



INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

**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 extracto de humo de leña sobre la
dinámica mitocondrial.**

ALUMNO: Jaqueline Acevedo Brito

MATRÍCULA: 2182032115

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: 23-mayo-2022

FECHA DE TERMINACIÓN: 23-enero-2023

INDICE

1. ABREVIATURAS.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. MARCO TEÓRICO.....	8
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	23
7. RESULTADOS.....	28
8. DISCUSIÓN.....	36
9. CONCLUSIÓN.....	39
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	40

1. ABREVIATURAS

ADP: Adenosín Difosfato

ANT 1: Translocasa de Nucleótido de Adenina 1

ATCC: American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipos de Cultivo)

ATP: Adenosín Trifosfato

BAK: Gen codificador de proteínas

BAX: Proteína Proapoptótica de Mamíferos

BCL-2: Proteína Destructor del Antagonista Homólogo

cm: centímetro

CO₂: Dióxido de Carbonó

CS: Humo de Cigarro

ECS: Extracto de Humo de Cigarro

DRP 1: Proteína Relacionada con la Dinamina 1

EHL: Extracto de Humo de Leña

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

ETC: Cadena de Transporte de Electrones

FADH₂: Flavín Adenín Dinucleótido

FIS 1: Proteína de fisión 1

g: gramos

GC/MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

GTP: Guanosina Trifosfato

GTPasa: Trifosfatasas de Guanosina

HAP: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

IMM: Membrana Mitocondrial Interna

IMS: Espacio Intermembrana

mg: miligramo

mm: milímetro

MFF: Factor de Fisión Mitocondrial

MFN 1: Mitofusina 1

MFN 2: Mitofusina 2

MEC: Matriz Extracelular

mL: mililitro

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótida

nm: nanómetros

OMM: Membrana Mitocondrial Externa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPA 1: Atrofia Óptica 1

PINK 1: Quinasa 1 inducida por PTEN

pH: Potencial de Hidrogeno

PM: Material Particulado

RPM: Revoluciones Por Minuto

ROS: Especies Reactivas de Oxigeno

TCA: Ciclo del Ácido Tricarboxílico

TIM: Translocasa de la Membrana Interna

TOM: Translocasa de la Membrana Externa

U: unidad

UCP: Proteína Des acopladora

VDAC 1: Canal Aniónico Dependiente de Voltaje 1

WB: Western Blot

β: Beta

μg: microgramos

μm: micrómetro

μl: microlitro

μM: micro mol

2. INTRODUCCION

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 [33,57]. 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 [26]. Además, se ha reportado que el extracto de humo de leña induce estrés oxidante, favoreciendo la apoptosis de células epiteliales de pulmón humano [34]. 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 ERO 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 [19].

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 [20]. 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 (ERO), disminución en la producción de ATP y en algunas ocasiones induce apoptosis vía intrínseca [20].

A pesar de que diversos trabajos han demostrado que el EHL induce alteraciones en la función mitocondrial, incremento en la producción de ERO e incremento en la apoptosis vía intrínseca, aún se desconoce el efecto que induce directamente en la red mitocondrial y principalmente sobre las proteínas que se encargan de regular la biogénesis y dinámica 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 TEORICO

3.1 Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas EPOC.

La EPOC, es una afección pulmonar cuya principal característica es la disminución progresiva del flujo de aire en los pulmones. A medida que la enfermedad avanza, las dificultades en la respiración se vuelven más pronunciadas, la tos más persistente y se asocia con la presencia de una respuesta inflamatoria anormal en vías respiratorias por la exposición a partículas nocivas y gases [4,18,38]. La progresión de la enfermedad se relaciona con la remodelación, activación y degradación de los diversos componentes de la matriz extracelular (MEC). Desafortunadamente para los pacientes el diagnóstico de EPOC se realiza en etapas tardías, cuando ha avanzado la progresión de este padecimiento, debido a que las primeras etapas de la enfermedad suelen ser asintomáticas [5,7,18].

La EPOC es la cuarta causa de muerte a nivel mundial, mientras que la prevalencia de EPOC en países desarrollados cada vez aumenta en sujetos mayores de 50 años [24]. En países Latinoamericanos, la EPOC es una enfermedad sobresaliente por su morbi-mortalidad [64]. En México, datos del INEGI [23] ubican a este padecimiento en quinto lugar, mientras que en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), se ubicó en el cuarto lugar en la tabla de morbi-mortalidad anual [24].

El humo del cigarro es el factor de riesgo más frecuente para desencadenar y desarrollar enfermedades pulmonares tanto agudas como crónicas. Sin embargo, en la EPOC se reconoce la existencia de un porcentaje alto de pacientes con este padecimiento que nunca han fumado [40,52].

3.2 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 [25,53,61]. 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 [44]. 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 hogares como consecuencia del uso de combustibles sólidos para cocinar [49].

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 [14,61].

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) [10,41].

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 [14,61]. 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 [27]. Se ha evaluado que estas partículas participan en la inducción y el mantenimiento de un estado inflamatorio en las vías respiratorias [39].

3.3 Combustibles de Biomasa.

Los combustibles de biomasa están definidos como aquellos materiales renovables de origen animal o vegetal que son capaces de proporcionar energía, están presentes en un área específica. La madera o leña en forma silvestre, es el principal combustible de biomasa a nivel mundial, se utiliza de manera no procesada o como carbón. El estiércol de los animales y los residuos de las cosechas son menos utilizados, sin embargo, tienen un uso alto en zonas donde la madera es escasa [25]. Los combustibles de biomasa son extensamente utilizados para cocinar y para la calefacción de los hogares en países subdesarrollados. En las últimas décadas, se ha estimado que de 1.5 a 2 millones de muertes en el mundo son atribuibles a la contaminación dentro de los hogares, siendo la combustión de biomasa el principal factor [51].

La eficiencia de los combustibles está relacionada a la cantidad de materia requerida para generar un determinado nivel de calor. De esta manera, los combustibles más eficientes son aquellos que generan mayor calor y menor nivel de contaminación en el ambiente, pero tienden a ser más caros; mientras que, los combustibles de biomasa son considerados de baja eficiencia por generar altos niveles de productos tóxicos y baja capacidad para producir calor, éstos son económicos y de fácil acceso para la población [25].

3.4 ¿Qué es el humo de leña?

El humo de leña es un aerosol producido por la pirólisis de la madera a temperaturas elevadas y oxígeno reducido. El humo de leña generado consta de tres fases: compuestos en fase gaseosa, partículas de gotas líquidas y sólidos [60]. Este humo derivado de la combustión de biomasa procede principalmente de incineración doméstica e incendios forestales. Alrededor del 40% de la población mundial, especialmente en países en vía de desarrollo, utiliza combustibles sólidos,

sea carbón o biomasa (leña, residuos vegetales y estiércol), para cocinar o calentar sus hogares, pero sobre todo como principal fuente de energía [8].

3.5 Composición química del humo de leña

La madera se compone de polímeros como la celulosa y lignina, que dependiendo del tipo de madera la cantidad de éstos pueden variar [55]. También están presentes pequeñas cantidades de compuestos orgánicos de bajo peso molecular: resinas, ceras, azúcares y sales inorgánicas. Durante la combustión, se produce la pirólisis y los polímeros se rompen, produciendo una variedad de moléculas más pequeñas. La combustión de biomasa es típicamente ineficaz y una multitud de productos químicos orgánicos parcialmente oxidados se generan en el humo de leña [10,41].

Aún existe la creencia, principalmente en zonas rurales, de que la madera al ser un elemento natural no genera daños a la salud cuando se quema [41]. Sin embargo, se sabe que el humo generado de la combustión de leña contiene una gran cantidad de sustancias químicas, que incluyen: gases inorgánicos (el monóxido de carbono CO, dióxido de nitrógeno NO₂), HAP, compuestos orgánicos oxigenados aldehídos, fenoles o quinonas, radicales libres, material particulado; todos estos tóxicos para el aparato respiratorio [41]. Se estima que el humo emitido de la quema de leña contiene más de 400 compuestos orgánicos e inorgánicos, además del material particulado (PM) que pueden variar en función del tipo de madera, de las condiciones, dispositivos usados o fases de la combustión [10, 41]. Estudios epidemiológicos y experimentales proporcionan evidencia creciente de la importancia que tienen las características fisicoquímicas en los efectos biológicos inducidos por partículas y algunos otros compuestos químicos [9] ya que participan en la inducción de un estado inflamatorio en las vías aéreas. Las principales sustancias químicas que se encuentran presentes en el humo de biomasa se indican en la **tabla 1**, junto con algunas de sus principales características y afectaciones en la salud.

Hasta ahora se han identificado 40 ácidos, 22 alcoholes, 131 carbonilos, 22 ésteres, 46 furanos, 16 lactonas y 75 fenoles. El origen de los compuestos son los

polímeros de la leña y la reacción química inducida por el calor y productos intermedios como gases y humedad. Por lo tanto, la composición del humo variará según el tipo de madera utilizada para producir el humo, así como la temperatura y la humedad de la madera [60].

Table 1. Classes and examples of compounds predominant in wood smoke.

Class of compound	Examples
Acids	Acetic acid
Alcohols	Methanol, ethanol, isopropanol, furfuryl alcohol
Carbonyls (aldehydes)	Acetaldehyde, isovaleraldehyde, crotonaldehyde, diacetyl
Carbonyls (ketones)	Acetone, methyl vinyl ketone, acetol, 2-cyclopentnone, furfural, 5-methyl furfural, cyclotene
Esters	Methyl formate, methyl acetate
Furans	Furan, 2-methyl furan
Phenols	Phenol, 1,2-dimethoxybenzene, guaiacol, 4-methyl guaiacol, 4-ethyl guaiacol, eugenol, syringol, 4-methyl syringol, 4-ethyl syringol, 4-propyl syringol, vanillin

Tabla 1. Principales componentes del humo de leña. Se observan los componentes que predominan en el humo de leña como ácidos, alcoholes, carbonilos, esterres y fenoles.

3.6 Estructura de la mitocondria.

Las mitocondrias son los orgánulos celulares que generan la mayor parte de la energía química necesaria para activar las reacciones bioquímicas de la célula¹. Están dinámicamente interconectadas, lo cual les permite compartir membranas, solutos, metabolitos y proteínas. Cada mitocondria está organizada en dos bicapas de fosfolípidos: la membrana mitocondrial externa (OMM), la cual separa el espacio intermembrana del citosol y es mayormente permeable a iones, **(Figura1)**, está constituida por porinas como VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), que regula el paso de metabolitos, iones y nucleótidos [12] y proteínas transportadoras como la translocasa de la membrana externa (TOM) cuya función es permitir el movimiento de proteínas a través de esta

barrera y hacia el interior del espacio intermembranoso mitocondrial [31], por otro lado en la membrana mitocondrial interna (IMM) únicamente son permeables CO_2 , O_2 y H_2O , para permitir el paso de metabolitos como el ATP, ADP, piruvato, Ca^{2+} y fosfato, esto se lleva a cabo por la Translocasa de Nucleótido de Adenina (ANT) y por transportadores de fosfato [28], también se encuentra presente la translocasa de la membrana interna (TIM) cuya función es facilitar la translocación de proteínas a través de la membrana interna hacia la matriz mitocondrial. El compartimento delimitado por el IMM y el OMM se denomina espacio intermembrana (IMS), este se encuentra en un pH ácido debido al bombeo de protones que son generados a través de la cadena de transporte de electrones, este espacio también cuenta con proteínas cuya función principal es la recepción de electrones provenientes del bombeo de los complejos enzimáticos [45]. Las morfologías mitocondriales varían ampliamente entre los diferentes tipos de células, por ejemplo, las mitocondrias de fibroblastos suelen ser filamentos largos (de 1 a 10 μm de longitud con un diámetro constante de 700 nm). Sus formas cambian continuamente a través de las acciones de fisión y fusión [68].

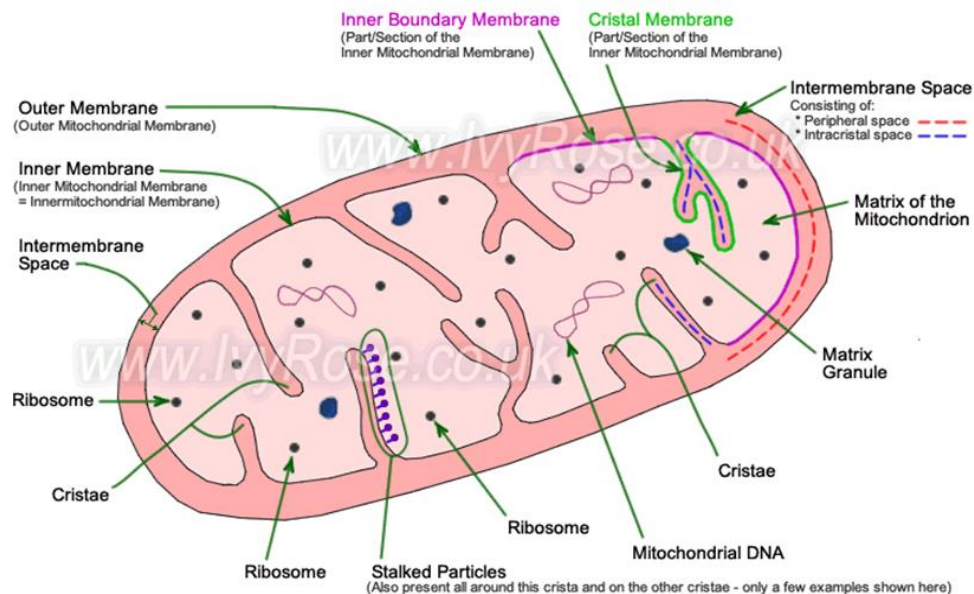


Figura 1. Estructura de la mitocondria. La imagen muestra que las mitocondrias tienen una forma ovalada y dos membranas: una externa, que rodea el todo el organelo, y una interna, con muchos pliegues hacia el interior llamados crestas que aumentan la superficie.

3.7 Funciones de la mitocondria.

Una de las funciones principales de las mitocondrias es la fosforilación oxidativa para producir ATP celular, pero también tienen papeles importantes en la homeostasis de iones, en varias vías metabólicas, en la apoptosis y muerte celular programada, y en la producción y consumo de ROS. Además, interviene en la respuesta celular ante diversos tipos de estrés fisiológico, así como procesos de proliferación celular y senescencia [46].

La función principal de las mitocondrias es la de generar ATP al utilizar la energía liberada durante la oxidación de los alimentos que comemos a través de la fosforilación oxidativa [11,16]. El ATP se utiliza a su vez como fuente de energía primaria para la mayoría de los procesos bioquímicos y fisiológicos, como el crecimiento, el movimiento y la homeostasis. La fosforilación se lleva a cabo a través de la cadena de transporte de electrones (ETC) que es un conjunto de proteínas y moléculas orgánicas incrustadas en la membrana, la mayoría de las cuales se organizan en un grupo de cinco complejos enzimáticos, I, II, III, IV y V, situados en la membrana mitocondrial interna. Los electrones donados por las coenzimas, NADH y FADH₂ en el ciclo del TCA son aceptados y transferidos a los componentes del ETC en el complejo I o II, y luego consecutivamente al complejo III, IV y finalmente al oxígeno. Esta transferencia de electrones a lo largo del ETC se acopla con el transporte de protones a través de la membrana interna, estableciendo el gradiente electroquímico que impulsa al complejo V a generar ATP [48]. En eucariotas, muchas copias de estas moléculas se encuentran en la membrana mitocondrial interna y los electrones pasan de un miembro de la cadena de transporte al siguiente en una serie de reacciones redox. La energía liberada en estas reacciones se captura como un gradiente de protones, el cual se utiliza a su vez para formar ATP en un proceso llamado quimiósmosis. En conjunto, la cadena de transporte de electrones y la quimiósmosis constituyen la fosforilación oxidativa [16].

Las mitocondrias también tienen varias funciones críticas en el metabolismo, son el actor central en el metabolismo del carbono, ayudan a la oxidación de

azúcares (piruvato), grasas (palmitoil carnitina) y proteínas (glutamina, glutamato, alanina, etc.), tienen un papel anabólico crítico, proporcionando los esqueletos de carbono para la biosíntesis de la mayoría de las biomoléculas, particularmente la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos [58]. Derivado de esto otra importante función es que es la principal productora de especies reactivas de oxígeno durante los procesos normales oxidativos del metabolismo, principalmente a través de las reacciones de óxido-reducción que ocurren en los complejos de transferencia de electrones y que tienen al oxígeno como el último aceptor de electrones [37].

En la muerte celular programada también son partícipes, juegan un papel clave en la activación de la apoptosis en células de mamíferos, activan las caspasas en el citosol a través de la liberación de citocromo c y otros factores del espacio intermembrana cuando los estímulos proapoptóticos desencadenan miembros de la familia Bcl-2 como Bak y Bax y el poro de transición de permeabilidad [56], estos regulan la liberación de proteínas desde el espacio entre la membrana mitocondrial interna y externa, una vez en el citosol, activan las caspasa proteasas que desmantelan las células y señalan la fagocitosis eficiente de los cadáveres celulares [65].

Adicionalmente, la mitocondria realiza procesos de fusión y de fisión. El primero de ellos consiste en la unión de las membranas externas e internas con la matriz mitocondrial para producir una mitocondria más grande. El proceso opuesto a la fusión, la fisión mitocondrial, es el encargado de crear pequeñas mitocondrias múltiples. El balance entre la fusión y la fisión mitocondrial es regulado en respuesta a diferentes estímulos como lo es la concentración de calcio intracelular [68].

3.8 Dinámica mitocondrial.

Las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos que experimentan ciclos coordinados de fisión y fusión denominados dinámica mitocondrial, para mantener su forma, distribución y tamaño. Estas adaptaciones morfológicas transitorias y rápidas son cruciales para muchos procesos celulares como el ciclo celular, la inmunidad, la apoptosis y el control de calidad mitocondrial [59].

La dinámica mitocondrial es una característica clave para la interacción de las mitocondrias con otros orgánulos dentro de una célula y también para el mantenimiento de su propia integridad. Se presentan diferentes tipos de dinámicas mitocondriales: la biogénesis mitocondrial, los eventos de fusión y fisión que establecen la coherencia dentro del condrioma y la formación y desintegración de las mitocondrias más conocido como mitofagia [6].

3.9 Biogénesis mitocondrial:

La biogénesis mitocondrial es un proceso por el que las mitocondrias crecen en número y tamaño. Las nuevas mitocondrias se producen agregando nuevo contenido (proteínas, membranas) a las mitocondrias preexistentes. Estas forman una red dinámica que puede cambiar de forma y tamaño. Estos cambios, conocidos como dinámica mitocondrial, están impulsados por dos procesos complementarios: la fisión y la fusión mitocondrial. A través de la fisión mitocondrial, se crean mitocondrias más pequeñas a las que se les puede agregar nuevo contenido mitocondrial en la biogénesis mitocondrial. Esta mitocondria mejorada puede volver a fusionarse con la red mitocondrial existente para crear una mitocondria más grande y alargada, que será más eficiente en la generación de energía celular y el resultado, es efectivamente, un aumento en la masa mitocondrial [1]. En la biosíntesis de las mitocondrias participa tanto el genoma nuclear como el mitocondrial. La biogénesis mitocondrial está mediada por estímulos fisiológicos que incluyen el ejercicio físico, las restricciones dietéticas, la temperatura y la miogénesis muscular [48].

La biogénesis mitocondrial está involucrada en el control del metabolismo celular, la transducción de señales y la regulación de la producción de ROS mitocondriales. Más del 95 % del O_2 consumido por las células se reduce en cuatro electrones para producir dos moléculas de H_2O a través de complejos de cadena de transporte de electrones mitocondriales (I–IV), con 1–2 % del flujo de electrones filtrándose en O_2 para formar O_2 en condiciones normóxicas. La producción de ROS mitocondrial está modulada por muchos factores, incluida la eficiencia de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, el contenido de antioxidantes

mitocondriales, el oxígeno local, disponibilidad de donantes metabólicos de electrones, actividad de la proteína des acopladora (UCP), citocinas y agonistas vasoactivos [12].

Las alteraciones en la biogénesis mitocondrial están asociadas con disfunción mitocondrial y estrés oxidativo mitocondrial. El deterioro de la actividad y/o la disminución de la expresión de los complejos I, III y IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se han relacionado con el envejecimiento vascular, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos neurológicos [12, 42]. Para el control de estas alteraciones llevan a cabo un proceso llamado mitofagia.

3.10 Mitofagia:

La mitofagia, un mecanismo de control de calidad mitocondrial que permite la degradación de las mitocondrias dañadas y superfluas previene tales efectos perjudiciales y restablece la homeostasis celular en respuesta al estrés. Una disminución funcional en la mitofagia da como resultado la acumulación de mitocondrias disfuncionales, un sello distintivo compartido del envejecimiento.

La mitofagia tiene una importancia especial en comparación con la eliminación de otros orgánulos por dos razones:

- Las mitocondrias son una de las principales fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (por lo tanto, también son los objetivos inmediatos del daño de ROS)
- Las mitocondrias disfuncionales que no se degradan pueden producir mayores cantidades de ROS, ser más susceptibles a la liberación de citocromo C y factor inductor de apoptosis y, por lo tanto, amplificar el daño de las ROS [50].

Estos dos argumentos son de especial importancia cuando se trata de una célula altamente sensible a ROS con baja capacidad antioxidante, como la célula β .

3.11 Procesos de Fusión y Fisión y proteínas implicadas.

La fisión y fusión mitocondrial juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las mitocondrias funcionales cuando las células experimentan estrés metabólico o ambiental [68]. Estos procesos están mediados por grandes trifosfatasa de guanosina (GTPasa), sus acciones combinadas dividen y fusionan las dos bicapas lipídicas que rodean a las mitocondrias[29]. Estos dos eventos se contrarrestan permanentemente; la inactivación de uno conduce a la acción sin oposición del otro y el desequilibrio posterior controla la estructura mitocondrial.

3.11.1 Fusión:

La fusión ayuda a mitigar el estrés al mezclar el contenido de las mitocondrias parcialmente dañadas como una forma de complementación. Este proceso está coordinado en las células de mamíferos por la Mitofusina 1 (MFN1), Mitofusina 2 (MFN2) en la membrana mitocondrial externa y por la atrofia óptica (OPA1) ubicada en la membrana mitocondrial interna [15].

Las mitofusinas son GTPasas de tipo dinamina que contienen dominios de unión a GTP catalíticos conservados en los extremos N y están anclados a la membrana mitocondrial externa mediante dominios transmembrana C-terminales[35]. La fusión de OMM está impulsada por la hidrólisis de GTP, que induce un cambio conformacional para poner en contacto las membranas opuestas entre sí [13].

OPA1 es una GTPasa similar a dinamina anclada a la membrana mitocondrial interna por un dominio transmembrana N-terminal y es responsable de la fusión de las membranas mitocondriales internas. Además de OPA 1, la cardiolipina, un lípido específico de la mitocondria es fundamental para la fusión en la membrana mitocondrial interna, ya que permite el intercambio de contenidos mitocondriales entre mitocondrias adyacentes, lo que facilita la complementación funcional [35].

La fusión mitocondrial tiende a conducir a un aumento en la eficiencia bioenergética, manteniendo la producción de ATP, incluso con nutrientes limitados

y por lo tanto permitiendo que la célula mantenga la viabilidad. Por el contrario, la fisión es necesaria para crear nuevas mitocondrias y también contribuye al control de calidad al permitir la eliminación de mitocondrias dañadas y puede facilitar la apoptosis durante altos niveles de estrés celular [46].

3.11.2 Fisión:

La fisión está mediada por una proteína relacionada con la dinamina pro-fisión (DRP1), una proteína citosólica que al activarse se transloca a la membrana mitocondrial externa [54,68]. La constricción de la membrana mitocondrial externa comienza en los sitios de contacto mitocondria - retículo endoplásmico, antes de la oligomerización de DRP1. Después varias proteínas que están unidas a la mitocondria ayudan en el reclutamiento de DRP1, así la DRP1 crea una estructura en forma de anillo que se contrae y divide a la organela. DRP1 se dirige activamente a la membrana mitocondrial externa a través de proteínas receptoras no GTPasas, tales como la proteína de fisión mitocondrial 1 (FIS1), el factor de fisión mitocondrial (MFF) y el factor de elongación mitocondrial [54,63]. Si bien FIS1 no es necesaria para el reclutamiento de DRP1 en la membrana mitocondrial externa, FIS1 puede inducir la fragmentación mitocondrial en ausencia de DRP1, esto lo logra tanto activando la fisión como inhibiendo la fusión, lo que demuestra lo conectados que están los procesos de fisión y fusión. Por el contrario, el mecanismo de división de la membrana mitocondrial interna aún no está claro, 15 sugiere que la constricción de la membrana interna es dependiente de Ca^{2+} y ocurre en los sitios de contacto mitocondria - retículo endoplásmico, pero aún se necesitan más estudios para confirmar estos resultados. Cabe señalar que tanto DRP1 como sus receptores también se localizan en las membranas peroxisomales donde realizan la fisión de la membrana, DRP1 puede activarse y desactivarse mediante la fosforilación, según el residuo fosforilado y puede regularse por una serie de factores como el ejercicio y el ritmo cardíaco. En la **figura 2** podemos observar el comportamiento de los procesos de fisión y fusión.

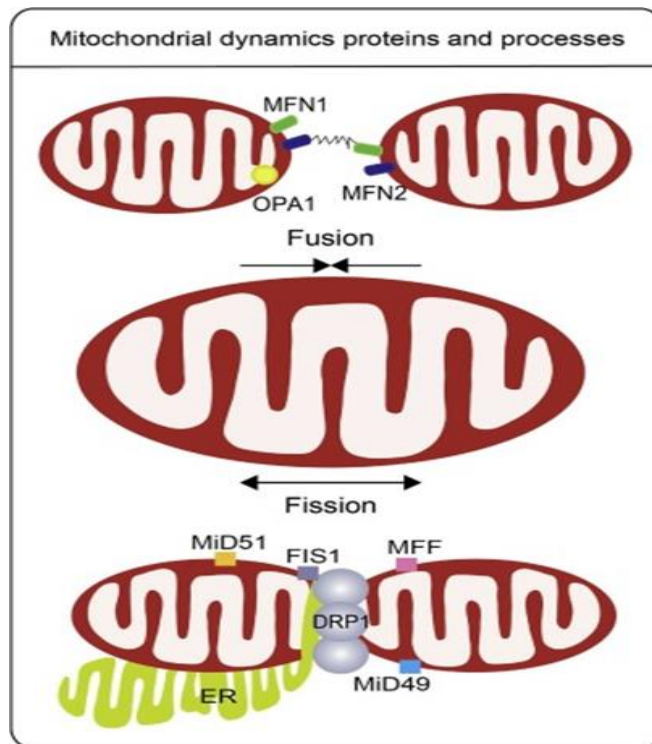


Figura 2. Fisión y Fusión mitocondrial. Modelo simplificado de fusión y fisión mitocondrial en células humanas. La fusión une dos mitocondrias, mientras que la fisión separa una en dos.

3.12 Enfermedades asociadas 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 [35], el trabajo va centrado al estudio de estos procesos en enfermedades pulmonares relacionadas con el extracto de humo de leña.

En un análisis de estudios epidemiológicos, tres patologías respiratorias se encontraron fuertemente asociadas con la exposición a este tipo de combustible:

las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior en niños menores de 5 años, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el cáncer de pulmón por exposición al humo [3]. Como se mencionó, la exposición crónica al humo de leña es un factor de riesgo para el desarrollo de EPOC, en algunas zonas del mundo este factor puede ser aún más importante que la exposición al humo de tabaco, sobre todo en zonas rurales en donde su principal fuente de energía es la biomasa [62].

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 [17].

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 encontramos que CS 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. CS también causó aumento del estrés oxidativo mitocondrial y reducción de la respiración mitocondrial [66]. Todo esto podría estar relacionado con los efectos del humo de leña sobre la dinámica mitocondrial.

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 [43].

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 [17]. 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

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de extracto de humo de leña sobre la expresión de proteínas implicadas en los procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial en fibroblastos derivados de pulmón normal. Específicamente los cambios en los niveles de las proteínas asociadas con los procesos de Fusión y Fisión mitocondrial (MFN1, FIS1, DRP1 y PINK1) y determinar si el extracto de humo de leña induce cambios morfológicos y/o estructurales en la red mitocondrial.

5.2 Objetivos específicos

1. Establecer un modelo agudo de exposición al extracto de humo de leña en cultivos de fibroblastos de pulmón humano normal.
2. Determinar por WB los niveles de proteínas implicadas en los procesos de dinámica mitocondrial.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 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 incineraron completamente 5 g de madera 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 de Kitasato de 500 mL, que a su vez se conectó a la bomba de vacío. El humo se burbujearon 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 limitar la variabilidad entre experimentos, se elaboraron alícuotas del extracto del humo de leña (EHL) que se almacenaron en el ultracongelador a una temperatura de -70 °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.

6.2 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.

6.3 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%, 2.5% y 5%, las cuales fueron probadas para realizar el ensayo.

6.4 Obtención y cultivo de fibroblastos humanos.

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.

Línea celular primaria N2 (obtenida de una lobectomía realizada en INER): 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), estreptomomicina (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. Medio de cultivo FGM2 Fibroblast Growth Medium 2, Marca PromoCell. Cat C-39320. Y con los siguientes 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 humanos de pulmón CCD-8, CCD-16, CCD-19 adquiridas al ATCC: Cultivadas en medio DMEM marca Gibco, suplementado con penicilina (100 µg/ml), estreptomycin (100 µg/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 (4-8).

6.5 Microscopia de campo claro

Se plaquearon tres pozos por línea celular (HPF, N2, CCD-8, CCD-16 y CCD-19) de entre 100,000 y 150,000 células por pozo, se dejaron adherir con sus respectivos medios por 24 h.

Pasadas las 24 horas se lavaron los pozos con medio F-12 libre de suero, se aspiró el suero y se adicionaron 2mL de las concentraciones preparadas de EHL (1%, 2.5% y 5%) en medio F-12 con suero al 10% y se utilizó como control un pozo sin extracto de EHL, se incubaron durante 24 horas.

Posteriormente los pozos se lavaron con medio F-12 sin suero dos veces, la segunda vez se dejó el medio para la toma de fotografías en el equipo EVOS XI (412743) para visualizar los cambios morfológicos en las células. Las fotografías fueron tomadas con el lente 10X.

6.6 Microscopia confocal

Se sembraron 10,000 fibroblastos por condición experimental en placas confocales, se dejaron adherir por 24 h. Se realizó una mezcla con 1 µl de Mitotracker Red (200 µM) y 1 µl de Hoechst 33342 (1.0 mM) más 998 µl de HBSS y se calentó durante 15 min a 37°C. Se lavaron las células 2 veces con HBSS sin rojo de fenol, se aspiró el buffer de las células y se aplicó la solución previamente preparada hasta cubrir todas las células adheridas, se incubaron durante 15 minutos a 37 °C, protegiendo de la luz. Y se tomaron las fotos con el equipo EVOS.

6.7 Cuantificación de proteínas y análisis de expresión por Western Blot.

Para la obtención de las proteínas celulares, los fibroblastos de pulmón humano normal fueron expuestos a diferentes concentraciones de extracto de humo de leña (1% y 2.5%) durante 24 horas.

Después de las 24 h, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X frío, y lisadas con 30 µl de buffer RIPA (PBS 1X, 1% de Nonidet P-40, 0.1% de SDS, 1% de desoxicolato de sodio) conteniendo un cocktail de inhibidores para proteasas de serina, proteasas de cisteína y aminopeptidasas (SIGMA) y 1mM de Phenylmethyl-Sulfonyl Fluoride (PMSF), las cajas se colocaron sobre una cama de hielo durante 10 minutos, transcurrido el tiempo las cajas de cultivo fueron raspadas con una espátula. El extracto celular fue transferido a tubos eppendorf de 1.5 ml y fueron sonicados. Posteriormente se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 min a una temperatura de 4°C, se recuperó el sobrenadante y este fue separado y conservado en alícuotas a -80°C.

La concentración de proteína se determinó mediante el reactivo de ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) que es un procedimiento para determinar la concentración de proteína solubilizada, 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. Las proteínas se mezclaron (V/V) con buffer Laemmli, se fraccionaron en condiciones reductoras en geles SDS-PAGE

al 12%. Se cargaron 30µg de proteína de cada muestra experimental. El gel se transfirió, a 100V durante 60 minutos, los sitios inespecíficos de unión en las proteínas se bloquearon por incubación con leche descremada al 5 % en buffer PBS-T (10mM Tris base, pH 8.0, 150mM de NaCl, y 0.05% Tween 20) por una hora a 37 °C. Después la membrana fue incubada 24 horas a 4 °C con el anticuerpo primario específico. En seguida la membrana se lavó 4 veces con TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl 0.1% Tween-20) durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se incubo 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario

Finalmente, la membrana fue revelada con el sistema de detección de quimioluminiscencia (West Pico Chemiluminescent Substrate, THERMO SCIENTIFIC), observando la banda en Molecular Imager ChemiDoc XRS+ BIO-RAD. En la **tabla 2** se muestran los anticuerpos primarios y secundarios que fueron utilizados en los experimentos.

Anticuerpo primario	Marca	No. de catalogo	Dilución
MFN 1	Santa Cruz	166644	1:100
FIS 1	Santa Cruz	376447	1:100
DRP 1	Santa Cruz	271583	1:100
PINK 1	Cell Signaling Technology	D8G3	1:1000
VDAC 1	Santa Cruz	390996	1:100

Anticuerpo secundario	Marca	No. de catalogo	Dilución
Mouse	Jackson ImmunoResearch	115035003	1:10000
Rabbit	Biologend	406401	1:2500

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios.

7. RESULTADOS

7.1 El EHL induce cambios en la morfología de fibroblastos de pulmón humano normal.

Diversos estudios han mostrado que la administración del EHL induce alteraciones en la tasa de viabilidad celular de células pulmonares [30,47]. Para poder determinar si el EHL induce cambios morfológicos en las diferentes líneas primarias de fibroblastos controles, evaluamos el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de EHL (1, 2.5 y 5%) después de 24 h. Nuestros resultados mostraron que la administración del EHL al 1% induce un incremento en el número de células con apariencia morfológica típica alargada de fibroblasto, mientras que en la concentración de 2.5% se observó una ligera reducción en el alargamiento del fibroblasto con una pequeña disminución del número de células. En la concentración más alta del 5% observamos que el EHL induce una reducción del tamaño celular adquiriendo una forma redonda anormal, con un incremento marcado de daño y muerte celular, por esta razón decidimos no incluir este porcentaje para los experimentos posteriores. En la **Figura 3** se muestran las imágenes de microscopía de campo claro, donde podemos visualizar el efecto de las distintas concentraciones del EHL sobre las diferentes líneas primarias de fibroblastos.

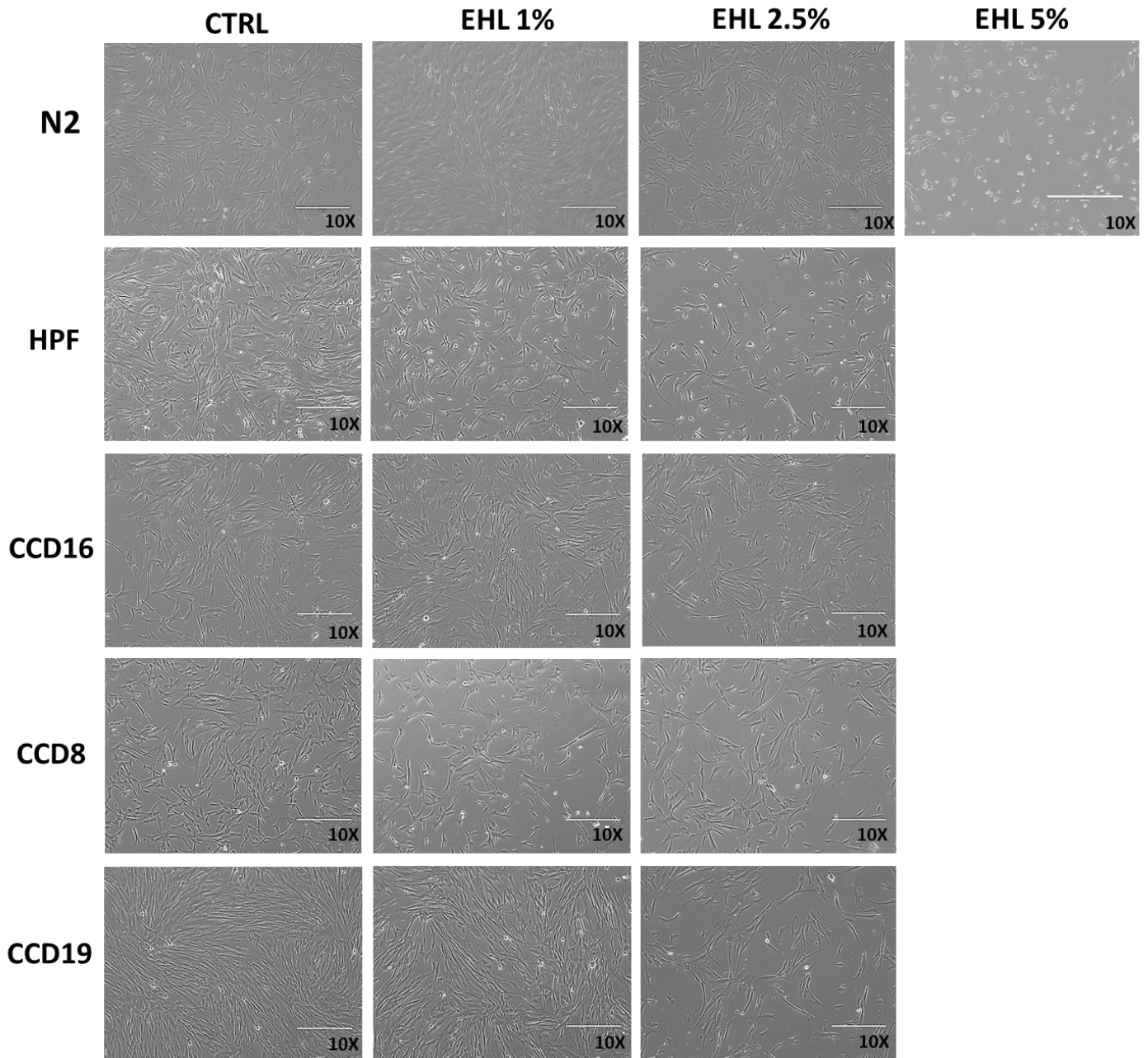


Figura 3. Efecto del EHL en fibroblastos normales de pulmón. Imagen representativa de campo claro de diferentes líneas de fibroblastos de pulmón humano normal (N2, HPF, CCD-16, CCD-8 y CCD19) después de la incubación con EHL (1, 2.5 y 5%) durante 24h.

7.2 El EHL induce cambios en la red mitocondrial con acumulación perinuclear de mitocondrias en fibroblastos de pulmón humano normal.

El EHL induce estrés oxidante en distintos tipos de células pulmonares y algunos estudios han mostrado que induce alteraciones en la función mitocondrial [6,47]. Para determinar si el EHL induce alteraciones en la red mitocondrial, se estimularon fibroblastos normales de pulmón con las diferentes dosis de EHL (1, 2.5 y 5%) durante 24 h, posteriormente los fibroblastos fueron teñidos con mitotracker red para poder visualizar la red mitocondrial y con Hoechst 33342 para observar el núcleo por microscopia confocal. Como se puede observar en la **Figura 4**, en los fibroblastos controles N2 sin estímulo, se puede apreciar una red mitocondrial continua con mitocondrias delgadas y alargadas que son visualizadas a lo largo de todo el fibroblasto, esta morfología también se puede observar en los fibroblastos que fueron tratados con 1% de EHL. Contrario a esto, los fibroblastos que fueron estimulados con las concentraciones de EHL 2.5 y 5%, presentaron una red mitocondrial fragmentada, con una marcada acumulación perinuclear de mitocondrias. Para poder observar a detalle la morfología mitocondrial, se tomaron fotografías con un aumento de 20X y 60X, en las cuales se observa que las mitocondrias se acumulan cerca del núcleo cuando son estimuladas con concentraciones altas de EHL.

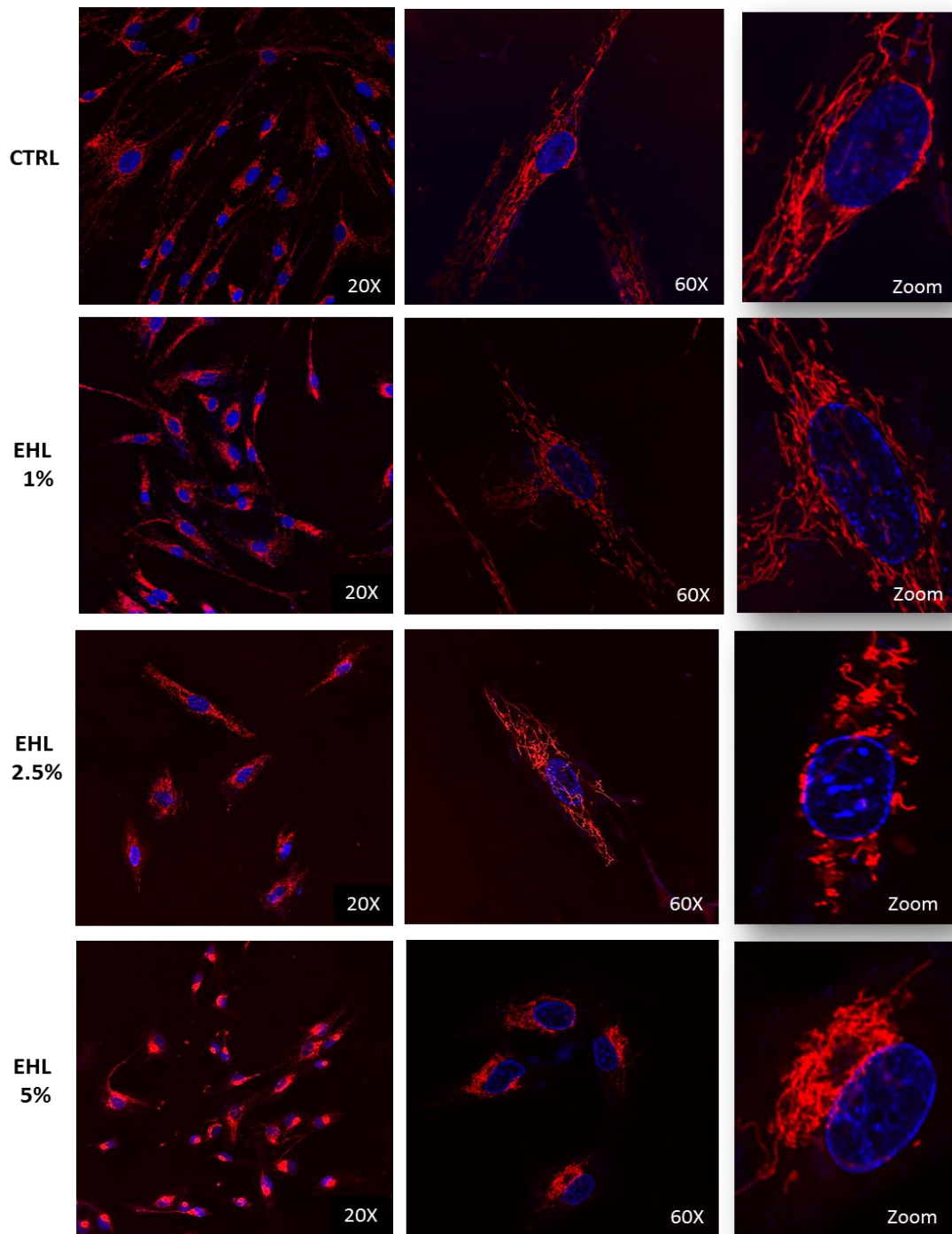


Figura 4. Efecto de EHL sobre la morfología de la red mitocondrial de fibroblastos N2 Imágenes representativas de los cambios de la red mitocondrial inducidos por diferentes concentraciones EHL (1, 2.5 y 5%), por la técnica de microscopía confocal. Las mitocondrias fueron teñidas con Mitotracker red (1 μ M) y el núcleo fue visualizado con la tinción de Hoechst 33342 (x). En la imagen se observa alteraciones en la red y acumulación mitocondriales alrededor del núcleo en los fibroblastos N2 al ser tratadas con 2.5 y 5% de EHL por 24 horas.

7.3 El EHL induce cambios en la expresión de proteínas asociadas con el proceso de biogénesis mitocondrial.

Debido a que encontramos que el EHL induce cambios en la red mitocondrial, decidimos analizar la expresión de proteínas asociadas a los procesos de biogénesis mitocondrial en los fibroblastos estimulados con EHL (1% y 2.5%). Para ello se realizaron extractos de proteína total aislada de fibroblastos controles y estimulados con las diferentes dosis de EHL. Nuestros resultados mostraron que el estímulo con EHL modifica los niveles de expresión de las proteínas implicadas en los procesos de fisión y fusión mitocondrial. Como se observa en la **Figura 5** la expresión de la proteína MFN 1 incrementó en 3 líneas de fibroblastos normales (N2, CCD16 Y CCD19), donde se observa un efecto dosis dependiente, siendo más evidente en la concentración de 2.5%. De manera contraria observamos una disminución de esta proteína en las líneas (HPF y CCD8).

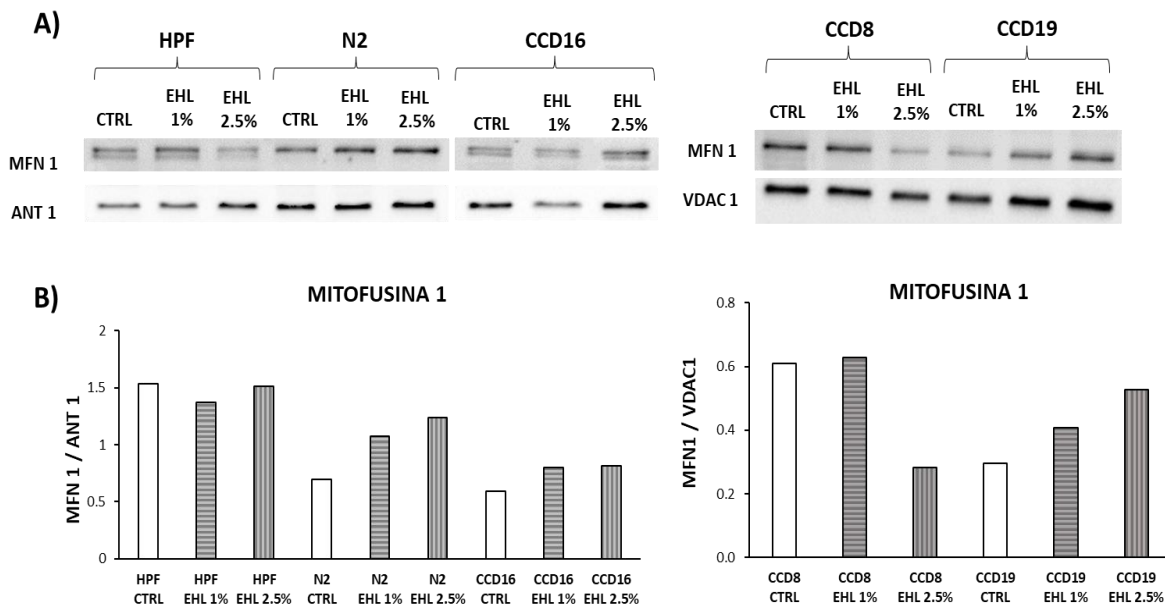


Figura 5. Efecto del EHL sobre los niveles de expresión de la proteína MFN 1. A) Efecto del EHL a 1 y 2.5% sobre la expresión de MFN1 en diferentes líneas de fibroblastos normales (HPF, N2, CCD16, CCD8 y CCD19) normalizado con control de carga mitocondrial (VDAC1 y/o ANT1). B) Gráficas que muestran el análisis densitométrico de la expresión de la proteína MFN1.

Por otro parte, analizamos la expresión de la proteína FIS1 implicada en la fisión mitocondrial. Nuestros resultados mostraron que la expresión de FIS1 se encuentra incrementada de manera significativa en fibroblastos estimulados con el EHL al 2.5% en las líneas CCD-16 Y CCD-19, mientras que su expresión se ve disminuida en las líneas HPF y CCD8. De manera interesante, encontramos que en los fibroblastos controles N2, no se observa la expresión de dicha proteína, tal como se muestra en la **Figura 6**.

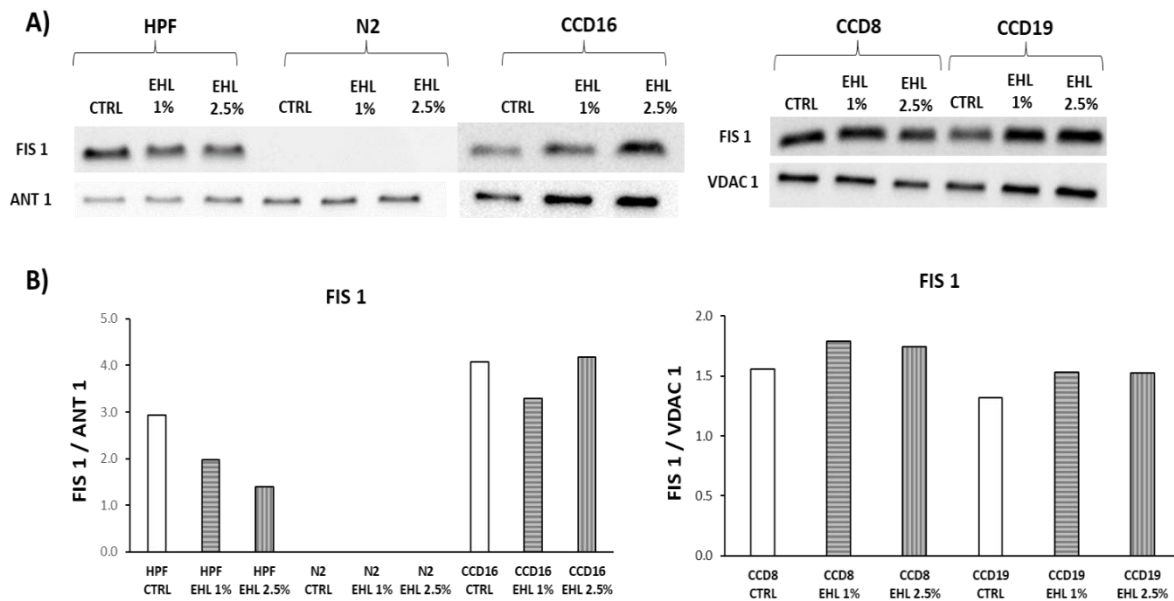


Figura 6. Efecto del EHL sobre los niveles de expresión de la proteína FIS 1.
 A) Efecto del EHL a 1 y 2.5% sobre la expresión de FIS 1 en diferentes líneas de fibroblastos normales (HPF, N2, CCD16, CCD8 y CCD19) normalizado con control de carga mitocondrial (VDAC1 y/o ANT1). B) Gráficas que muestran el análisis densitométrico de la expresión de la proteína FIS 1.

Por otra parte, decidimos analizar cómo se encontraban los niveles de expresión de la proteína DRP-1, proteína implicada en el proceso de fisión. Como se muestra en la **figura 7** podemos observar que la expresión de esta proteína no muestra diferencia significativa en ninguna de las líneas celulares.

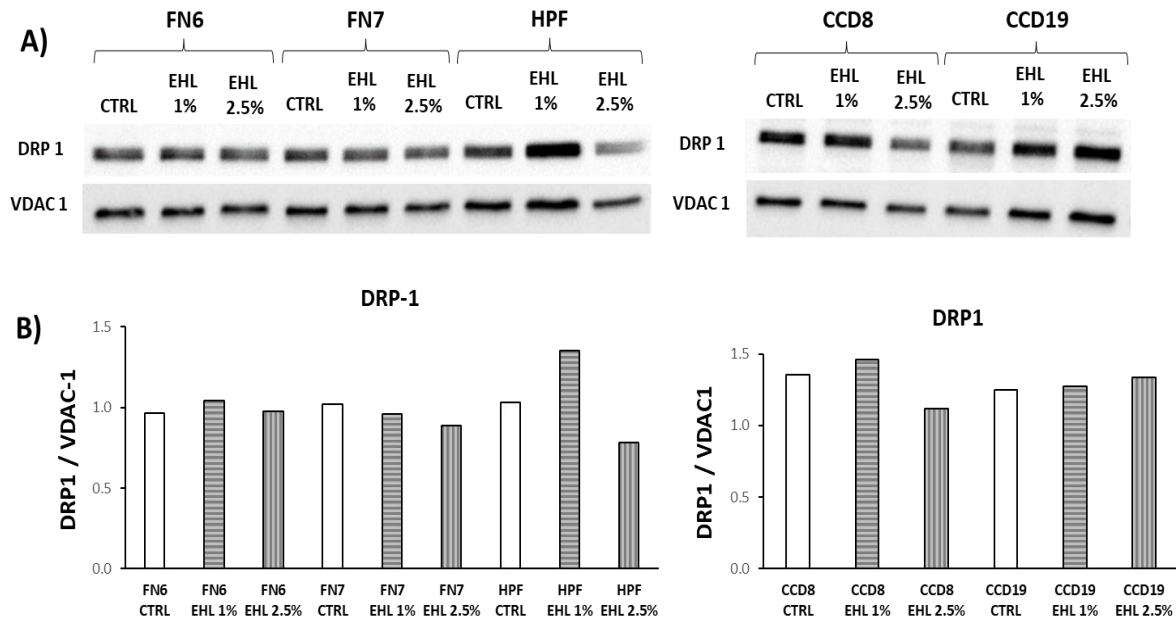


Figura 7. Efecto del EHL sobre los niveles de expresión de la proteína DRP1. A) Efecto del EHL a 1 y 2.5% sobre la expresión de DRP 1 en diferentes líneas de fibroblastos normales (HPF, N2, CCD16, CCD8 y CCD19) normalizado con control de carga mitocondrial VDAC-1. B) Gráficas que muestran el análisis densitométrico de la expresión de la proteína DRP 1.

PINK 1 es una proteína que regula el recambio mitocondrial y, por lo tanto, protege a las mitocondrias del estrés [21], por lo cual es importante realizar estudios para analizar el comportamiento de esta proteína en las diferentes líneas celulares cuando fueron sometidas a humo de leña, pues ya se sabe que el humo de leña produce estrés oxidante. Tal como se puede observar en la **figura 8**, los resultados muestran que PINK 1 disminuye en todas las líneas celulares a concentración de 2.5%, aunque al 1% parece ser que hay un pequeño aumento.

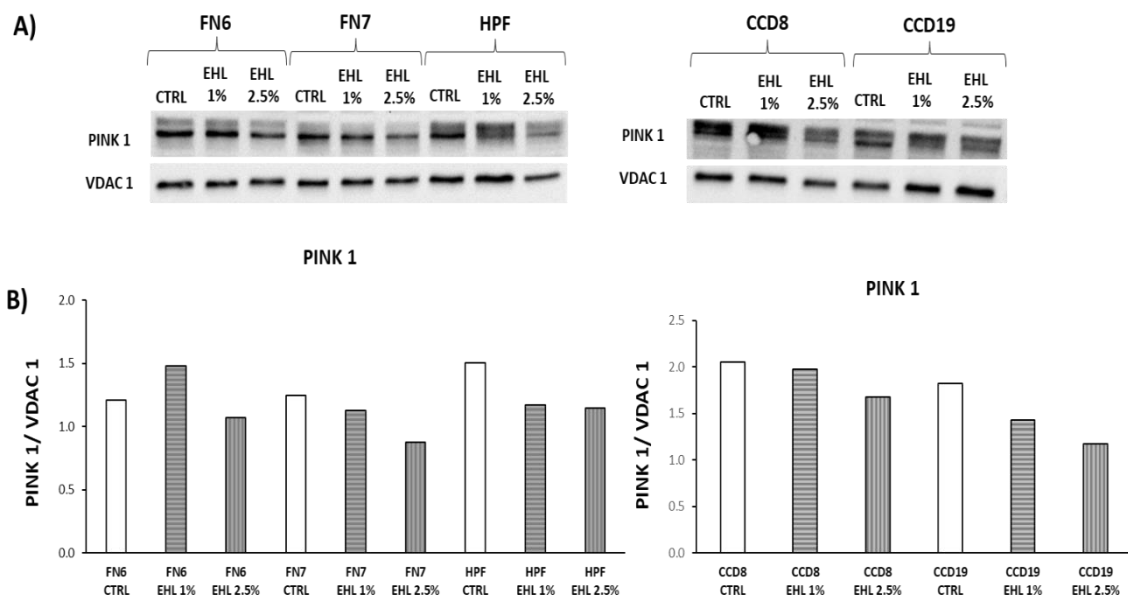


Figura 8. Efecto del EHL sobre los niveles de expresión de la proteína PINK 1. A) Efecto del EHL a 1 y 2.5% sobre la expresión de PINK 1 en diferentes líneas de fibroblastos normales (HPF, N2, CCD16, CCD8 y CCD19) normalizado con control de carga mitocondrial VDAC-1. B). Las gráficas muestran el análisis densitométrico de la expresión de la proteína PINK 1.

8. DISCUSIÓN

Diversos estudios han mostrado que la exposición crónica al humo de leña es un factor de riesgo para el desarrollo de EPOC [32,62]. 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 [2,67]. Estudios previos han observado que la exposición al EHL en cobayos induce disfunción mitocondrial en células totales de pulmón [19]. 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 morfológicas en los fibroblastos de pacientes sanos. Un hallazgo importante en nuestro trabajo fue que los fibroblastos expuestos al EHL a las concentraciones de (2.5 y 5%) mostraron fragmentación de la red mitocondrial, la cual fue acompañada de acumulación perinuclear de mitocondrias. 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 la expresión de proteínas implicadas en los procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial específicamente en los procesos de fusión y fisión mitocondrial en fibroblastos de pulmón normal y 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 fragmentación de la red y acumulación perinuclear de mitocondrias a las dosis de 2.5%, teniendo un efecto más prominente a la dosis de 5%. Este efecto de acumulación perinuclear ya había sido reportado antes por Tanveer Ahmad y colaboradores quienes también observaron que la administración de extracto de humo de cigarro induce acumulación perinuclear de mitocondrias en fibroblastos y células epiteliales.

Por otro parte la expresión de las proteínas implicadas en la biogénesis mitocondrial mostro en los análisis por western blot lo siguiente; respecto a la proteína Mitofusina 1, se observa que las líneas celulares N2, CCD-16 y CCD-19 tuvieron un aumento progresivo en sus niveles de expresión de esta proteína al aumentar la concentración de humo de leña, lo cual podría indicar que el EHL induce la activación del proceso de fusión para que la célula pueda mantener las cantidades de ATP necesarias para llevar a cabo sus funciones vitales, ya que se ha reportado que la fusión mitocondrial conduce a un aumento en la eficiencia bioenergética, y a que la célula sigue manteniendo su viabilidad y ayuda a disminuir el estrés debido a que las mitocondrias dañadas parcialmente mezclan su contenido con las mitocondrias sanas como una forma de complementación [68]. Por otro lado, las líneas celulares CCD-8 y HPF muestran el efecto contrario una disminución en los niveles de MFN1 y se ha reportado que la eliminación de esta proteína provoca una disminución del consumo de oxígeno, aumenta la fuga de protones, por lo cual aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno [35].

Los resultados obtenidos al estimular los fibroblastos con EHL y medir la expresión de la proteína FIS 1 mostraron un incremento de esta expresión en las líneas celulares CCD-16 y CCD-19, una disminución en las líneas HPF y CCD-8 y

expresión nula en las células N2, esto podría deberse a que la línea N2 sean células senescentes, ya que se ha visto de acuerdo con Jasmine J y colaboradores que las células senescentes reducen la expresión de FIS 1 y que hay niveles de proteína MFN ligeramente aumentados lo cual concuerda con nuestros resultados. También podría deberse a que esta línea celular es una línea primaria que se estuvo trabajando en pasajes más elevados. Mientras que en las líneas HPF y CCD-8 podría estar ocurriendo lo mismo, al haber una eliminación de FIS 1 se está produciendo mayor estrés replicativo y las células comienzan a hacerse senescentes, dejan de dividirse y entran a un estado de reposo hasta su muerte [35].

La elevada expresión de FIS 1 en células CCD-16 y CCD-19 demuestra que se está llevando a cabo el proceso de fisión mitocondrial, el cual es necesario para crear nuevas mitocondrias y también contribuye al control de calidad al permitir la eliminación de mitocondrias dañadas ya que puede facilitar la apoptosis durante altos niveles de estrés celular [67] como el que provoca el EHL.

En el caso de la proteína relacionada con la dinamina (DRP1) como se mostró en los resultados no hubo cambios significativos en ninguna línea celular y a ninguna concentración, se sabe que DRP1 influye de forma eficaz en la supervivencia celular y la apoptosis al mediar el proceso de fisión mitocondrial [22], que no se presenten cambios podría estar ocurriendo debido a que el proceso de fisión ya está activo y quien lo está llevando a cabo es FIS 1. Ya que de acuerdo con Yasmine J. Liu y colaboradores, Fis 1 puede inducir la fragmentación mitocondrial en ausencia de DRP1 y es por eso por lo que esta proteína no se está activando, podría ser que, en ausencia de FIS, DRP1 si mostrara cambios en sus niveles de expresión, pero para poder observar esto se tendría que llevar a cabo otro experimento.

En los resultados que se obtuvieron respecto a la proteína PINK 1 podemos observar que su expresión disminuye a una concentración de 2.5% mientras que la concentración de 1% se nota más elevada, esto puede deberse a que normalmente las mitocondrias dañadas se reparan mediante un proceso llamado mitofagia, que es inducido por la supuesta quinasa 1 inducida por PTEN (PINK) que lo que hace es proteger a las mitocondrias del estrés [21], lo cual podría suponer que a la

concentración de 1%, PINK está llevando a cabo reparación mitocondrial, por lo cual se ve más expresada, pero al aumentar los niveles de EHL hay una alteración morfológica que impide a PINK eliminar mitocondrias dañadas es decir se produce una inhibición de la mitofagia por perdida de PINK 1 y esto conduce a una acumulación de mitocondrias disfuncionales y compromete la resistencia a varios tipos de estrés [35].

9. CONCLUSIÓN

El EHL genera efectos sobre la expresión de proteínas que están implicadas en los procesos de biogénesis mitocondrial específicamente en proteínas asociadas con los procesos de fusión y fisión mitocondrial (MFN1, FIS 1, DRP 1 y PINK 1) en fibroblastos derivados de pulmón normal. En consecuencia, se mostró que el EHL induce cambios morfológicos como la fragmentación mitocondrial y acumulación perinuclear cuando los fibroblastos fueron expuestos a concentraciones de 2.5% y que a concentraciones más elevadas de EHL se genera muerte celular.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adaes S, PhD. (s. f.). What is Mitochondrial Biogenesis? Benefits & Effects. Neurohacker Collective.
2. Ahmad T, Sundar I. K, Lerner C. A, Gerloff J, Tormos A. M, Yao H, Rahman I. (2015). Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(7), 2912–2929.
3. Andrea J & Legarreta G. (2006). Inhalación de humo de leña: una causa relevante pero poco reconocida de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Revista Americana de Medicina Respiratoria*, 7(2), 21-57.
4. Barnes PJ & Celli BR. (2009). Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J.*, 33 (5): 1165–1185.
5. Belvisi MG & Bottomley KM. (2003). The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res.*, 52 (3):95-100.
6. Bereiter-Hahn J. & Jendrach M. (2010). Dinámica mitocondrial [ScienceDirect]. En *Revista Internacional de Biología Celular y Molecular* (Vol. 284, pp. 1-65).
7. Bonnans C., Chou, J y Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 15 (12): 786–801.
8. Bonjour S, Adair-Rohani H, Wolf J, Bruce N, G Mehta, S, Prüss-Ustün A, Lahiff M, Rehfuess, E. A, Mishra V, & Smith K. R. (2013). Solid fuel use for household cooking: country and regional estimates for 1980-2010. *Environmental health perspectives*, 121(7), 784–790.
9. Bølling AK, Pagels J, Yttri K. E, Barregard L, Sallsten G, Schwarze P. E & Boman C. (2009). Health effects of residential wood smoke particles: the importance of combustion conditions and physicochemical particle properties. *Particle and fibre toxicology*, 6, 29.

10. 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.
11. Brand M. D, Orr A. L, Perevoshchikova I. V, & Quinlan C. L. (2013). The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *The British journal of dermatology*, 169 Suppl 2(0 2), 1–8.
12. Camara A. K. S, Zhou Y, Wen P. C, Tajkhorshid E & Kwok W. M. (2017). Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Frontiers in Physiology*, 8.
13. Cao Y. L., Meng S, Chen Y, Feng J. X, Gu D. D, Yu B, Li Y. J, Yang J. Y, Liao S, Chan D. C. & Gao S. (2017). MFN1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature*, 542(7641), 372-376.
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. F. Malka , O. Guillery , C. Cifuentes-Diaz , E. Guillou , P. Belenguer , A. Lombes , M. Rojo. (2005). Fusion separada de las membranas mitocondriales externas e internas *EMBO Rep.* 6, págs. 853 – 859
16. Fosforilación oxidativa (artículo). (s. f.). Khan Academy.
17. 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.
18. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD. (2017). Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD).
19. Granados-Castro, L. F., Rodríguez-Rangel, D. S., Montañó, 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

20. Hara H, Kuwano K, Araya J. (2018). Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF. *Cells*. 24;7(8): 86.
21. Hoffmann, R. F., Zarrintan, S., Brandenburg, S. M., Kol, A., de Bruin, H. G., Jafari, S., Dijk, F., Kalicharan, D., Kelders, M., Gosker, H. R., ten Hacken, N. H., van der Want, J. J., van Oosterhout, A. J., & Heijink, I. H. (2013). Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respiratory Research*, 14(1), 97.
22. Hu, C., Huang, Y., & Li, L. (2017). Drp1-Dependent Mitochondrial Fission Plays Critical Roles in Physiological and Pathological Progresses in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 144.
23. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI. (2016). Estadísticas de Mortalidad.
24. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER. (2016). Clínica de EPOC.
25. 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.
26. Kimmel EC, Still KR. (1999). Acute lung injury, acute respiratory distress syndrome and inhalation injury: an overview. *Drug Chem Toxicol*. 22(1): 91-128.
27. Knaapen AM, Borm PJ, Albecht C y Schins RP. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A. Mechanisms *Int J Cancer.*, 109 (6):799-809.
28. Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes - *BMC Biology*. BioMed Central.
29. Labbé, K., Murley, A., & Nunnari, J. (2014). Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 357–391.

30. Lee TS, Liu YJ, Tang GJ, Yien HW, Wu YL, Kou YR. (2008). Wood smoke extract promotes both apoptosis and proliferation in rat alveolar epithelial type II cells: the role of oxidative stress and heme oxygenase-1. *Crit Care Med.* 36(9): 2597-2606.
31. Lemeshko, V. V. (2018). El papel de la membrana mitocondrial externa en el control del metabolismo energético celular | *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.*
32. Leng, S., Picchi, M. A., Meek, P. M., Jiang, M., Bayliss, S. H., Zhai, T., Bayliyev, R. I., Tesfaigzi, Y., Campen, M. J., Kang, H., Zhu, Y., Lan, Q., Sood, A., & Belinsky, S. A. (2022). Wood smoke exposure affects lung aging, quality of life, and all-cause mortality in New Mexican smokers. *Respiratory research*, 23(1), 236.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Lopez, M, Mongilardi N, & Checkley W. (2014). Enfermedad pulmonar obstructiva crónica por exposición al humo de biomasa. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(1), 94-99.
37. Macedo-Márquez, Alain. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15(2), 97-103.
38. Mannino DM. (2003). Chronic obstructive pulmonary disease: definition and epidemiology. *Respir Care.*, 48 (12):1185-1191.

39. 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).
40. Montserrat C, J., Godoy, P., Marsal, J. R., Ortega, M., Barbé, F., Castañ, M. T., Seminario, M. A., Pujol, J., & Alsedà, M. (2019). Prevalencia y características de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en no fumadores [Prevalence and characteristics of chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers]. *Atencion primaria*, 51(9), 589–590.
41. 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.
42. Neupert W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annual review of biochemistry*, 66, 863–917.
43. 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.
44. Organización Mundial de la Salud, OMS. (2016). Contaminación del aire de interiores y salud.
45. Osorio, U. R. (2022). Mitochondrias: función y estructura. *Ecología verde*.
46. Popov L. D. (2020). Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(9), 4892–4899.
47. Recillas-Román S, Montañó M, Ruiz V, Pérez-Ramos J, Becerril C, Herrera I, Amador-Muñoz O, Martínez-Domínguez YM, Ramos C. (2021). Wood Smoke Extract Promotes Extracellular Matrix Remodeling in Normal Human Lung Fibroblasts. *Int J Toxicol*. 40(6): 506-516.
48. Rhian M. Touyz. (2012). Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress. *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)*. Academic Press, pp 335-338.
49. Romieu I, Riojas RH, Marrón MA, Schilman A, Pérez 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.

50. Rothermel, B. & Diwan, A. (2013). Autofagia en la homeostasis de las células β pancreáticas. En *Autofagia en Salud y Enfermedad* (2.a ed., pp. 89-100).
51. Sada, Ocaña G y Torre B. (2015). Humo de biomasa, inmunidad innata y *Mycobacterium tuberculosis*. *Neumol Cir Tora.*, 74 (2): 118-126.
52. Salvi S y Barnes PJ. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet.*, 374 (9691): 733–43.
53. Salvi S y Barnes PJ. (2010). Is exposure to biomass smoke the biggest risk factor for COPD globally. *Chest.*, 138 (1): 3-6.
54. Scott, I., & Youle, R. J. (2010). Mitochondrial fission and fusion. *Essays in biochemistry*, 47, 85–98.
55. Simoneit, B. R., Rogge, W. F., Lang, Q., & Jaffé, R. (1999). Molecular characterization of smoke from campfire burning of pine wood (*Pinus elliottii*). *Chemosphere - Global Change Science*, 2(1), 107-122.
56. Song Y. (2020). The role of mitophagy in innate immune responses triggered by mitochondrial stress - *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central.
57. 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.
58. Therapeutics P. (2020). La importancia de la mitocondria sobre la vida y la muerte celular. Pronacera Therapeutics, S.L.
59. Tilokani L., Nagashima S., Paupe V., & Prudent J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*, 62(3), 341–360
60. Toledo R.T. (2008). Wood Smoke Components and Functional Properties. In: D.E. Kramer and L. Brown 55 (eds.), *International Smoked Seafood Conference Proceedings*. Alaska Sea Grant College Program, Fairbanks, pp. 55-61.

61. 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.
62. Torres-Duque C. A., García-Rodríguez M. C. & González-García, M. (2016). Enfermedad pulmonar obstructiva crónica por humo de leña: ¿un fenotipo diferente o una entidad distinta? *Archivos de Bronconeumología*, 52(8), 425-431.
63. Van der Blik A. M., Shen Q., & Kawajiri S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6).
64. Venegas R.A y Sansores M. (2007). Panorama epidemiológico e impacto económico actual. *Neumología y Cirugía de Tórax.*, 66 (S2): S13-S16.
65. Wang C., & Youle R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual review of genetics*, 43, 95–118
66. Wang Z., White A., Wang X., Ko J., Choudhary G., Lange T., Rounds S., & Lu Q. (2020). Mitochondrial Fission Mediated Cigarette Smoke-induced Pulmonary Endothelial Injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 63(5), 637–651
67. Yao R. Q., Ren C., Xia Z. F., & Yao Y. M. (2021). Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles. *Autophagy*, 17(2), 385–401.
68. Youle R. J, & van der Blik, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), 1062–1065.