosotros hipotetizamos que el EHL causa disfunción mitocondrial, lo cual podría producir alteraciones en los procesos de biogénesis mitocondrial y acumulación de daño.

Los procesos de fusión y fisión mitocondrial desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la función mitocondrial, ya sea cuando la célula experimenta un estrés metabólico y/o ambiental ya que se encargan de reducir el número de las mitocondrias dañadas y mantener la homeostasis celular.

Nuestro estudio tuvo como objetivo determinar el efecto del EHL sobre los procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial analizando los cambios en el potencial de membrana y la producción de ATP en fibroblastos de pulmón humano normal para determinar si el EHL induce cambios morfológicos o estructurales en la red mitocondrial.

Nuestros resultados mostraron que la red mitocondrial de fibroblastos estimulados con EHL se modifica induciendo despolarización de la membrana mitocondrial y una disminución en la producción de ATP total como se pudo observar en los resultados, teniendo un efecto más prominente a la dosis de 2.5%. Como ya se ha reportado en la literatura una reducción en la respiración y una disminución en la producción de ATP, puede estar asociado con alteraciones en la morfología mitocondrial (4).

Además, estudios previos demostraron que la exposición de cobayos a humo de leña a tiempos cortos induce en mitocondrias aisladas de pulmón un incremento en la generación de ROS y disfunción mitocondrial, la cual fue evaluada por disminución en el índice de control respiratorio y una disminución en la actividad de los complejos respiratorios I y IV de la cadena de transporte de electrones (5).

Evidencia reciente muestra que los cambios en el control de calidad mitocondrial son factores críticos en muchas enfermedades pulmonares, incluyendo EPOC, asma, hipertensión pulmonar, daño de pulmón agudo, cáncer de pulmón y en la susceptibilidad a fibrosis pulmonar [6]. Actualmente, se sabe que las mitocondrias forman una red interconectada que va cambiando su tamaño de manera rápida y continúa dependiendo de las demandas metabólicas celulares. El control de calidad mitocondrial modula el destino y la homeostasis celular. La disminución del control de la calidad da como resultado disfunción mitocondrial,

incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), disminución en la producción de ATP y en algunas ocasiones induce apoptosis vía intrínseca (6).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- ❖ Establecimos un modelo agudo de exposición al EHL, en fibroblastos de pulmón humano normal.
- ❖ Observamos que la exposición al EHL tiene un efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial, que es dependiente de la dosis. Sin embargo, hay que repetir el experimento en más líneas celulares para corroborar el efecto.
- ❖ El EHL a una dosis de 2.5% disminuye la producción de ATP total en los fibroblastos de pulmón humano normal.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lentz, C. W., & Peterson, H. D. (1997). Smoke inhalation is a multilevel insult to the pulmonary system. *Current opinion in pulmonary medicine*, 3(3), 221–226.
2. Swiston, J. R., Davidson, W., Attridge, S., Li, G. T., Brauer, M., & van Eeden, S. F. (2008). Wood smoke exposure induces a pulmonary and systemic inflammatory response in firefighters. *The European respiratory journal*, 32(1), 129–138.
3. Kimmel EC, Still KR. (1999). Acute lung injury, acute respiratory distress syndrome and inhalation injury: an overview. *Drug Chem Toxicol*. 22(1): 91-128.
4. Liu PL, Chen YL, Chen YH, Lin SJ, Kou YR. (2005). Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells: role of AIF and EndoG. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 289(5): 739-749.
5. Granados-Castro, L. F., Rodríguez-Rangel, D. S., Montaña, M., Ramos, C. & Pedraza-Chaverri, J. (2013). Wood smoke exposure induces a decrease in respiration parameters and in the activity of respiratory complexes I and IV in lung mitochondria from guinea pigs. *Environmental Toxicology*, 30(4), 461-471
6. Hara H, Kuwano K, Araya J. (2018). Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF. *Cells*. 24;7(8): 86.
7. Recillas-Román, S., Montaña, M., Ruiz, V., Pérez-Ramos, J., Becerril, C., Herrera, I., Amador-Muñoz, O., Martínez-Domínguez, Y. M., & Ramos, C. (2021). Wood Smoke Extract Promotes Extracellular Matrix Remodeling in Normal Human Lung Fibroblasts. *International journal of toxicology*, 40(6), 506–516. <https://doi.org/10.1177/10915818211044809>
8. Abdulazeez T. Lawal | Peter Fantke (Reviewing Editor) (2017) Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review, *Cogent Environmental Science*, 3:1, DOI: 10.1080/23311843.2017.1339841
9. Juneman, A y Legarreta, G. (2007). Inhalación de humo de leña: una causa relevante pero poco reconocida de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Rev Am Med Resp.*, 12 (2): 21-57.
10. Salvi S y Barnes PJ. (2010). Is exposure to biomass smoke the biggest risk factor for COPD globally. *Chest.*, 138 (1): 3-6.
11. Torres CA, Caballero A, González GM, Jaramillo C y Maldonado D. (2013). Chronic obstructive pulmonary disease in people exposed to Wood smoke. Prepolcol: A population-based study. *Am J Respir Crit Care Med.*, 187: A364.

12. Organización Mundial de la Salud, OMS. (2016). Contaminación del aire de interiores y salud.
13. Romieu I, Riojas RH, Marrón MA, Schilmann A, Perez PR y Omar M. (2009). Improved biomass stove intervention in rural Mexico: impact on the respiratory health of women. *Am J Respir Crit Care Med.*, 180 (7): 649-656.
14. Dennis RJ, Maldonado D, Norman S, Baena E y Martinez G. (1996). Woodsmoke exposure and risk for obstructive airways disease among women. *Chest.*, 109 (1): 115-119.
15. Bølling AK, Totlandsdal AI, Sallsten G, Braun A, Westerholm R, Bergvall C, Boman J, Dahlman HJ, Sehlstedt M, Cassee F, Sandstrom T, Schwarze PE y Herseth JI. (2012). Wood smoke particles from different combustion phases induce similar pro-inflammatory effects in a co-culture of monocyte and pneumocyte cell lines. *Part Fibre Toxicol.*, 9 (45): 1-15.
16. Naeher LP, Brauer M, Lipsett M, Zelikoff JT, Simpson CD, Koenig JQ y Smith KR. (2007). Woodsmoke health effects: a review. *Inhal toxicol*, 19(1), 67–106.
17. Mehra D, Geraghty PM, Hardigan AA y Foronjy R. (2012). A Comparison of the Inflammatory and Proteolytic Effects of Dung Biomass and Cigarette Smoke Exposure in the Lung. *Plos One.* 7 (12).
18. Liu, Y. J., McIntyre, R. L., Janssens, G. E., & Houtkooper, R. H. (2020). Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mechanisms of ageing and development*, 186, 111-212.
19. Ghio, A. J., Soukup, J. M., Dailey, L. A., Tong, H., Kesic, M. J., Budinger, G. R. S. & Mutlu, G. M. (2015). Wood Smoke Particle Sequesters Cell Iron to Impact a Biological Effect. *Chemical Research in Toxicology*, 28(11), 2104-2111.
20. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*, 62(3), 341–360. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
21. Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>.
22. Kühlbrandt, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 13, 89 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
23. Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. Best practice & research. *Clinical endocrinology & metabolism*, 26(6), 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>

24. Popov, L-D (2020) Biogénesis mitocondrial: una actualización. *J Cell Mol Med*, 35(9): 4892– 4899. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15194>
25. Attardi G. & Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*, 4: 289-333.
26. Kuznetsov AV, Javadov S, Margreiter R, Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ. Analysis of Mitochondrial Function, Structure, and Intracellular Organization In Situ in Cardiomyocytes and Skeletal Muscles. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 18;23(4):2252. doi: 10.3390/ijms23042252. PMID: 35216368; PMCID: PMC8876605.
27. Cavalcante, G. C., Schaan, A. P., Cabral, G. F., Santana-da-Silva, M. N., Pinto, P., Vidal, A. F., & Ribeiro-dos-Santos, Â. (2019). A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4133. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20174133>
28. Pizzo, P., Drago, I., Filadi, R. & Pozzan, T. (2012) Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities. *Pflugers Arch*, 464, 3-17.
29. Martín, R. (2013) Enfermedades mitocondriales y biogenesis mitocondrial. Universidad Autónoma de Madrid.
30. Liu, Y. J., McIntyre, R. L., Janssens, G. E., & Houtkooper, R. H. (2020). Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mechanisms of ageing and development*, 186, 111212. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111212>
31. Zorzano, A., Segalés, J., Hernández-Alvarez, M.I., & Soriano, E. (2012). Dinámica mitocondrial y sus implicaciones en la desregulación metabólica y en la neurodegeneración.
32. Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical biochemistry*, 552, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>
33. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B., & Gelbard, H. A. (2011). *Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide*. *BioTechniques*, 50(2), 98–115. doi:10.2144/000113610
34. Sivandzade, F., Bhalerao, A. and Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-protocol* 9(1): e3128. DOI: 10.21769/BioProtoc.3128.
35. Organización Mundial de la Salud, OMS. (2014). La OMS establece parámetros para reducir los daños para la salud debidos a la contaminación del aire de interiores.

9. Vo. Bo. DEL CONTENIDO ACADEMICO

Julia Pérez R.

ASESOR INTERNO: Dra. Julia Pérez Ramos

Becerril/Berrocal Karina.

ASESOR EXTERNO: M. en C. Lilia Carina Becerril Berrocal