

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de sistemas biológicos
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica


Proyecto de Servicio Social:

**Efecto del extracto de humo de leña sobre las proteínas de fusión
implicadas en la dinámica mitocondrial en fibroblastos de pulmón
humano normal.**

Presenta: Raúl Díaz Horta
Matrícula: 2192030472



Asesor interno.
Dra. Julia Pérez Ramos



Asesor externo:
M. en C. Lilia Carina Becerril
Berrocal

Ciudad de México, marzo 2025

ÍNDICE

1. Abreviaturas.	4
2. Introducción.	5
3. Marco teórico.	7
3.1 EPOC y su relación con el humo de leña.	7
3.2 Composición del humo de leña.	9
3.3 Importancia de la mitocondria en el desarrollo de EPOC.	10
3.4 Funciones de la mitocondria.	11
3.5 Dinámica y biogénesis mitocondrial.	14
3.6 Fusión mitocondrial.	15
3.7 Fisión mitocondrial.	16
3.8 Mitofagia.	16
3.9 Enfermedades asociadas con el desequilibrio mitocondrial.	20
4. Justificación.	23
5. Objetivos.	24
5.1 Objetivo general.	24
5.2 Objetivos específicos.	24
6. Materiales y métodos.	25
6.1 Obtención y cultivo de fibroblastos humanos.	25
6.2 Obtención del extracto de humo de leña (EHL).	25
6.3 Caracterización de los compuestos químicos del EHL.	26
6.4 Modelo agudo de exposición al extracto de humo de leña en cultivos de fibroblastos de pulmón humano normal.	27
6.5 Microscopia de campo claro.	27
6.6 Obtención de muestras de lisados celulares para el análisis por Western blot.	27
6.7 Cuantificación de proteínas.	28

6.8 Análisis por Western Blot.	29
6.9 Ensayo de Apoptosis celular.	31
7. Resultados.	32
7.1 El EHL induce cambios en la morfología de las líneas de fibroblastos de pulmón humano normal CCD-16 y CCD-19.	32
7.2 Efecto del EHL sobre la expresión de proteínas asociadas con el proceso de fusión mitocondrial.	34
7.3 Efecto del EHL sobre la expresión de la translocasa de nucleótidos de adenina mitocondrial ANT3.	35
7.4 El EHL induce apoptosis en las líneas de fibroblastos de pulmón humano normal CCD-16 y CCD-19.	36
8. Discusión.	38
9. Conclusiones.	40
10. Referencias.	41

1. Abreviaturas.

$\Delta\Psi_m$. Despolarización de la membrana mitocondrial.

ADNmt. Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial.

AhR. Hidrocarburos de arilo.

ANT. Translocasa de nucleótidos de adenina mitocondrial

ANT3. Proteína translocadora de nucleótidos de adenina 3.

ATTC. American Type Culture Collection.

BSA. Albúmina de suero bovino.

DMEM. Dulbecco's Modified Eagle Medium

DRP1. Proteína relacionada con la dinamina 1.

ECV. Enfermedades cardiovasculares.

EHL. Extracto de humo de leña.

EPOC. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

F-12. Medio de cultivo Ham.

FIS1. Factor de fisión 1.

FITC. Fluoresceína de isotiocianato.

FMN. Mononucleótido de flavina.

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

HAP. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

MEC. Matriz extracelular.

Mfn 1 y 2. Mitofusina 1 y 2.

mtPTP. Poro de transición de permeabilidad mitocondrial

PARL. Proteasas específicas de la mitocondria.

PRKN. Ligasa de ubiquitina E3 Parkin.

PS. Fosfatidilserina.

ROS. Espécies reactivas de oxígeno.

SFB. Suero fetal bovino.

WB. Western blot.

STS. Estaurosporina.

FITC/PI. Anexina V/yoduro de propidio.

PI. Yoduro de propidio.

PINK1. Quinasa putativa 1 inducida por PTEN.

SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida.

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 demostrado 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. Se sabe que la exposición al humo de leña en animales como el cobayo, induce 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 las mitocondrias aisladas de pulmones [3]. Además, se ha reportado que el extracto de humo de leña induce estrés oxidante, favoreciendo la apoptosis de células epiteliales de pulmón humano [4]. A pesar de estos hallazgos hasta la fecha se desconoce si el extracto de humo de leña induce cambios estructurales y morfológicos en la red mitocondrial de los fibroblastos de pulmón y si estos están asociados a cambios en los niveles de expresión de proteínas implicadas en procesos como la biogénesis y dinámica 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 las mitocondrias aisladas de pulmón un incremento en la generación de ROS y disfunción mitocondrial, la cual fue evaluada por disminución en el índice de control respiratorio y una disminución en la actividad de los complejos respiratorios I y IV de la cadena de transporte de electrones [5].

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

A pesar de que diversos trabajos han demostrado que el EHL induce alteraciones en la función mitocondrial, incremento en la producción de ROS e incremento en la apoptosis vía intrínseca, aún se desconoce el efecto que induce directamente 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 mitocondrial, en fibroblastos de pulmón humano normal.

3. Marco teórico.

3.1 EPOC y su relación con el humo de leña.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la disminución progresiva del flujo de aire en los pulmones. La limitación del flujo aéreo es progresiva, lo que no solo afecta a los pulmones y conduce a síntomas respiratorios persistentes, sino que causa efectos adversos sistémicos. La prevalencia de EPOC entre las personas de 30 a 79 años fue del 10.3% a nivel mundial en el año 2019, esta cifra aumentará aún más con la aceleración del envejecimiento y el deterioro en la calidad del aire causado por la contaminación ambiental [7].

Fumar cigarrillos es un factor de riesgo clave para la EPOC. Los fumadores de cigarrillos tienen una mayor prevalencia de síntomas respiratorios y anomalías de la función pulmonar, una mayor tasa anual de disminución del volumen espiratorio forzado y una mayor tasa de mortalidad por EPOC que los no fumadores. La exposición pasiva al humo de cigarrillo, otros tipos de humo de tabaco (pipa, puro, etc) también supone un factor de riesgo para la EPOC [8].

La madera, el estiércol animal, los residuos de cultivos y el carbón (es decir, la biomasa) que normalmente se queman en estufas que funcionan mal, pueden conducir a niveles muy altos de contaminación del aire del hogar, que se asocia con un mayor riesgo de EPOC [8].

Gracias a diversas investigaciones, es posible sustentar que la exposición a combustibles sólidos, incluida la leña, supone un factor de riesgo de enfermedad respiratoria: infección respiratoria aguda en niños, EPOC, bronquitis crónica, obstrucción al flujo de aire, hiperreactividad bronquial, asma, tuberculosis, cáncer y fibrosis pulmonar [8].

Tras diversas revisiones y análisis, se confirma que las personas expuestas crónicamente a combustibles sólidos en su domicilio tienen mayor riesgo de desarrollar EPOC. En el caso del humo de leña, el riesgo de EPOC aumenta significativamente con el tiempo de exposición y con la exposición simultánea al humo de tabaco [8].

En comparación con la EPOC provocada por tabaquismo, la EPOC provocada por humo de leña, la alteración obstructiva es más leve y la declinación del volumen respiratorio forzado es menor y más homogénea. Algunos estudios demuestran que la presión arterial de CO₂ es más alta (menor ventilación) y la presión arterial de oxígeno y saturación arterial de oxígeno son más bajas en la EPOC por humo de leña que en la EPOC por tabaquismo [7,8].

Es esperable que el mayor compromiso inflamatorio de la vía aérea y la menor frecuencia de enfisema encontrados en la EPOC ocasionada por humo de leña en comparación con la provocada por humo de tabaquismo tenga una explicación patogénica, etiológica y fisiopatología razonable, sin embargo, la información que pueda sustentar las diferencias es muy limitada [8].

La composición del humo de leña es tan complicada como la del humo de cigarrillo. La combustión de la leña generalmente es incompleta, lo que genera una mayor concentración de algunas sustancias como CO, benceno e hidrocarburos policíclicos aromáticos en relación con el humo del cigarrillo. Prácticamente el 100% del material particulado en el humo del cigarrillo tiene un tamaño menor a 2.5 µm. Esta proporción es cercana al 90% en el humo de leña; el restante 10% de partículas tiene un tamaño entre 2.5 y 10 µm [7,8,9].

Los mecanismos patogénicos implicados en la EPOC por biomasa se relacionan con activación inflamatoria y estrés oxidativo, sin que sean evidentes diferencias significativas en los mecanismos involucrados en la generación de daño respiratorio en la EPOC producida por humo de leña. Aunque la menor frecuencia de enfisema

en este tipo de EPOC podría sugerir una menor actividad proteolítica ante la exposición de humo de la biomasa, un estudio reciente no encontró diferencias al comparar la exposición al humo de biomasa con la exposición al humo del cigarrillo. Algunos autores sugieren que las diferencias entre ambos tipos de EPOC pueden ser determinadas por diferencias en las características de la exposición [8,9,10].

3.2 Composición del humo de leña.

Alrededor del 40% de la población mundial, particularmente en países en vías de desarrollo, se siguen empleando combustibles sólidos como el carbón o biomasa derivada de leña, residuos vegetales y estiércol, para cocinar o calentar hogares [8].

La composición del humo derivado de la combustión de leña de la especie *Casuaria equisetifolia* contiene muchos compuestos nocivos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los cuales fueron determinados a través de cromatografía de gases, identificando 11 HAP's entre los que se encuentran principalmente naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, 2-metil-antraceno, 1-metil-antraceno, 9-metil-antraceno, pireno, criseno y 5-metil-criseno, los cuales son contaminantes ambientales ubicuos, generados principalmente por la combustión incompleta de biomasa y otras fuentes de energía [8,9].

Los HAP's presentes en la atmosfera se distribuyen generalmente en dos fases, la fase gaseosa y la fase particulada y se absorben principalmente en materia particulada < 2.5 µm. Los HAP son de interés primordial debido a sus propiedades toxicas [11].

La mayoría de este tipo de compuestos son hidrofóbicos y se almacenan en los tejidos grasos de diversos órganos, sin embargo, algunos son hidrófilicos. Algunos de estos compuestos son cancerígenos, genotóxicos o mutagénicos. La carcinogenicidad de estos compuestos está relacionada con la naturaleza

estructural de estas moléculas, en especial con su creciente número de anillos aromáticos [9,11].

La toxicidad de los HAP en mamíferos está mediada de forma casi exclusiva por la señalización del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), el cual es un factor de transcripción activado por ligando que se expresa en muchas células. Los HAP afectan sinérgica y negativamente la fisiología respiratoria induciendo una respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y remodelando la matriz extracelular. También afectan diferentes tipos de células endoteliales, epiteliales, alveolares, bronquiales, macrófagos y fibroblastos [9,11].

3.3 Importancia de la mitocondria en el desarrollo de EPOC.

La mitocondria es un orgánulo celular esencial que se encarga de desempeñar un papel clave en la producción de energía de las células eucariotas, este orgánulo posee un diseño estructural complejo, comprendido en dos bicapas de fosfolípidos: una membrana mitocondrial externa que abarca toda la mitocondria y posee un espesor de aproximadamente 6 a 8 nm. La membrana externa tiene canales proteicos que facilitan el paso de moléculas pequeñas, iones y agua hacia el interior de la mitocondria. Está compuesta por tres familias de proteínas: el complejo translocasa de la membrana externa, el complejo de maquinaria de clasificación y ensamblaje y las proteínas de poro. Las funciones de la membrana mitocondrial externa incluyen papeles en la apoptosis, la protección celular y la translocación de moléculas lipídicas. Tras el daño celular o la exposición a estímulos específicos, los canales de la membrana pueden abrirse, liberando moléculas de señalización de muerte celular dentro de las mitocondrias e iniciando la apoptosis. Además, esta membrana contribuye a salvaguardar la estructura interna y la función de las mitocondrias al evitar que sustancias dañinas del citoplasma ingresen a la matriz mitocondrial [12].

La membrana mitocondrial interna se encuentra dentro de la mitocondria, separada de la membrana externa por un sistema de membranas plegadas conocidas como crestas, que permiten aumentar la superficie de la membrana interna, proporcionando más espacio para enzimas y proteínas específicas de esta membrana. Las funciones de la membrana interna incluyen la transferencia de electrones, la participación en el metabolismo energético y la regulación de iones, así como la síntesis de ATP, la molécula de energía celular, a través de la fosforilación oxidativa [13].

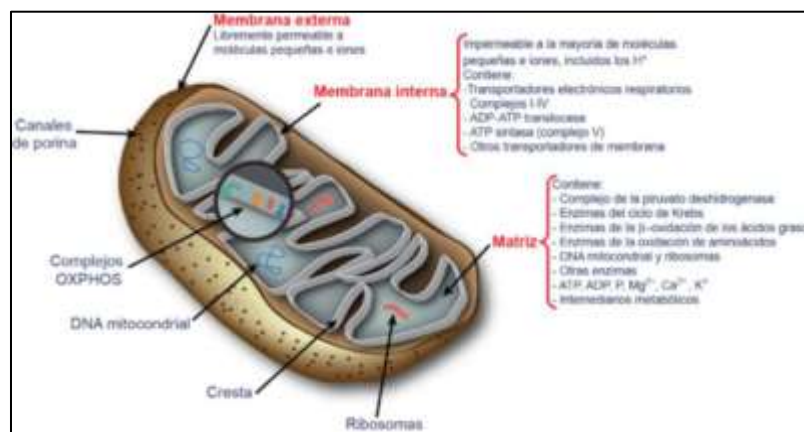


Figura 1. Estructura de la mitocondria.

3.4 Funciones de la mitocondria.

La membrana mitocondrial es fundamental para su función en la producción de energía celular, ambas membranas, la interna y la externa juegan roles cruciales para el uso y aprovechamiento de la energía de forma eficiente y si bien la fosforilación oxidativa permite a la célula aprovechar en forma de ATP parte de la energía contenida en los combustibles metabólicos reducidos (glucosa, ácidos grasos, etc.), gran parte de la energía (ATP) proviene también de las reacciones de oxidación total de estos compuestos, tal oxidación debe ocurrir de forma escalonada en diversas rutas metabólicas, como la del ácido cítrico, a las que se acoplan como aceptores de electrones el NAD^+ y el FAD, pasando a sus formas reducidas: NADH y $FADH_2$. Los nucleótidos reducidos finalmente transfieren sus electrones a un

aceptor final, el oxígeno, que se reduce a agua en un proceso donde esta energía se transforma en energía química útil en forma de ATP [13,14].

Este proceso está conformado por estructuras que se encargan de transportar electrones, dichas estructuras se encuentran localizadas en la membrana mitocondrial interna. La cadena respiratoria de los mamíferos es la más compleja estructuralmente y está constituida por más de veinte transportadores electrónicos a través de los cuales viajan los electrones desde donantes como el NADH o el FADH_2 , hasta ser cedidos al oxígeno. Durante el proceso de transporte de electrones, se libera energía empleada para bombear protones al espacio intermembranal. La energía libre almacenada en el gradiente protónico resultante impulsa el flujo de retorno a la matriz mitocondrial de los protones, el cual permite la obtención de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico mediante la fosforilación oxidativa, realizada por la ATP sintasa [14].

La transferencia inicial de los electrones desde las deshidrogenasas del ciclo del ácido cítrico hasta la cadena de transporte electrónico requiere de cofactores solubles en la matriz, los cuales son los nucleótidos de nicotinamida adenina NADH y NAD^+ . Estos constituyen el principal sustrato de la cadena y sus reacciones redox son procesos que implican simultáneamente la transferencia de dos electrones y la captación de dos protones. El aceptor primario es una flavoproteína que tiene al mono nucleótido de flavina (FMN) como grupo prostético. Así, la cadena respiratoria transfiere la mayoría de los electrones desde el par NADH/NAD^+ hasta el par $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$, lo que sugiere un potencial redox de 1.14V, energía liberada de forma escalonada y que en puntos concretos se utiliza como fuerza impulsora para el transporte de protones y, por ende, la síntesis de ATP [15].

Los transportadores electrónicos de la cadena respiratoria están agrupados en forma de cuatro complejos supramoleculares independientes y de dos componentes de bajo peso molecular, el citocromo C y la ubiquinona, que actúan como transportadores de electrones entre estos complejos [15].

El complejo I, denominado NADH-Q oxidorreductasa es donde se transfieren electrones desde NADH hacia la coenzima Q; Q-citocromo c oxidorreductasa (complejo III) se encarga de pasar los electrones hacia el citocromo c, y citocromo C oxidasa (complejo IV) completa la cadena pasando los electrones hacia O₂ y hace que se reduzca a H₂O. Algunas sustancias con potenciales redox más positivos que el par NADH/NAD⁺, por ejemplo, el succinato, pasan electrones hacia la coenzima Q por medio del complejo II, conocido como succinato-Q reductasa, en lugar de hacerlo mediante el complejo I. Si bien estos complejos están integrados en la membrana mitocondrial interna, se hace hincapié en que la coenzima Q y el citocromo c, son móviles. La coenzima Q, se difunde con rapidez dentro de la membrana, mientras que el citocromo c es una proteína soluble [15].

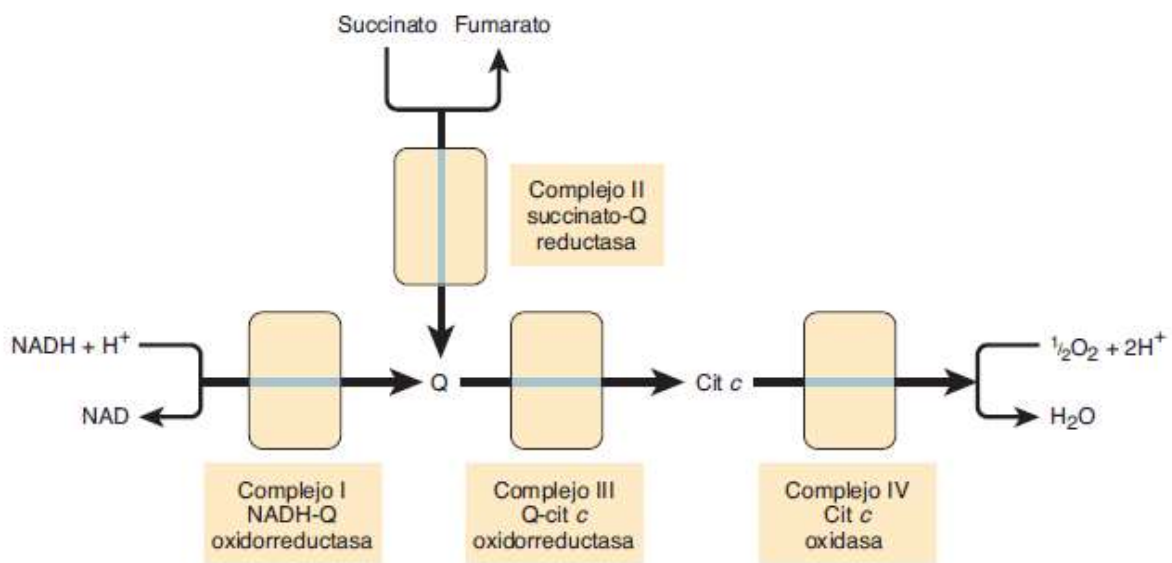


Figura 2. Flujo de electrones por la cadena respiratoria.

Además de que la estructura mitocondrial está estrechamente ligada a sus funciones, pueden ocurrir tanto interacciones entre una red de mitocondrias interconectadas de forma dinámica, así como con otro tipo de orgánulos como el retículo endoplásmico y los lisosomas, lo cual sirve para intercambiar productos derivados del metabolismo celular [14,15].

3.5 Dinámica y biogénesis mitocondrial.

Tanto la biogénesis como la dinámica mitocondrial permiten la adaptación de las células a diversos estímulos, como demandas energéticas o cambios en el medio ambiente. La biogénesis mitocondrial es un proceso altamente regulado que implica la coordinación de la expresión génica mitocondrial, la síntesis de proteínas y la replicación de ADNmt para dar lugar a la formación de nuevas mitocondrias dentro de la célula. Un aumento en el número y la funcionalidad de las mitocondrias es crucial para procesos como la diferenciación celular, la respuesta al estrés, la regulación del metabolismo y la resistencia a enfermedades. Las alteraciones en la biogénesis mitocondrial están implicadas en una amplia variedad de enfermedades crónico-degenerativas, es por eso que se subraya su importancia en la salud humana [16].

La dinámica mitocondrial abarca los cambios estructurales, las reubicaciones, variaciones morfológicas y las fluctuaciones numéricas de las mitocondrias dentro de las células, incluida su fusión, división y movilidad. Los cambios negativos en la dinámica mitocondrial conducen a disfunción mitocondrial, ocasionando la patogénesis de varias enfermedades humanas, si bien esta disfunción puede ser ocasionada por alteraciones genéticas, también factores ambientales conducen a cambios negativos en la dinámica mitocondrial, afectando los procesos de fusión y fisión mitocondrial, conduciendo a enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y trastornos metabólicos [16].

Los procesos principales de la dinámica mitocondrial son la fusión, que ocurre cuando dos mitocondrias adyacentes se unen para formar una sola mitocondria de mayor tamaño y la fisión, que se encarga de separar una mitocondria en dos. Estos procesos generalmente se contrarrestan entre sí y al inactivarse uno, se conduce la acción sin oposición del otro, estando en un equilibrio constante dentro de las células [16].

3.6 Fusión mitocondrial.

En los mamíferos, el proceso de fusión está coordinado por la mitofusina 1 (Mfn-1) y la mitofusina 2 (Mfn-2), proteínas ubicadas en la membrana mitocondrial externa, así como por la GTPasa similar a la dinamina mitocondrial, OPA-1, ubicada en la membrana mitocondrial interna.

Las mitofusinas contienen dominios de unión a GTP catalíticos anclados a la membrana mitocondrial externa, lo cual permite la interacción entre mitocondrias adyacentes, de igual forma, la fusión de las membranas mitocondriales externas es impulsada por la hidrólisis de GTP, induciendo un cambio conformacional que permite el contacto entre las membranas externas de las mitocondrias adyacentes. OPA-1 y la cardiolipina, un lípido específico de las mitocondrias, son los responsables de la fusión de las membranas mitocondriales internas. La interacción entre OPA-1 y cardiolipina a cada lado de las dos membranas, se encarga de fusionar las dos membranas internas después de la hidrólisis de GTP dependiente de OPA-1 **[16]**.

3.7 Fisión mitocondrial.

El proceso de fisión mitocondrial comienza durante la replicación del ADNmt, ya que marca el sitio de reclutamiento del retículo endoplásmico, el cual comienza con la constricción de la membrana mitocondrial externa, algunas proteínas unidas a la mitocondria como Fis1, MFF, MiD49 y MiD51 ayudan al reclutamiento posterior de DRP1, el cual se oligomeriza formando un anillo alrededor de la mitocondria que ayuda a identificar el lugar en donde este orgánulo se va a dividir. DRP1, utiliza energía derivada de la hidrolisis de GTP para inducir el proceso de constricción mitocondrial y posteriormente permite la fisión completa de la mitocondria, esto permite a la célula regular el tamaño, el número de las mitocondrias y además facilita la eliminación de mitocondrias dañadas [16].

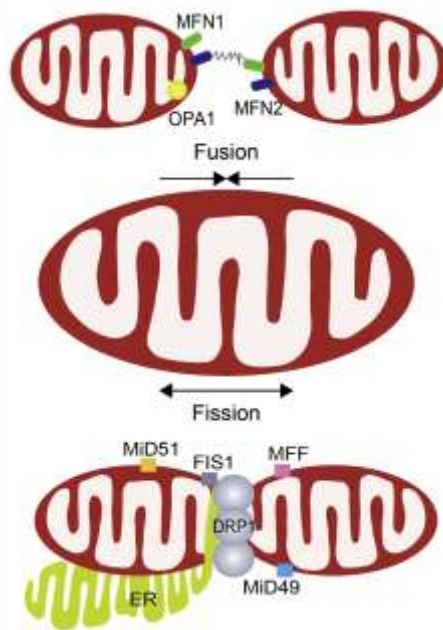


Figura 3. *Procesos de fusión y fisión mitocondrial.*

3.8 Mitofagia.

La mitofagia es una forma de autofagia selectiva en la que los fragmentos mitocondriales dañados y disfuncionales son devorados y degradados,

desencadenados por señales que marcan daño mitocondrial como el desequilibrio en la dinámica de fisión-fusión mitocondrial. La mitofagia se promueve a través de receptores específicos como BNIP3, BNIP3L y FUNDC1 o moléculas de ubiquitina conjugadas a proteínas en la superficie mitocondrial, lo que resulta en la formación de autofagosomas que rodean las mitocondrias y en última instancia, la degradación mitocondrial. La eliminación de mitocondrias mediada por mitofagia juega un papel importante en el control de calidad mitocondrial y está estrechamente relacionada con el destino celular, como la senescencia, la apoptosis y la necroptosis. Los defectos en la mitofagia se han relacionado con múltiples enfermedades incluidas las enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, cáncer y enfermedades pulmonares. La acción cruzada de algunas proteínas en la dinámica mitocondrial y en las vías de autofagia mitocondrial sugiere que la dinámica mitocondrial y la autofagia se influyen mutuamente y son interdependientes [16].

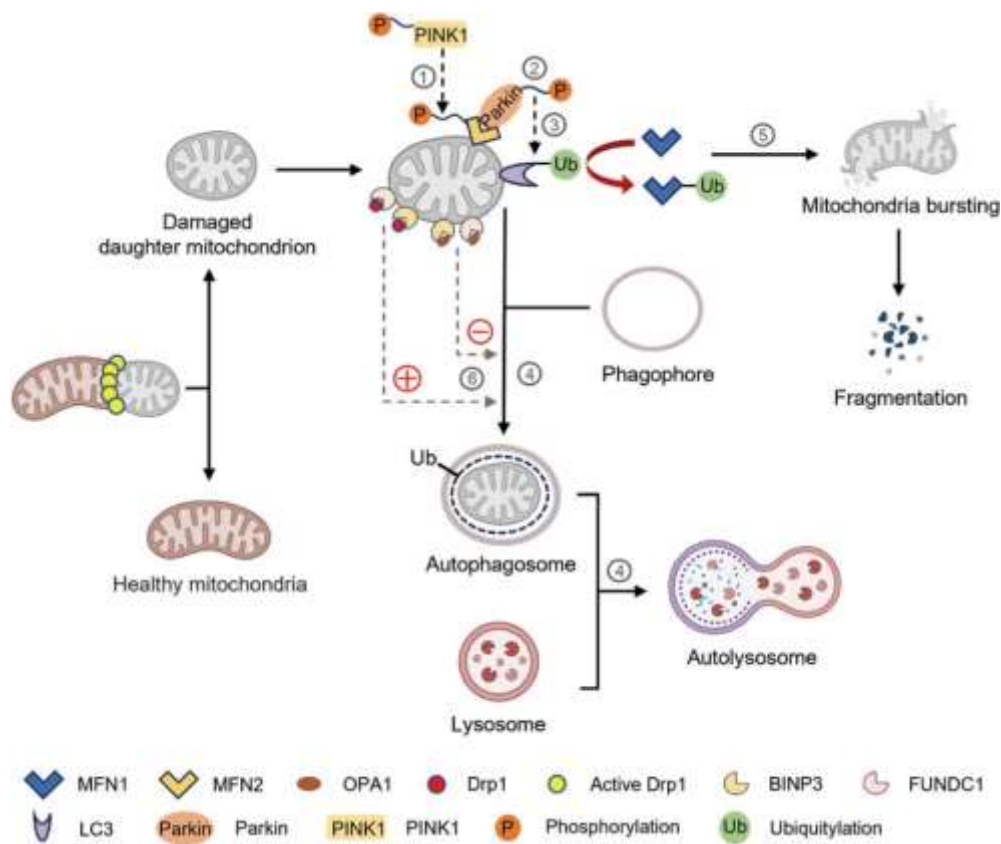


Figura 4. Mitofagia mitocondrial.

Se han implicado múltiples vías de señalización en la mitofagia. La quinasa putativa inducida por el homólogo de tensina (PTEN) 1 (PINK1), una quinasa de serina/treonina en mitocondrias sanas, se importa continuamente a la membrana mitocondrial interna, se escinde y se degrada por las proteasas específicas de la mitocondria PARL y las peptidasas de procesamiento mitocondrial. Cuando se elimina la proteína mitocondrial específica que escinde a PINK1, se encuentra a una proteína de membrana mal plegada, lo que resulta en la agregación y estabilización de PINK1 en la membrana mitocondrial externa, a su vez, induce el dominio quinasa de PINK1 para fosforilar la proteína de membrana externa y reclutar y activar la ligasa de ubiquitina E3 Parkin (PRKN). La parkina se activa para poliubiquitinar proteínas en la membrana mitocondrial externa como las mitofusinas 1 y 2, el canal aniónico dependiente de voltaje 1 y la rho1 mitocondrial, para su posterior fosforilación por PINK1. La fosforilación de MFN2 como receptor de parkina facilita el reclutamiento de parkina a la membrana mitocondrial externa y en última instancia, la fosforila. Una vez activada, la parkina ubiquitina diferentes dianas, como los LC3. Luego, la interacción de LC3 con los adaptadores de mitofagia media la endocitosis de las mitocondrias dañadas en autofagosomas. Finalmente, las mitocondrias dañadas se desintegran por la hidrolasa en los lisosomas, que se fusionan con los autofagosomas para tomar los denominados "autolisosomas". Además, la ubiquitinación de MFN 1 y 2 conduce a la fisión de las mitocondrias, la fragmentación y la posterior degradación mitofágica junto con la formación de autofagosomas [17].

Otros mecanismos independientes de Parkin involucran a la proteína NIX de homología 3 de Bcl-2 y su homóloga proteína 3 de interacción BNIP3, que interactúan directamente con LC3 como un receptor de mitofagia. NIX/MNIP3 media la mitofagia a través de hipoxia y la estabilización de HIF-1 α . Otra proteína de la membrana mitocondrial externa, FUNDC1, es un receptor de mitofagia para la mitofagia inducida por hipoxia. La fosfoglicerato mutasa 5 desfosforila a FUNDC1, promueve su interacción con LC3 e induce la mitofagia bajo estimulación hipoxica. ULK1 es esencial para inducir autofagia e interactúa con FUNDC1 para fosforilar la

serina 17, mejorando así la unión de FUNDC1 a LC3 en las mitocondrias. Además, FUNDC1 interactúa con OPA1 y DRP1, que está regulada por el estado de fosforilación de serina 13 durante la hipoxia. P62/SQSTM1, el primer receptor de autofagia selectiva de mamíferos descrito es una citoproteína que contiene una proteína con motivo LIR citosólico y el motivo LIR de P62 con múltiples sitios en LC3. A excepción de las proteínas receptoras descritas anteriormente, otras proteínas receptoras citoplasmáticas, por ejemplo, NBR1, NDP52 y optineurina median la mitofagia. Además, la proteína de unión a FK506 de la proteína KFBP8, pueden inducir mitofagia independiente de Parkin [17].

La fusión y fisión mitocondrial se acompañan de mitofagia. Dado que los tamaños de los autofagosomas en las células de mamíferos son de aproximadamente 500–1500 nm, es razonable predecir que una gran red de mitocondrias debería romperse por fisión antes de que ocurra la mitofagia. En este sentido, la degradación de los factores relacionados con la fusión mitocondrial o la fisión es necesaria para la mitofagia. En primer lugar, la proteína de fusión mitocondrial tiene un gran efecto sobre la mitofagia. La disminución de OPA1 conduce a una fusión mitocondrial reducida, lo que contribuye a separar las mitocondrias disfuncionales, lo que hace que sea fácil detectarlas y eliminarlas por mitofagia. La interacción de BNIP3 con OPA1 induce la fragmentación mitocondrial. MFN2 puede ser fosforilado por PINK1, promoviendo así el reclutamiento de Parkin a la membrana mitocondrial externa e induciendo la mitofagia dependiente de Parkin. Como proteína de fusión, la participación de MFN2 en la mitofagia es un elemento adicional que sugiere reciprocidad entre la dinámica mitocondrial y la mitofagia. Además, la fisión mitocondrial es esencial para la mitofagia. DRP1 es una proteína de fisión mitocondrial que interactúa con FUNDC1 y BCL2L13 sobre expresados para facilitar la fragmentación mitocondrial y la mitofagia mediada por Parkin. Curiosamente, se ha demostrado que la fisión mediada por DRP1 contrarresta la fosforilación específica de Parkin, lo que evita que las mitocondrias no dañadas sufran una mitofagia dependiente de PINK1-Parkin errónea e innecesaria. La fisión mitocondrial mediada por DRP1 mejoró la autofagia, mientras que la inhibición de

DRP1 debilitó la autofagia mediada por BNIP3. Otro estudio informó que la sobreexpresión de FIS1 aumentó la fragmentación mitocondrial, lo que llevó a la disfunción mitocondrial y al aumento de la formación de autofagosomas. Además, TBC1D15 interactúa con FIS1 para mediar la encapsulación autofágica de las mitocondrias después de la activación de Parkin. En resumen, la mitofagia está relacionada funcionalmente con la dinámica mitocondrial a través de interacciones entre los factores dinámicos mitocondriales y los receptores de mitofagia. La dinámica mitocondrial está estrechamente coordinada con la vía de la mitofagia, ya sea promoviendo el desprendimiento inducido por fisión de un fragmento dañado o fusionando nuevamente las mitocondrias dañadas a la red mitocondrial normal para debilitar la influencia de la disfunción [17,18].

3.9 Enfermedades asociadas con el desequilibrio mitocondrial.

La fusión, la fisión y la mitofagia son esenciales para el funcionamiento normal de las mitocondrias, el metabolismo energético y la degradación celular. Los niveles inadecuados o excesivos de estos procesos alteran el equilibrio necesario para el funcionamiento adecuado de las mitocondrias, lo que en última instancia produce todo tipo de daño celular, especialmente en las células que consumen mucha energía, incluidos los cardiomiocitos, las neuronas, las células tumorales y las células epiteliales pulmonares, que son particularmente vulnerables a la disfunción mitocondrial según la evidencia clínica [18].

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son las principales causas de muerte a nivel mundial en los últimos años, acompañadas de inmensas cargas económicas y sanitarias. El alto requerimiento energético del corazón requiere una dinámica mitocondrial adaptativa para mantener la función normal, que está surgiendo como un factor central en la homeostasis cardiovascular. Aunque la descripción de la dinámica mitocondrial en pacientes con ECV es limitada debido a métodos de detección inadecuados, cada vez hay más líneas de evidencia que sugieren que el deterioro de la dinámica mitocondrial contribuye a varias patologías

cardiovasculares, incluida la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca, la lesión por isquemia-reperfusión y la miocardiopatía metabólica y genética [17,18].

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un espectro de trastornos heterogéneos complejos que se caracterizan por la muerte progresiva de las células nerviosas y la pérdida de tejido cerebral, y sus tratamientos son limitados. Dado que las células nerviosas requieren altos niveles de metabolismo mitocondrial para sus funciones, la disfunción mitocondrial ha surgido como uno de los fenotipos predominantes en las enfermedades neurodegenerativas. La fisión mitocondrial excesiva, la regulación negativa de la fusión mitocondrial, así como una reducción en la mitofagia, se observan en trastornos neurodegenerativos con diversas causas genéticas y ambientales respaldadas con varias líneas de evidencia clínica, incluyendo la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A, atrofia óptica dominante, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, que tienen diversas etiologías fisiopatológicas. Algunas causadas directamente por mutaciones en genes relacionados con la fisión, la fusión y la mitofagia. Por ejemplo, la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y la atrofia óptica dominante son causadas por mutaciones heterocigotas en los genes relacionados con la fusión mitocondrial MFN2 y OPA1, respectivamente. Dos formas de enfermedad de Parkinson hereditaria de inicio temprano son causadas por mutaciones en la serina/treonina quinasa PRKN y PINK1 [17].

La segunda causa principal de muerte a nivel mundial es el cáncer, que se caracteriza por la proliferación celular, metástasis y recurrencia y la resistencia a los medicamentos. Estos procesos están conectados con la fusión, fisión y mitofagia mitocondriales desreguladas. Las mitocondrias son orgánulos heterogéneos con morfología y función altamente dependientes del entorno circundante, por lo tanto, el papel de la dinámica mitocondrial es complejo y no se puede generalizar. Los distintos papeles de la fisión, fusión y mitofagia mitocondriales se han dilucidado en diferentes contextos de cáncer. En la mayoría de los casos, la fisión mitocondrial facilita la proliferación, migración y resistencia a los medicamentos de las células

cancerosas, lo que provoca el desarrollo de cáncer. La fisión mitocondrial excesiva juega un papel causal en la promoción de la transformación de las células cancerosas. Muchos tumores presentan mitocondrias fragmentadas con DRP1 sobre expresado y los niveles de expresión disminuidos de MFN 1 y 2, en cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de colon. Cáncer de mama, neuroblastoma y glioblastoma, que se correlacionan con el potencial metastásico de las células cancerosas. Los niveles aumentados de fosforilación de DRP1 o DRP1-Ser 616 pueden prevenir la apoptosis, cambiar el metabolismo celular, inducir el escape inmunológico, sostener el ciclo celular y la proliferación en células tumorales y promover la aparición y el desarrollo de tumores [17].

Las enfermedades pulmonares se encuentran entre las enfermedades más comunes en todo el mundo. Una variedad de factores como el tabaquismo, las bacterias, los virus, la contaminación del aire y los factores genéticos contribuyen en gran medida al desarrollo de estas enfermedades. Las enfermedades pulmonares comunes incluyen la lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, EPOC, asma, fibrosis pulmonar, hipertensión arterial pulmonar y displasia broncopulmonar. Aunque los mecanismos patológicos que causan estas enfermedades varían, la dinámica mitocondrial juega un papel crucial en su aparición y desarrollo [17,18].

4. Justificación.

En México, el uso de leña como biocombustible para cocinar y calentar la vivienda es aproximadamente de 48% en áreas urbanas y casi 70% en zonas rurales. Las mujeres que utilizan leña para cocinar o calentar sus hogares inhalan aproximadamente 25 millones de litros de aire contaminado a lo largo de su vida. La evidencia epidemiológica asociada a la exposición frecuente al humo de biomasa con enfermedades respiratorias tanto agudas como crónica, incluidas la bronquitis, el enfisema e intoxicación pulmonar. Aunque la exposición al humo de leña es un factor de riesgo considerable para el desarrollo de EPOC en no fumadores, se han realizado pocas investigaciones para determinar los mecanismos por los cuales la exposición al humo de biomasa conduce a cambios perjudiciales en la función pulmonar de manera aguda y subaguda. En países subdesarrollados, tanto el uso creciente de leña como la exposición a los compuestos químicos partículas finas y ultrafinas derivadas de la combustión se han identificado como un factor importante que afecta la salud durante el desarrollo humano. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estos efectos aún no han sido bien esclarecidos. Una de las células que participan cuando el humo de biomasa llega al interior de los pulmones son los fibroblastos, células de origen mesenquimal predominantes en el parénquima, que participan en la síntesis y degradación de la matriz extracelular (MEC), tanto en estadios fisiológicos como fisiopatológicos, activándose como parte de la respuesta inflamatoria y aumentando su tasa de proliferación y actividad en el recambio de la MEC. Por lo que en este trabajo se estudió el efecto que tiene la exposición del extracto de humo de leña en los fibroblastos de pulmón humano normal y su relación con la dinámica mitocondrial que puede tener un papel crucial en la aparición y desarrollo de estas enfermedades.

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 la dinámica mitocondrial en fibroblastos derivados de pulmón humano normal y analizar si el EHL induce apoptosis en estas células.

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 Mitofusina1, proteína implicada en los procesos de fusión mitocondrial y de la proteína translocadora de nucleótidos de adenina ANT3 relacionada con procesos de apoptosis celular.
3. Observar si el EHL induce cambios morfológicos en los fibroblastos de pulmón humano normal.
4. Analizar por Citometría de Flujo si el EHL es capaz de inducir apoptosis en los fibroblastos de pulmón humano normal.

6. Materiales y métodos.

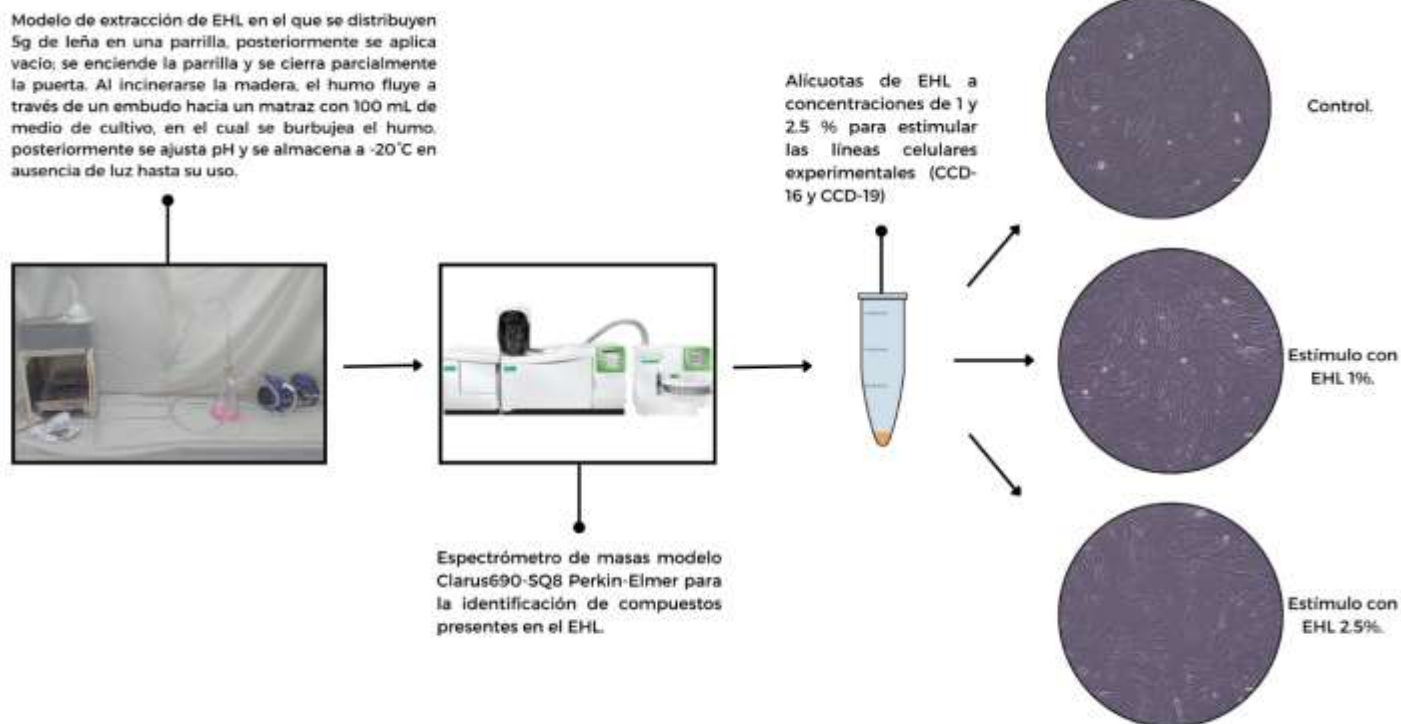
6.1 Obtención y cultivo de fibroblastos humanos.

Se emplearon dos líneas celulares comerciales de fibroblastos de pulmón humano normal CCD-19 Lu (donante femenino de 20 años, sin antecedentes patológicos) y CCD-16 Lu (donante masculino de 35 años, sin antecedentes patológicos) adquiridas del American Type Culture Collection (ATCC). Los fibroblastos fueron cultivados en cajas T-25 (Corning® Cell culture flask), se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml) y 10% de suero fetal bovino (Gibco certified Fetal Bovine Serum). Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada a una concentración de 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C. Los experimentos se llevaron a cabo durante los primeros pasajes celulares (p4-p6).

6.2 Obtención del extracto de humo de leña (EHL).

Para la preparación del extracto de humo de leña se utilizaron 5 g de madera de pino, los cuales fueron incinerados de forma completa. El humo se burbujeó en 100 mL de medio de cultivo Ham (F-12) libre de suero, con la ayuda de un sistema de extracción hasta que la madera quedó incinerada al 100 %. Posteriormente se ajustó el pH a 7.2 y se esterilizó usando un filtro tipo Millipore con poro de 0.22 micrómetros. Una vez esterilizado, el extracto de humo de leña fue almacenado en tubos estériles y sellados a -20°C. Esta solución se consideró como extracto de humo de leña (EHL) al 100%.

En un ensayo paralelo se preparó EHL 100% en las mismas condiciones, pero usando agua desionizada para su recuperación. Este 100% EHL soluble en agua se usó para analizar los HAP.



6.3 Caracterización de los compuestos químicos del 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 los compuestos químicos disueltos en el agua utilizada para recuperar el humo de leña.

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

Los fibroblastos fueron estimulados con diluciones porcentuales de EHL (1% y 2.5%) en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Como controles se incluyeron cultivos incubados únicamente con DMEM. Las células se incubaron durante 24 horas en una atmósfera humidificada a una concentración de 5% de CO₂ y una temperatura de 37°C.

6.5 Microscopia de campo claro.

Los fibroblastos CCD-16 y CCD-19 fueron sembrados en cajas de cultivo de 6 pozos a una densidad de 180,000 células por pozo, Después de 24 horas las células fueron estimuladas con 1% y 2.5% de EHL. Como control se incluyeron fibroblastos incubados solo con medio suplementado con 10% SFB, todo el ensayo experimental se incubó durante 24 horas. Posteriormente los pozos se lavaron con medio libre de suero y se realizó la toma de fotografías en el equipo EVOS XI (412743) para visualizar los cambios morfológicos en las células.

6.6 Obtención de muestras de lisados celulares para el análisis por Western blot.

Los fibroblastos CCD-16 y CCD-19 fueron sembrados en cajas de cultivo de T-25 cm² marca Corning a una densidad de 800,000 células por caja. Después de 24 horas las células fueron estimuladas con 1% y 2.5% de EHL. Como control se incluyeron fibroblastos incubados solo con medio suplementado con 10% SFB, todo el ensayo experimental se incubó durante 24 horas. Pasadas las 24 horas de estímulo con el EHL, los fibroblastos de pulmón humano normal se lavaron con PBS 1X frío para eliminar restos de medio de cultivo DMEM, posteriormente las células fueron lisadas con 30 µL de buffer de lisis RIPA (PBS 1x, 100 µL SDS al 10%, 100 µL de Triton-X y deoxicolato al 1%) suplementado con 10 µL de un cocktail de

inhibidores para proteasas de serina, proteasas de cisteína y aminopeptidasas (Thermo Scientific™ Halt™ sin EDTA) y 1 mM 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 posteriormente las muestras fueron sonicadas a una frecuencia de 50 kHz, cuidando de mantener las muestras en un baño de hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente se centrifugaron en un equipo Mikro 22R Hettich centrifugue a una velocidad de 14,000 rpm /10 minutos/4°C. Al finalizar se recuperó el sobrenadante y se almaceno a -80°C hasta su uso.

6.7 Cuantificación de proteínas.

Para determinar la cantidad de proteínas presentes en cada muestra, se utilizó el método de cuantificación de proteínas de Bradford, el cual se basa en un cambio de color del colorante azul Coomassie® brilliant blue G-250 presente en el reactivo de Bradford (Bio-Rad® protein assay dye reagent concentrate), este cambio de color ocurre cuando el colorante cambia su estructura al unirse a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos presentes en las proteínas. La intensidad del color obtenido es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Se utilizó una curva estándar de Albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1 mg/ml, con diluciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 µg/µl, para determinar la concentración de proteína total de las muestras de lisados celulares extrapolando los valores con los de la curva estandar. Las muestras se diluyeron 1:10 con la finalidad de obtener un valor de absorbancia dentro del rango de la curva estándar. Posteriormente se adicionaron 200 µl del reactivo de Bradford a todas las muestras y se leyeron en un equipo ELISA (Accuris™ Smartreader™ 96-T) a una longitud de onda de 595 nm. Para el blanco, únicamente se utilizó agua desionizada y reactivo de Bradford.

6.8 Análisis por Western Blot.

Para identificar proteínas específicas presentes en las muestras de los lisados de fibroblastos pulmonares estimulados con EHL, se empleó la técnica Western blot. Este método consiste en separar las proteínas presentes en una muestra según su peso molecular mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras.

Procedimiento experimental: Los lisados celulares de fibroblastos humanos normales expuestos a diferentes concentraciones de EHL se mezclaron (V/V) con buffer Laemmli y se fraccionaron en geles SDS-PAGE al 8,10 y 12%, cargando 30 µg de proteína por muestra. Posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF utilizando una cámara de transferencia húmeda. El gel se transfirió a 100 V durante 60 minutos y posteriormente las membranas fueron bloqueadas con albúmina serica bovina (BSA) al 5% en buffer PBS-T (10mM Tris base, pH 8.0, 150 mM de NaCl, y 0.01% Tween 20) por una 1 hora a temperatura ambiente para bloquear los sitios inespecíficos de unión a proteínas. Después la membrana fue incubada 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario específico (Tabla 1). En seguida la membrana se lavó 4 veces con PBS-T 0.05% durante 10 minutos. Al término de los lavados, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico (Tabla 2). Posteriormente se realizaron 4 lavados más de 10 minutos cada uno con PBS-T 0.05% (10mM Tris base, pH 8.0, 150 mM de NaCl, y 0.01% Tween 20). Finalmente, las membranas se revelaron utilizando el sistema de detección de quimioluminiscencia PICO (Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Pico Plus) y FEMTO (Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Femto). Las imágenes obtenidas del revelado de las membranas se analizaron con el programa Image Lab de Bio-Rad.

<i>Anticuerpo primario</i>	<i>Descripción</i>	<i>Tamaño</i>
Mfn1 (D-10): SC-166644. Santa Cruz Biotechnology inc.®	Anticuerpo monoclonal de ratón generado contra los aminoácidos 10-74, ubicados en un dominio citoplasmático N-terminal de Mfn1 de origen humano.	86 kDa
ANT3 (2A9): SC-293434 Santa Cruz Biotechnology inc.®	Anticuerpo monoclonal de ratón generado contra los aminoácidos 135-209, que representan una porción parcial de ANT3 de origen humano.	33 kDa
Purified anti-VDAC1 Antibody. Catalog: 820702. BioLegend®	Proteína de canal aniónico selectivo dependiente del voltaje. Es el principal canal de transporte de iones de calcio, desempeñando un papel en la regulación del ciclo del ácido cítrico y la generación de ROS.	30 kDa

Tabla 1. *Anticuerpos primarios empleados para la detección de proteínas asociadas al proceso de fusión mitocondrial.*

<i>Anticuerpo secundario</i>	<i>Descripción</i>	<i>Tamaño</i>
AffiniPure™ Goat AntiMouse IgG (H+L) AB-2338447. Jaackson ImmunoResearch Inc.	Los anticuerpos IgG completos se aíslan a partir de antisueros mediante cromatografía de afinidad. Poseen una porción FC y dos porciones Fab de unión al antígeno unidas entre sí por enlaces disulfuro, por lo tanto, son divalentes.	130 kDa

Tabla 2. *Anticuerpo secundario empleado para la visualización de proteínas asociadas al proceso de fusión mitocondrial.*

6.9 Ensayo de Apoptosis celular.

Para determinar el porcentaje de apoptosis de las líneas celulares CCD-16 y CCD-19 que fueron estimuladas con EHL a 1% y 2.5%, se empleó el kit FITC Annexin V Apoptosis Detection kit I BD Pharmingen™, como sabemos en el proceso de apoptosis el fosfolípido fosfatidilserina (PS) sufre translocación desde la capa interna de la membrana hacia la capa externa. La proteína Anexina V tiene una alta afinidad por la PS y se une a las células que exponen este fosfolípido en su superficie. La anexina V al estar conjugada con fluorocromos como la fluoresceína isotiocianato (FITC) funciona como una sonda sensible para el análisis por citometría de flujo de las células que están experimentando apoptosis en etapa temprana. Este método de tinción se usa comúnmente de forma simultánea con un tinte vital como yoduro de propidio (PI), el cual permite identificar de forma más precisa las células en apoptosis temprana ya que PI es permeable únicamente en la membrana de células muertas o con graves daños en la membrana.

Procedimiento experimental: Los fibroblastos de las líneas CCD-16 y CCD-19 fueron sembrados en cajas de cultivo de 6 pozos (Costar) ajustando la densidad celular a 250,000 células por pozo. Las células fueron estimuladas con 1 y 2.5% de EHL por un período de 12 y 24 horas. Todas las variables experimentales se montaron por duplicado. Posteriormente las células fueron marcadas con Annexina V-Yoduro de propidio siguiendo las recomendaciones del fabricante, se utilizó estaurosporina (1 μ M) como control positivo. Posteriormente para el análisis por citometría de flujo, las células se adquirieron en un citómetro BD FACScanto™ II Clinical Flow Cytometry System configurado con láseres para FITC (488 nm) y PI (561 nm). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.8 (FlowJo, Ashland, OR, EUA, Becton Dickinson and Company).

7. Resultados.

7.1 El EHL induce cambios en la morfología de las líneas de fibroblastos de pulmón humano normal CCD-16 y CCD-19.

Diversos estudios han mostrado que la exposición al EHL induce alteraciones en la tasa de viabilidad celular de células pulmonares [19,20]. Para poder determinar si el EHL induce cambios morfológicos en las líneas de fibroblastos de pulmón humano normal CCD-16 y CCD-19, evaluamos el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de EHL (1 y 2.5 %) después de 24 h. Como se observa en la **Figura 10**, nuestros resultados mostraron que los fibroblastos control presentan una morfología alargada y típica de estas células con una estructura bien definida y un patrón organizado con una alta densidad celular, aproximadamente un 80-90% de confluencia. Las células están firmemente adheridas y conectadas entre sí, sin signos visibles de estrés como retracción celular, cambios en su forma habitual o pérdida de adhesión.

En los fibroblastos expuestos al 1% de EHL algunas células presentan cambios leves en su forma, como una mayor redondez o menor elongación en comparación con el control, la densidad celular parece haber disminuido ligeramente, lo que sugiere estrés celular moderado con una apariencia morfológica de las células típica alargada.

En contraste los fibroblastos expuestos a 2.5% de EHL muestran cambios más evidentes en la forma de las células, con un mayor número de células redondeadas o más retraídas, algunas podrían estar mostrando signos de apoptosis o necrosis, también se observa una menor densidad celular en comparación con las otras condiciones, lo que podría sugerir un mayor efecto tóxico del humo de leña a esta concentración y un aumento en el estrés celular, con un impacto en la viabilidad y proliferación de los fibroblastos.

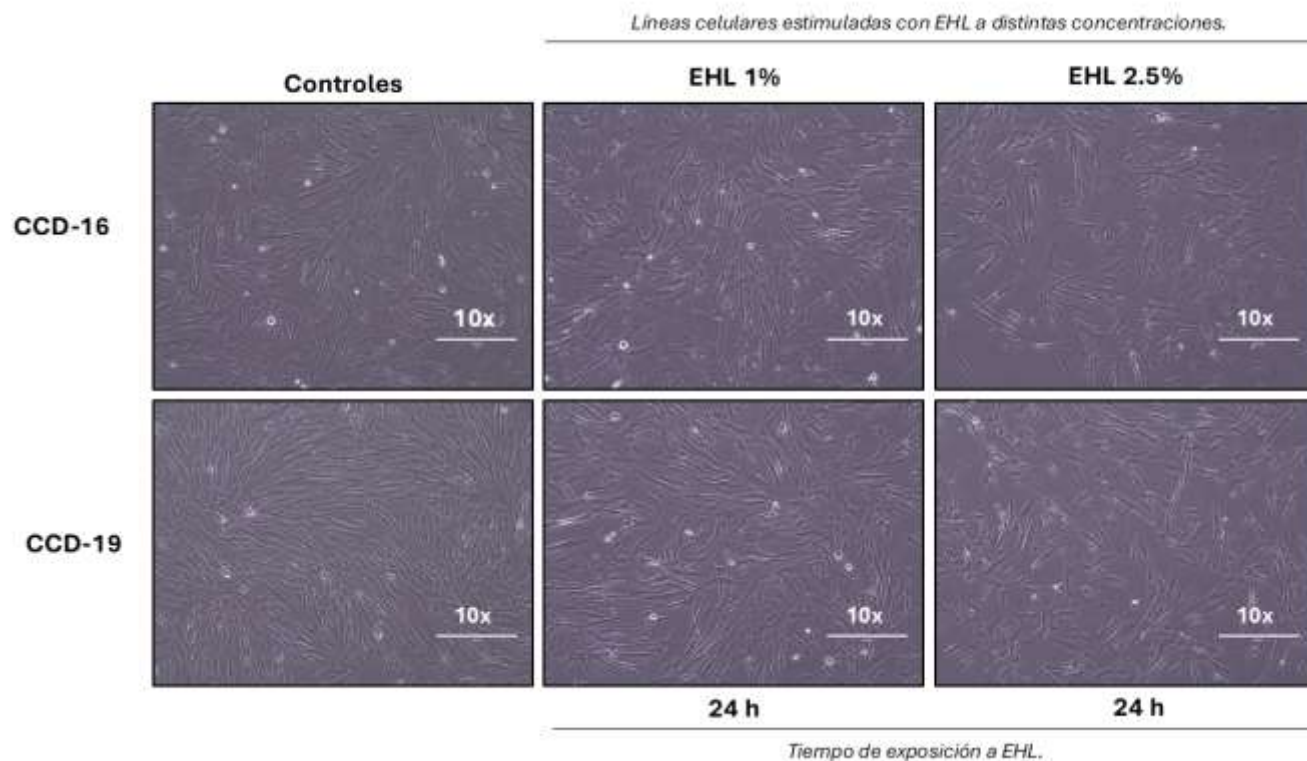


Figura 10. *Imágenes de microscopía de campo claro, donde podemos visualizar el efecto de las dos concentraciones del EHL (1 y 2.5%) sobre las líneas CCD-16 y CCD-19 de fibroblastos de pulmón humano normal, ambas líneas muestran cambios en su morfología dependiente de la dosis de EHL.*

7.2 Efecto del EHL sobre la expresión de proteínas asociadas con el proceso de fusión mitocondrial.

Para el análisis de la expresión de proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial en los fibroblastos estimulados con EHL (1 y 2.5%), se utilizaron extractos de proteína total aislada de fibroblastos control y estimulados con EHL. Nuestros resultados mostraron que el estímulo con EHL modifica los niveles de expresión de la proteína mitofusina 1 (MFN-1) implicada en los procesos de fusión mitocondrial. Como se observa en la **Figura 11** la expresión de la proteína MFN-1 incrementó en las dos líneas de fibroblastos en comparación con los fibroblastos control presentando un efecto dosis dependiente, siendo más evidente el efecto en la concentración de 2.5% de extracto de humo de leña.

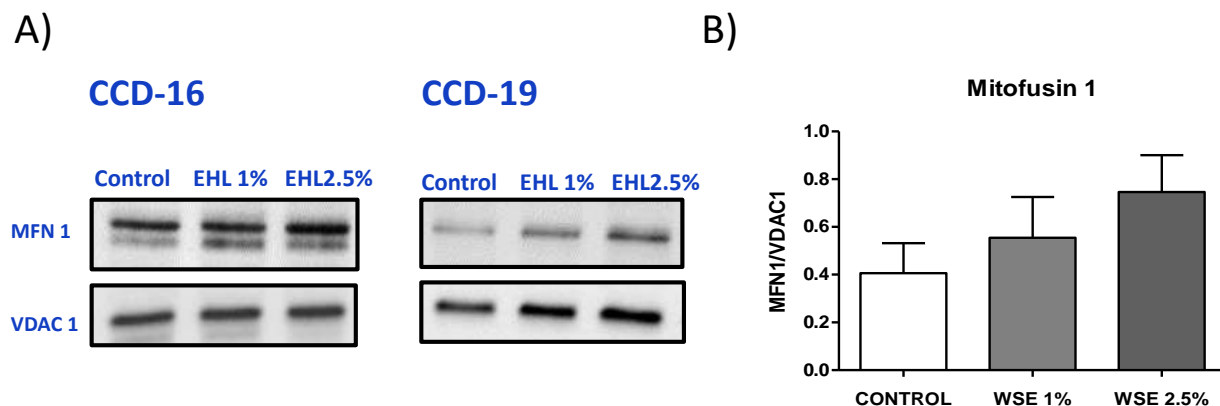


Figura 11. Efecto del EHL sobre los niveles de expresión de la proteína MFN1. A) Efecto del EHL a 1 y 2.5% sobre la expresión de MFN1 en las dos líneas de fibroblastos normales de pulmón CCD-16 y CCD-19, normalizado con el control de carga mitocondrial VDAC1. B) Gráfica que muestra el análisis densitométrico de la expresión de la proteína MFN1.

7.3 Efecto del EHL sobre la expresión de la translocasa de nucleótidos de adenina mitocondrial ANT3.

La translocasa de nucleótidos de adenina mitocondrial (ANT) es un componente regulador del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mtPTP), que controla la transición de permeabilidad mitocondrial durante la apoptosis. Para explorar si el EHL tiene efectos en los niveles de expresión de esta proteína se realizaron extractos de proteína total aislada de fibroblastos controles y estimulados con 1 y 2.5 % de EHL. Nuestros resultados mostraron que el EHL aumenta los niveles de expresión de esta proteína implicada en procesos de apoptosis. Como se observa en la **Figura 12** la expresión de la proteína ANT3 aumentó de manera significativa en los fibroblastos estimulados con 2.5 % de EHL.

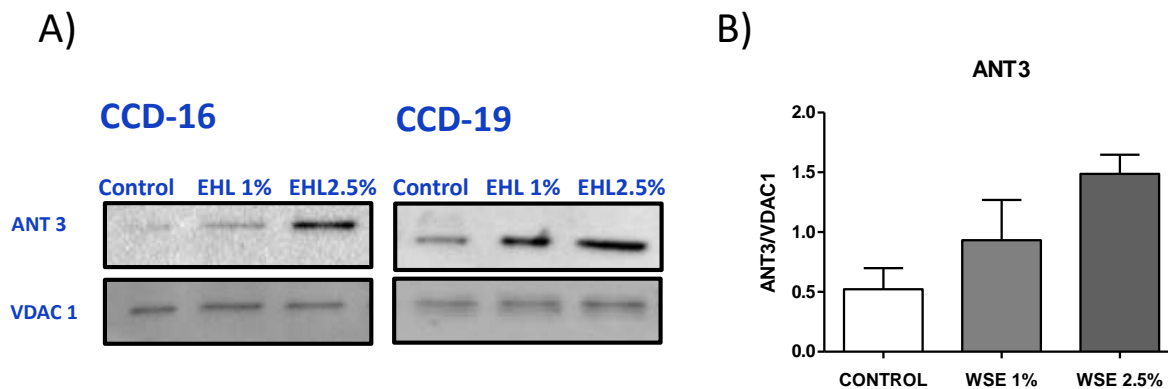


Figura 12. Efecto del EHL sobre los niveles de expresión de la proteína ANT3. A) Efecto del EHL a 1 y 2.5% sobre la expresión de ANT3 en las líneas de fibroblastos CCD-16 y CCD-19, normalizado con el control de carga mitocondrial VDAC1. B) Gráfica que muestra el análisis densitométrico de la expresión de la proteína ANT3.

7.4 El EHL induce apoptosis en las líneas de fibroblastos de pulmón humano normal CCD-16 y CCD-19.

Se sabe que la despolarización de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) tiene cierta correlación con la muerte celular y la apoptosis efectiva requiere de la función de ANT3. En resultados previos encontramos que el EHL disminuye de manera significativa el $\Delta\Psi_m$ y de manera interesante ahora observamos que el EHL aumenta la expresión de la proteína ANT3, por lo que decidimos explorar el efecto del EHL en los procesos de apoptosis celular. Para determinar si el EHL induce apoptosis en las líneas de fibroblastos normales de pulmón CCD-16 y CCD-19, se estimularon con EHL (1 y 2.5%) por 12 y 24 horas. La apoptosis se analizó utilizando la doble tinción con Anexina V/Ioduro de propidio mediante la técnica de citometría de flujo. Después se evaluó el porcentaje de células apoptóticas (incluida la apoptosis temprana y tardía). Los resultados revelaron que el EHL induce apoptosis en los fibroblastos en comparación con los fibroblastos control como podemos observar en la **Figura 13 y 14**.

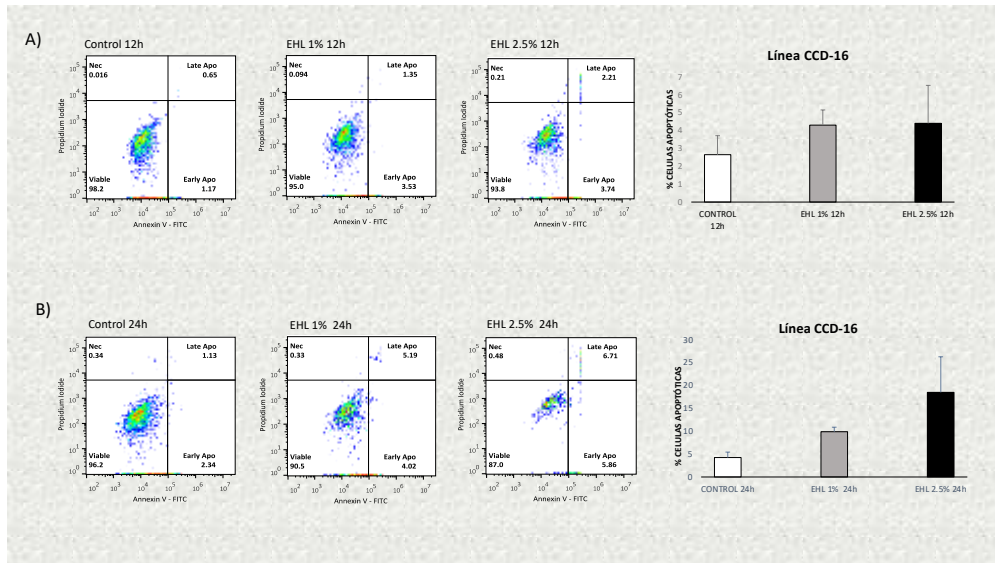


Figura 13. Efecto del EHL sobre la apoptosis de fibroblastos CCD-16. La tasa de apoptosis celular se analizó mediante citometría de flujo utilizando el método de doble tinción de Anexina V/Ioduro de propidio (FITC/PI) se utilizó estaurosporina como control positivo (STS 1 μ M). Las imágenes muestran los porcentajes de apoptosis temprana y tardía. A) Fibroblastos de la línea CCD-16 estimulados por 12 horas con EHL. Como se observa en la gráfica el EHL aumenta el porcentaje de apoptosis. B) Fibroblastos de la línea CCD-16 estimulados por 24 horas con EHL y como podemos observar en la gráfica el porcentaje de células apoptóticas aumenta de manera más evidente a 2.5% de EHL con respecto al control.

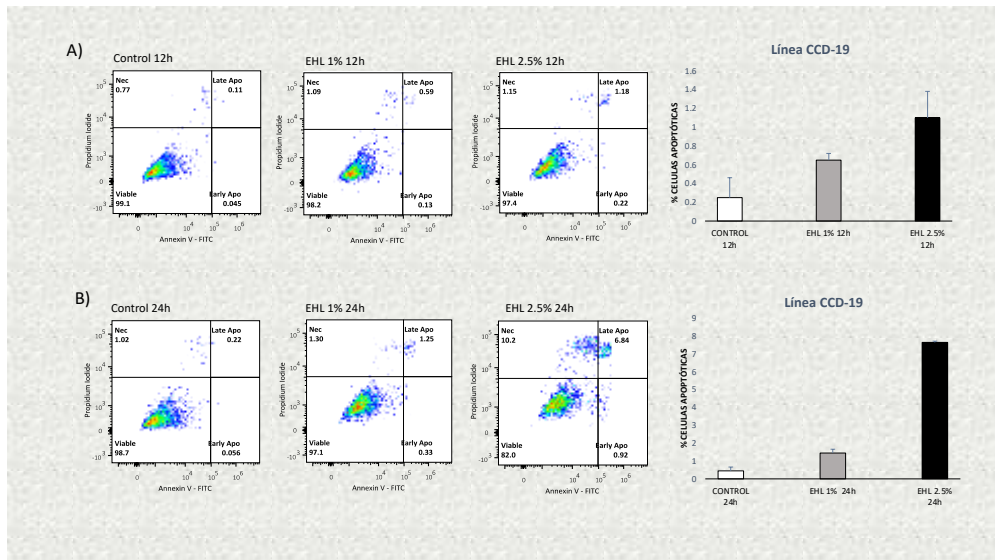


Figura 14. Efecto del EHL sobre la apoptosis de fibroblastos CCD-19. Las imágenes muestran los porcentajes de apoptosis temprana y tardía. A) Fibroblastos de la línea CCD-19 estimulados por 12 horas con EHL, las imágenes muestran los porcentajes de apoptosis temprana y tardía y como podemos observar en la gráfica el EHL aumenta el porcentaje de apoptosis. B) Fibroblastos de la línea CCD-19 estimulados por 24 horas con EHL. La gráfica muestra el porcentaje de células apoptóticas, mostrando que el EHL a una concentración de 2.5% aumenta de manera significativa la apoptosis con respecto al control, los resultados se expresan como la media \pm EEM.

8. Discusión.

Aunque se ha demostrado que la exposición crónica al humo de leña es un factor de riesgo considerable para el desarrollo de EPOC en los pacientes no fumadores. Existen pocas investigaciones para determinar los mecanismos por los cuales la exposición al humo de biomasa conduce a cambios perjudiciales en la función pulmonar de manera aguda y subaguda [1,2]. 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. Estudios previos han demostrado que la exposición al EHL en cobayos induce disfunción mitocondrial en células totales de pulmón. Sin embargo, se desconoce si el EHL induce en los fibroblastos alteraciones en la dinámica mitocondrial, específicamente en los procesos de fisión y fusión mitocondrial ya que este proceso es fundamental para el funcionamiento de las mitocondrias, pero puede verse alterado por el estrés metabólico y ambiental. Se ha reportado que el EHL induce estrés oxidante [3] y una de las principales fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es la mitocondria, por lo tanto, nosotros hipotetizamos que el EHL causa disfunción mitocondrial, lo cual podría producir alteraciones en la dinámica mitocondrial y acumulación de daño.

La dinámica mitocondrial compuesta por los procesos de fusión y fisión juega un papel crucial en la regulación de la salud celular al garantizar la funcionalidad, morfología y distribución adecuadas de las mitocondrias dentro de las células [21].

Por otro lado, la fusión mitocondrial es el proceso mediante el cual se unen dos o más mitocondrias para formar una mitocondria más grande. Este proceso es fundamental para el funcionamiento óptimo de las mitocondrias, especialmente bajo estrés metabólico y ambiental [19].

Como sabemos la fusión está dirigida por proteínas especializadas como las Mitofusinas. Nuestro estudio tuvo como objetivo determinar el efecto del EHL sobre

los procesos de dinámica mitocondrial analizando los cambios en la proteína de fusión MFN1. La elevada expresión de MFN1 en las células CDD16 y CDD-19 demuestra que el EHL altera los procesos de fusión, en donde observamos un aumento progresivo en los niveles de expresión de esta proteína al aumentar la concentración del EHL, 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, ya 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 [21].

En el caso de la translocasa de nucleótidos de adenina mitocondrial ANT3 como se mostró en los análisis por western blot, presento un aumento significativo en las células estimuladas con la concentración más alta de EHL. Se sabe que en los seres humanos hay cuatro isoformas de ANT que comparten entre un 60% y un 80% de secuencias idénticas. Existe evidencia de que la sobreexpresión de ANT1 o ANT3 induce apoptosis con una disminución concomitante del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), lo cual corrobora nuestros resultados obtenidos [22]. Debido a que el EHL induce la despolarización de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) el cual es un evento clave en la apoptosis, nosotros en un trabajo en paralelo a éste encontramos que el EHL induce la despolarización de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Además, se ha reportado que el extracto de humo de leña induce estrés oxidativo, favoreciendo la apoptosis de células epiteliales de pulmón humano [4]. Los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas en las células estimuladas con EHL a una concentración de 2.5%, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la investigación realizada por Liu PL, et al. En donde demuestra el incremento en los niveles de apoptosis en células endoteliales de pulmón expuestas a EHL.

De igual forma, se demostró que la exposición al EHL aceleró la apoptosis temprana pues induce la translocación de fosfatidilserina a la capa externa de la membrana plasmática. Concluyendo de esta manera que comprender el mecanismo de la fisiopatología inducida por el humo de leña es importante para diseñar nuevas estrategias terapéuticas a futuro.

9. Conclusiones.

A lo largo de esta investigación, se estableció un modelo de exposición aguda al EHL en fibroblastos de pulmón humano normal, lo que permitió evaluar sus efectos a nivel celular y molecular. Los hallazgos obtenidos, evidencian que el EHL modula la expresión de proteínas clave en el proceso de dinámica mitocondrial, particularmente en proteínas de fusión mitocondrial como MFN1 y ANT3, lo que sugiere una alteración en el equilibrio energético y funcional de estos organelos. Además, se demostró que la exposición al EHL induce apoptosis en fibroblastos de las líneas celulares CCD-16 y CCD-19, lo que resalta su impacto en células pulmonares normales. Estos resultados aportan información relevante sobre los mecanismos celulares asociados a la exposición al EHL y podrían contribuir al desarrollo de estrategias relacionadas a la protección de la función pulmonar frente a los efectos de la exposición al EHL, así como ante otros contaminantes derivados de biomasa.

10. Referencias.

1. Lentz, C. W., & Peterson, H. D. (1997). Smoke inhalation is a multilevel insult to the pulmonary system. *Current opinion in pulmonary medicine*, 3(3), 221–226.
2. Swiston, J. R., Davidson, W., Attridge, S., Li, G. T., Brauer, M., & van Eeden, S. F. (2008). Wood smoke exposure induces a pulmonary and systemic inflammatory response in firefighters. *The European respiratory journal*, 32(1), 129–138.
3. Kimmel EC, Still KR. (1999). Acute lung injury, acute respiratory distress syndrome and inhalation injury: an overview. *Drug Chem Toxicol*. 22(1): 91-128.
4. Liu PL, Chen YL, Chen YH, Lin SJ, Kou YR. (2005). Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells: role of AIF and EndoG. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 289(5): 739-749.
5. Granados-Castro, L. F., Rodríguez-Rangel, D. S., Montaña, M., Ramos, C. & Pedraza-Chaverri, J. (2013). Wood smoke exposure induces a decrease in respiration parameters and in the activity of respiratory complexes I and IV in lung mitochondria from guinea pigs. *Environmental Toxicology*, 30(4), 461-471.
6. Hara H, Kuwano K, Araya J. (2018). Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF. *Cells*. 24;7(8): 86.
7. Agustí, A., Celli, B. R., Criner, G. J., Halpin, D., Anzueto, A., Barnes, P., Bourbeau, J., Han, M. K., Martinez, F. J., De Oca, M. M., Mortimer, K., Papi, A., Pavord, I., Roche, N., Salvi, S., Sin, D. D., Singh, D., Stockley, R., Varela, M. V. L., . . . Vogelmeier, C. F. (2023). Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2023 Report: GOLD Executive Summary. *European Respiratory Journal*, 61(4), 2300239. <https://doi.org/10.1183/13993003.00239-2023>
8. 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. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2016.04.004>
9. Recillas-Román, S., Montaña, M., Ruiz, V., Pérez-Ramos, J., Becerril, C., Herrera, I., Amador-Muñoz, O., Martínez-Domínguez, Y. M., & Ramos, C. (2021). Wood Smoke Extract Promotes Extracellular Matrix Remodeling in Normal Human Lung Fibroblasts. *International Journal Of Toxicology*, 40(6), 506-516. <https://doi.org/10.1177/10915818211044809>

10. Tang, Y., Chen, Z., Fang, Z., Zhao, J., Zhou, Y., & Tang, C. (2021). Multi-omics study on biomarker and pathway discovery of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal Of Breath Research*, 15(4), 044001. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/ac15ea>
11. Liang, Y., Chu, P. H., Tian, L., Ho, K. F., Ip, M. S. M., & Mak, J. C. W. (2022). Targeting mitochondrial permeability transition pore ameliorates PM2.5-induced mitochondrial dysfunction in airway epithelial cells. *Environmental Pollution*, 295, 118720. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118720>
12. Yang, Z., Wang, J., Zhao, T., Wang, L., Liang, T., & Zheng, Y. (2024). Mitochondrial structure and function: a new direction for the targeted treatment of chronic liver disease with Chinese herbal medicine. *Journal Of Ethnopharmacology*, 334, 118461. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118461>
13. Berry, B. J., Vodičková, A., Müller-Eigner, A., Meng, C., Ludwig, C., Kaeberlein, M., Peleg, S., & Wojtovich, A. P. (2022). Optogenetic rejuvenation of mitochondrial membrane potential extends *C. elegans* lifespan. *Nature Aging*, 3(2), 157-161. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00340-7>.
14. Rodwell, V. W., Bender, D., Botham, K. M., Kennelly, P. J., & Weil, P. A. (2021). *Bioquímica ilustrada de Harper - 31.ed. McGraw Hill Brasil*.
15. Castellón, E. H., Del Pilar Ramos Álvarez, M., Salom, P. R., & Arribas, M. M. V. (2014). *Bioquímica básica + StudentConsult en español: Base molecular de los procesos fisiológicos*.
16. Liu, Y. J., McIntyre, R. L., Janssens, G. E., & Houtkooper, R. H. (2020). Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 186, 111212. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111212>.
17. Wang, Y., Dai, X., Li, H., Jiang, H., Zhou, J., Zhang, S., Guo, J., Shen, L., Yang, H., Lin, J., & Yan, H. (2023). The role of mitochondrial dynamics in disease. *MedComm*, 4(6). <https://doi.org/10.1002/mco2.462>
18. Jenkins, B. C., Neikirk, K., Katti, P., Claypool, S. M., Kirabo, A., McReynolds, M. R., & Hinton, A. (2024). Mitochondria in disease: changes in shapes and dynamics. *Trends In Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2024.01.011>
19. 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.

20. Recillas-Román S, Montañaño 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.
21. Youle R. J & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.),* 337 (6098), 1062-1065.
22. Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D., & Palmieri, F. (2004). A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Letters,* 579 (3), 633-637.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.034>