



Casa abierta al tiempo



INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÒN DE CIENCIAS BIOLÒGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÌMICA FARMACÈUTICA BIOLÒGICA**

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

**Efecto del extracto de humo de leña sobre la expresión
de proteínas en la fracción mitocondrial en fibroblastos
de pulmón humano normal**

ALUMNO:

Jaqueline Hurtado García

MATRICULA:

2183022702

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:

10/abril/2023

FECHA DE TERMINACIÓN:

10/octubre/2023

ASESOR INTERNO:

Dra. Julia Pérez Ramos

M. en C. Felipe Mendoza Pérez

INDICE

1. ABREVIATURAS	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. MARCO TEÓRICO	6
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
5. OBJETIVOS.....	17
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL	18
7. RESULTADOS	23
8. REFERENCIAS	23

1. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNm: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Trifosfato de adenosina

CR: Cadena respiratoria

CO₂: Dióxido de carbono

COX IV: Citocromo C oxidasa IV

DRP 1: Proteína Relacionada con la Dinamina 1

EHL: Extracto de Humo de Leña

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

FIS 1: Proteína de fisión 1

GST: Glutación S-transferasas.

GTP: Guanosina Trifosfato

GTPasa: Trifosfatasas de Guanosina

MEM: Membrana mitocondrial externa

MFF: Factor de fisión mitocondrial

MFN: Mitofusina

pH: Potencial de hidrogeno

PM: Material particulado

PINK 1: Cinasa 1 inducida por PTEN

VDAC 1: Canal aniónico dependiente de voltaje

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 oxidativo, 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, 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 especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) 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 [3].

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 [5]. 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 [5].

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 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 TEÓRICO

3.1 ¿Qué es el humo de leña?

El humo de leña es un aerosol producido por la pirolisis 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 sólidas. 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, sigue utilizando combustibles sólidos, sea carbón o biomasa (leña, residuos vegetales y estiércol), para cocinar o calentar los hogares [6].

3.2 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. Se encuentran 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 [7].

El humo de la leña es una compleja mezcla de sustancias volátiles constituidas por elementos orgánicos e inorgánicos. Los principales compuestos de la combustión de la madera son el monóxido de carbono, el dióxido de nitrógeno y el material particulado, todos ellos tóxicos para el aparato respiratorio. Se identificaron más de 200 compuestos químicos. La mayoría de ellos (más del 90%) se encuentra en el rango de partículas inhalables, con un diámetro menor a 10 micrones [6].

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. Se han identificado 40 ácidos, 22 alcoholes, 131 carbonilos, 22 ésteres, 46 furanos, 16 lactonas y 75 fenoles (**Figura 1**). El origen de los compuestos son los 12 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 [7].

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

Figura 1. Se describen las sustancias químicas presentes en el humo de biomasa.

3.3 Combustibles de Biomasa

La combustión de Biomasa es un proceso en el que el carbono y el hidrógeno contenidos en el combustible reaccionan con el exceso de oxígeno para formar CO₂ y agua para liberar calor. La Biomasa se refiere a cualquier materia orgánica, originada en un proceso biológico de animales o vegetales y sus derivados, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Dentro de estos se encuentra la madera, las ramas secas, el pasto, el estiércol y el carbón [8].

Los procesos de combustión son bien conocidos y existe una amplia variedad de tecnologías comerciales adaptadas a las características de la biomasa y a la escala de sus aplicaciones. Las plantas transforman la energía luminosa en energía química y retienen el dióxido de carbono para formar la biomasa. Toda la alimentación de las especies animales depende de un modo o de otro de esta

biomasa. Además, puede utilizarse directamente como materia orgánica en el tratamiento de suelos (por ejemplo, el uso de estiércol o de coberturas vegetales) [5].

Existen evidencias crecientes de que la exposición hogareña al humo de combustibles de biomasa genera enfermedades respiratorias, siendo los grupos más vulnerables las mujeres y los niños pequeños que son los que permanecen más tiempo dentro del hogar [9].

3.4 EPOC y su relación con el humo de leña

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un importante problema de salud pública y la mayor causa de morbilidad crónica en el mundo. Muchas personas sufren de esta enfermedad durante años y mueren prematuramente por ella o por sus complicaciones, es una enfermedad prevenible y tratable, con algunos efectos extrapulmonares significativos que pueden contribuir a la severidad en pacientes individuales. Su componente pulmonar es caracterizado por la limitación del flujo aéreo que no es totalmente reversible y usualmente progresivo. Esta obstrucción se asocia con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones y la vía aérea a partículas nocivas o gases [10].

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la tercera causa de muerte en el mundo, y en 2019 ocasionó 3,23 millones de defunciones. Casi el 90% de las muertes por EPOC en menores de 70 años se producen en países de ingreso nacional bruto (INB) per cápita mediano y bajo. La EPOC ocupa el séptimo lugar en enfermedades crónicas de todo el mundo, ya que las personas con dicha enfermedad tienen un mayor riesgo de padecer otros problemas de salud (medida por años de vida ajustados en función de la discapacidad) [11].

El humo del cigarrillo es el factor de riesgo más frecuente para la EPOC y su eliminación es un paso importante en la prevención y control de la misma. Sin embargo, otros factores de riesgo deben tenerse en cuenta, incluida la exposición laboral a polvos y productos químicos y la contaminación del aire por la biomasa en la cocina y calefacción en viviendas mal ventiladas [10].

La exposición crónica al humo de leña es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas zonas del mundo este factor puede ser más importante que la exposición al humo de tabaco, generalmente inhalado como humo de cigarrillo, como causa de EPOC.

El humo de biomasa es un importante factor de riesgo para EPOC considerando la masiva exposición global que existe. Los principalmente afectados son mujeres y niños, los últimos con predisposición al desarrollo de dicha enfermedad después de años de continuas exposiciones. Encontramos que, a pesar de las diferencias fisiopatológicas entre EPOC por tabaco y biomasa, la mayoría de las características clínicas, calidad de vida y, mortalidad son similares. Dado las repercusiones negativas atribuibles a este problema de salud pública, diversos investigadores han realizado ensayos de campo aleatorios utilizando diferentes diseños de cocinas mejoradas con ventilación al exterior para tratar de reducir la exposición a los productos derivados de la quema de leña y determinar la gama de reducciones potencialmente alcanzables y sus beneficios a largo plazo en la reducción de la carga mundial de EPOC, pero también para evaluar la posibilidad de que la EPOC relacionada con el humo de leña puede ser considerada un fenotipo de la EPOC [12].

3.5 La mitocondria estructura y función

Las mitocondrias son organelos celulares que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas, cuya principal función es la producción de la energía celular en forma de trifosfato de adenosina (ATP).

Esta producción de energía celular, se realiza por medio de la fosforilación oxidativa, llevada a cabo por la cadena respiratoria (CR) a nivel de la membrana interna (**Figura 2**). Dicha cadena está compuesta por cuatro complejos y dos moléculas que actúan a modo de nexo de unión, la coenzima Q y el citocromo C (Los electrones del complejo I y II se transportan por el acarreador móvil Q, que más tarde transportara estos mismos al complejo III, el cual los envía al citocromo C, finalmente este transportará los electrones al complejo IV). Dentro de la membrana

interna de las mitocondrias también se encuentra la ATP sintasa, encargada de la síntesis de ATP o fosforilación oxidativa en la respiración celular.

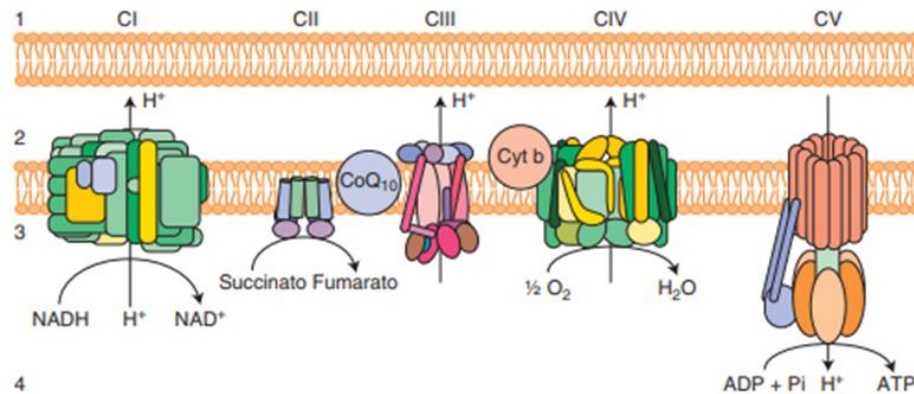


Figura 2. Cadena respiratoria mitocondrial. Está constituida por cuatro complejos; NADH-coenzima Q reductasa (CI), succinato-coenzima Q reductasa (CII), ubiquinol citocromo C reductasa (CIII), citocromo C oxidasa (CIV) y la ATP sintasa. 1. Membrana externa; 2. espacio intermembranoso; 3. membrana interna; 4. matriz mitocondrial.

Aunque de manera constante presentan a la mitocondria con una estructura básica, por lo general esta puede ser variable, (**Figura 3**). Dichos organelos están formados por la membrana mitocondrial externa (rica en porina que es una proteína de transporte que permite el paso de moléculas desde el citosol hacia el interior del espacio intermembranoso), el espacio intermembranoso, la membrana mitocondrial interna (contiene las proteínas de los transportadores de la cadena electrónica), las crestas y la matriz mitocondrial, en la que se encuentran iones, metabolitos y el ácido desoxiribonucleico mitocondrial (ADNm), capaz de replicar, transcribir y traducir la información genética que contiene [13,14].

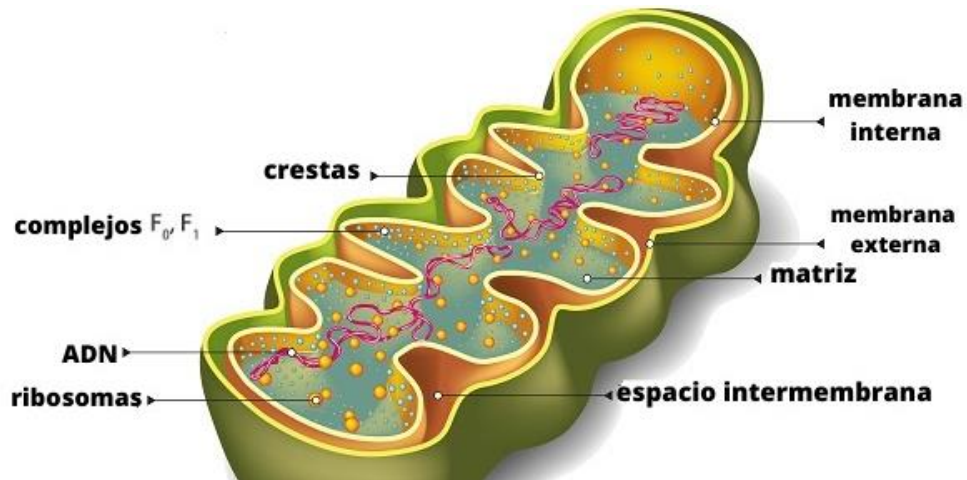


Figura 3. Estructura de mitocondria. Muestran una forma ovalada y dos membranas: una externa, que rodea el organelo, y una interna, con pliegues hacia el interior llamados crestas permitiendo el incremento de su superficie.

3.6 Importancia de la dinámica mitocondrial

Las mitocondrias participan en una variedad de procesos celulares, lo que indica que el control de su forma dinámica es probablemente multifuncional y su impacto en la actividad celular es muy diverso. Por ejemplo, los procesos de fusión y fisión (**Figura 4**).

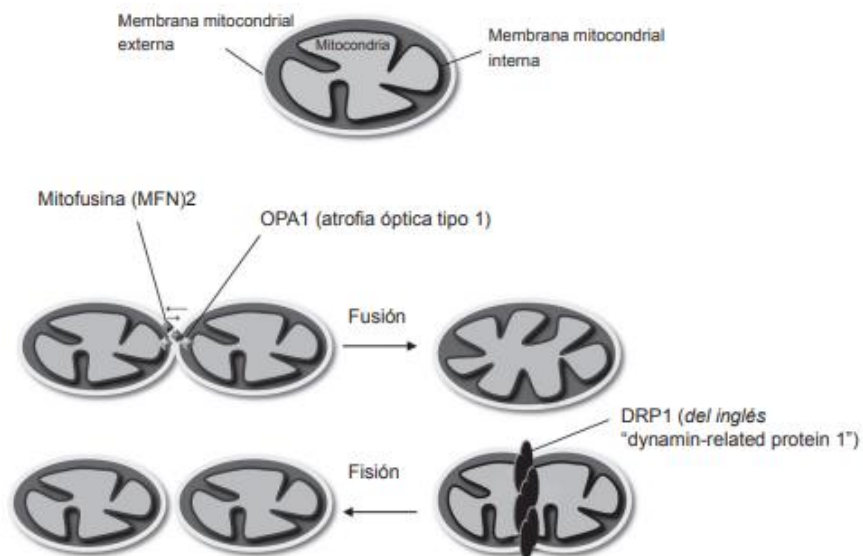


Figura 4. Fusión y fisión mitocondrial. Modelo simplificado de fusión y fisión mitocondrial en células humanas. La fusión une dos membranas y la fisión divide una membrana en dos.

Dichos procesos ocurren de manera permanente entre mitocondrias adyacentes con la finalidad de generar nuevas mitocondrias y permitir el transporte e intercambio de componentes entre mitocondrias (**Figura 5**), para favorecer el mantenimiento y distribución del ADN mitocondrial [15,16].

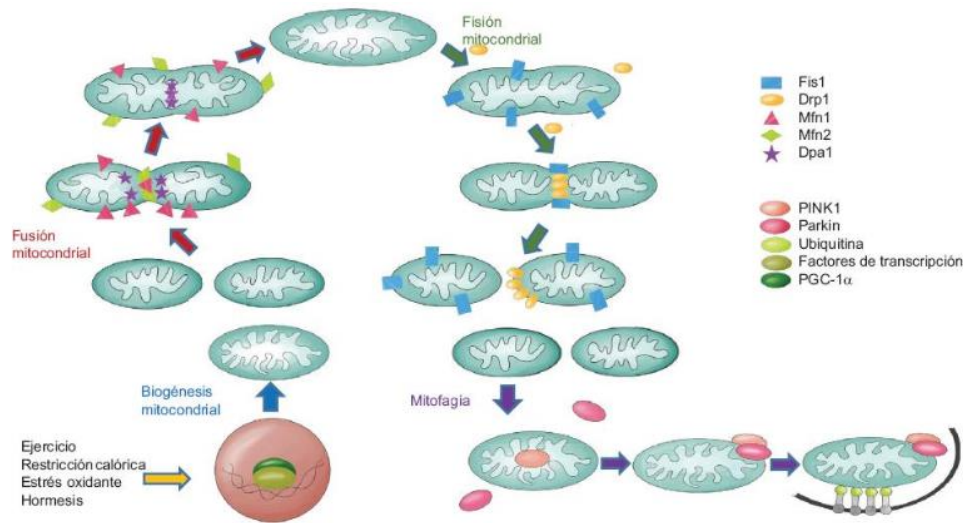


Figura 5. Dinámica mitocondrial. Modelo simplificado de fusión, fisión y mitofagia

El primero de ellos, denominado fusión, consiste en la unión de las membranas externas e interna con la matriz mitocondrial para generar una mitocondria más grande. En este proceso participan las proteínas denominadas mitofusinas (MFN) que son GTPasas localizadas en la membrana externa y los genes que codifican para ellas son Mfn1 y Mfn2 [17].

En cuanto a la fisión mitocondrial, esta depende de la proteína relacionada con dinamina (DRP1); en este proceso se crean pequeñas mitocondrias múltiples. El balance entre la fusión y la fisión mitocondrial es regulado en respuesta a diferentes estímulos. Las proteínas centrales que ejecutan la fusión y fisión son unas GTPasas altamente conservadas relacionadas con la familia de las dinaminas denominadas DRP [18, 19].

La fusión de las mitocondrias depende de 2 miembros de la familia de las MFN 1 y 2. Estas 2 proteínas relacionadas están presentes en la membrana externa de la mitocondria y forman complejos homo-oligoméricos y hetero-oligoméricos en

posición trans entre mitocondrias cercanas. La fisión de las mitocondrias en mamíferos requiere del reclutamiento de DRP1 desde el citosol. El reclutamiento de DRP1 a los sitios de fisión involucra a las proteínas adaptadoras (FIS1) y al factor de fisión mitocondrial (MFF). Ambas proteínas son ancladas a la membrana mitocondrial externa, pero forman diferentes complejos [20].

Dentro de todo este proceso, existe una proteína denominada, proteína asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos (GDAP1) que pertenece a la familia de las Glutación S-transferasas (GST) y es anclada a la membrana mitocondrial externa (MEM). GDAP1 es otro regulador de la fisión mitocondrial, la actividad de la cual depende de los factores de fisión DRP1 y FIS1, pero, a diferencia de otros factores de fisión, GDAP1 no incrementa el riesgo de apoptosis [21].

3.7 Mitofagia

Las células tienen un mecanismo de control de calidad que distingue entre mitocondrias “buenas” y “malas”, es un proceso en el que las mitocondrias se eliminan. El mecanismo de mitofagia más estudiado está mediado por las proteínas, quinasa 1 inducida por PTEN (PINK1) y PARKINA. Por ejemplo, la cinasa PINK1 se degrada constantemente en las mitocondrias sanas por proteasas, que se inactiva en las mitocondrias despolarizadas, lo que estabiliza PINK1 en la membrana mitocondrial externa. Dicho proceso previene la acumulación de mitocondrias malas a través del equilibrio dinámico entre fisión y fusión mitocondrial [20,22].

3.8 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, ductos arterioso persistente, etc.) [23], 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 [24], 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 [25]. 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 [9].

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) [3]. 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 [26].

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 [27]. 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 del 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 [28].

La mitocondria participa en diversas funciones celulares como son: la producción de energía, la modulación del estado redox, el balance osmótico, la homeostasis del Ca²⁺ 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 oxidativo, lo cual favorece el daño en células pulmonares [26]. 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 [3]. 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 humano normal. Específicamente, los cambios en los niveles de las proteínas PINK y PARKINA. Así como proteínas asociadas con los procesos de Fusión y Fisión mitocondrial (MFN 1 y 2, DRP-1).

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 la expresión 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 esteril. Este 100% de 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% y 2.5% las cuales fueron congeladas a -70°C y utilizadas para realizar los experimentos.

6.4 Cultivo de fibroblastos humanos

Fibroblastos de pulmón humano normal fueron obtenidos de líneas comerciales (CCD-16 y CCD19) y las líneas primarias fueron obtenidas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), con la aprobación del Comité de Bioética.

Los fibroblastos de pulmón humano normal provienen de líneas celulares comerciales las cuales fueron adquiridas con los proveedores específicos.

Línea de fibroblastos humanos de pulmón normal CCD-16 (Mujer de 35 años) y CCD-19 (Hombre de 20 años) adquiridas de la ATCC: Las células fueron cultivadas en medio DMEM marca Gibco, suplementado con penicilina (100 µg/ml), estreptomicina (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.

Línea celular primaria N2 (obtenida de una lobectomía realizada en el 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), 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.

6.5 Estímulo de fibroblastos con extracto de humo de leña.

Cuando los fibroblastos llegaron a una confluencia de 80% se estimularon con sus respectivas diluciones de EHL y se incubaron a 37°C por 24 hrs.

6.6 Aislamiento de la fracción mitocondrial

Pasadas las 24 hrs de exposición de los fibroblastos al EHL (1% y 2.5%) y los fibroblastos sin estímulo de EHL utilizados como control, fueron cosechadas por tripsinización para ser centrifugadas y obtener el paquete celular. Dicho pellet fue resuspendido en 2mL de medio de cultivo sin SFB. Los lisados celulares de

fibroblastos humanos normales tanto control y los expuestos a diferentes concentraciones de extracto de humo de leña se utilizaron para obtener la fracción citosólica y mitocondrial utilizando el kit comercial de Thermo Scientific Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells Cat. 89874, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Dicho kit contiene 3 reactivos (A, B y C) que se fueron utilizando a lo largo del aislamiento mitocondrial.

Se inició añadiendo 10 μ l x ml de inhibidor de proteasas a los reactivos A y C. Las células fueron centrifugadas a 1890 rpm, el sobrenadante se eliminó y se adicionaron 800 μ l del reactivo A, después se agitaron en vortex 5 seg y se incubaron 2 minutos en hielo. Posteriormente se agregaron 10 μ l del reactivo B y se incubaron durante 5 minutos. Posterior a ello se les añadió 800 μ l del reactivo C y fueron centrifugadas a 700 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL, y se centrifugó a 12, 000 rpm /15 minutos para obtener la fracción citosólica. Al pellet obtenido se le añadió 500 μ l del reactivo C, resuspendido y centrifugado a 12, 000 rpm por 15 minutos. Con ayuda de una micropipeta se eliminó el sobrenadante, dejando seco el pellet. Finalmente, para conseguir el aislamiento mitocondrial, se le añadió CHAPS al 2% en buffer de solución salina TBS (25Mm Tris, 0.15M NaCl; pH 7.2), y se centrifugo a 14, 000 rpm/5 minutos a 4°C.

6.7 Obtención de lisados totales de células.

Después de las 24 h, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X frío, y lisadas con 30 μ l 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, 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.

6.8 Cuantificación de proteínas de los lisados totales de células

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.

6.9 Cuantificación de proteínas de aislamiento mitocondrial

La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit comercial de Thermo Scientific BCA Protein Assay Kit, que es una formulación compatible con detergentes basada en ácido bicinconínico (BCA) para la cuantificación de las proteínas por colorimetría.

Dicho kit contiene 3 reactivos; A, B y una ampolla estándar de albumina (BSA). Se inició preparando una serie de diluciones de concentración conocida (20 - 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a partir de la ampolla en tubos Eppendorf. Posteriormente se preparó la solución WR (50:1, Reactivo A: B), 50 mL de reactivo A con 1 mL del reactivo B.

Se tomaron 20 μl de cada una de las muestras de la serie de diluciones, y se colocaron por duplicado en una placa de 96 pocillos. Para las muestras a analizar se tomaron 4 μl de cada una y se le añadieron 16 μl de agua. Posteriormente se les agregó 200 μl de la solución WR y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Posteriormente fue medida a 562 nm en un lector ELISA (Accuris SmartReader 96). Extrapolando el resultado obtenido en la curva estandarizada de BSA.

6.10 Análisis de expresión por Western Blot

Las proteínas cuantificadas de los lisados totales de células y de las fracciones mitocondriales fueron mezcladas (V/V) con buffer de Laemmli y se corrieron en condiciones reductoras en geles SDS-PAGE al 12%. Se cargaron 30 μg de proteína de cada muestra experimental. El gel se transfirió, a 100V durante 60 minutos. Previo a la transferencia, se preparó la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) lavándola con metanol 2 min, transcurrido el tiempo se hizo

una segunda lavada con agua y se dejó en buffer de transferencia por 15 min. Para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos la membrana se bloqueó 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. Posteriormente la membrana fue incubada 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario específico. Por ejemplo, en este caso, PINK 1 (1:1000), PARKINA (1:1000), MFN 1 (1:100), FIS 1 (1:100), DRP 1 (1:100) y VDAC 1 (1:100). 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 incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, en particular se utilizaron Mouse (1:100000) y Rabbit (1:2500), tal como se menciona en la **Tabla 1**. Posteriormente se lavó nuevamente 4 veces con TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl 0.1% Tween-20).

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.

Todos los anticuerpos primarios y secundarios que fueron utilizados en los experimentos, se encuentran descritos en la siguiente tabla.

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpo primario	Marca	No. de catálogo	Dilución
PINK 1	Cell Signaling Technology	D8G3	1:1000
PARKINA	Cell Signaling Technology	2132S	1:1000
MFN 1	Santa Cruz	Sc-166644	1:100
FIS 1	Santa Cruz	Sc-376447	1:100
DRP 1	Santa Cruz	Sc-271583	1:100

VDAC 1	Santa Cruz	Sc-390996	1:100
COX IV	Abcam	202554	1:1000
Anticuerpo secundario	Marca	No. de catálogo	Dilución
Mouse	Jackson ImmunoResearch	115035003	1:10000
Rabbit	BioLegend	406401	1:2500

6.11 Análisis densitómetro

Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Image Lab de Bio-Rad.

7. RESULTADOS

Los resultados del Western Blot no fueron satisfactorios. Es posible que estos resultados se deban a la incorrecta elección de anticuerpos validados y de calidad, y/o una equivocada manipulación de los mismos. Como se sabe, estos son los reactivos más críticos en los ensayos de WB, ya que la membrana es expuesta a anticuerpos específicos contra las proteínas a estudiar.

Es necesario seleccionar y verificar los anticuerpos con mayor posibilidad de eliminar el inconveniente y prevenir la repetición de los resultados adquiridos en el presente estudio, y así obtener la expresión de proteínas esperadas en los aislamientos mitocondriales.

8. REFERENCIAS

1. S. Bonjour, H. Adair-Rohani, J. Wolf, N.G. Bruce, S. Mehta, A. Pruss-Ustun. (2013). *Solid fuel use for household cooking: Country and regional estimates for 1980-2010*. Environ Health Perspect. (121) 784-790.
2. World Health Organization. (2015). *World Health Statistics*.
3. Granados-Castro LF, Rodríguez-Rangel DS, Montaña M, Ramos C, Pedraza-Chaverri J. (2015). *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. Environ Toxicol. 30(4):461-471.

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. Juneman, A., & Legarreta, G. (2007). *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.
6. 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.
7. 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.
8. Salvador, A. R. (2010). *Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles.* Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España), 104(2), 331-345.
9. 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.
10. Hinojosa, F., & Efraín, C. (2009). *Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).* Acta médica peruana, 26(4), 188-191.
11. Organización Mundial de la Salud, OMS. (2023). *Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).*
12. 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, 94-99.
13. Hernández-Beltrán, N., Moreno, C. B., & Gutiérrez-Álvarez, Á. M. (2013). *El papel de la mitocondria en el dolor de la neuropatía diabética.* Endocrinología y Nutrición, 25–32.
14. Marín-García, J., & Goldenthal, M. J. (2002). *La mitocondria y el corazón.* Revista Española de Cardiología, 1293–1310.

15. Benard Giovanni, Bellance Nadège, James Dominic, Parrone Philippe & Fernandez Helder, Letellier T, Rossignol R. (2007). *Mitochondrial bioenergetics and structural network organization*. Journal of Cell Science.
16. Márquez-Álvarez C., Gómez-Crisóstomo N., Cruz-Hernández E., Aguilar-Gamas C., & Martínez-Abundis E. (2022). *Mitochondrial role in beta cell function in health and diabetes*. Mexican Journal of Endocrinology, Metabolism and Nutrition.
17. Chen-H, Chomyn-A & Chan DC. (2005). *Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction*. Journal of Biological Chemical.
18. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. (2004). *Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A*. Nature Genetics, 449-451.
19. Labbé, Katherine, Andrew Murley, and Jodi Nunnari. (2014). *Determinants and functions of mitochondrial behavior*. Annual review of cell and developmental biology, 357-391.
20. Milone M, Benarroch EE, Wong LJ. (2011). *POLG-related disorders: defects of the nuclear and mitochondrial genome interaction*. Revista Neurology, 77(20):1847-52.
21. Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y. E., Chomyn, A., Prolla, T. A., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2010). *Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations*. Cell, 141(2), 280-289.
22. Alarcón-Aguilar, A., Maycotte-González, P., Cortés-Hernández, P., López-Diazguerrero, N. E., & Königsberg, M. (2019). *Dinámica mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas*. Gaceta médica de México, 155(3).
23. D'Ortencio, Alfredo, & Navigante, Alfredo. (2016). *Disfunción mitocondrial y enfermedades cardiovasculares*. Insuficiencia cardíaca, 11(4), 201-214.
24. 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.
25. Andrea Juneman & Gabriela Legarreta. (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.
26. 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.

27. 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.
28. 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*.