



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA CARDIOVASCULAR

**EFFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN LA SEÑALIZACIÓN
DE CALCIO INTRACELULAR EN FIBROBLASTOS DE
PULMÓN HUMANO DE LA LÍNEA CELULAR WI-38**

Tesis de para obtener el grado de

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA:
MAYTE LÓPEZ TEYSSIER

DIRECTOR
D. C. ROBERTO BERRA ROMANI

CODIRECTOR
D. C. MARIO GARCÍA CARRASCO

OCTUBRE, 2022

Contenido

1. Resumen	1
2. Abreviaturas	2
3. Índice de figuras	5
4. Índice de tablas	6
5. Introducción	7
6. Antecedentes	8
6.1. Antecedentes generales.....	8
6.1.1. Fibrosis pulmonar	8
6.1.2. Fibroblastos pulmonares	11
6.1.3. Regulación de la $[Ca^{2+}]_i$	11
6.1.4. Ácido araquidónico	16
6.2. Antecedentes específicos	18
7. Justificación	20
8. Planteamiento del problema	21
9. Hipótesis	21
10. Objetivos	22
10.1. Objetivo general	22
10.2. Objetivos específicos	22
11. Material y métodos	22
11.1. Diseño del estudio.....	22
11.2. Ubicación espacio-temporal	23
11.3. Estrategia de trabajo	23
11.4. Muestreo	24
11.4.1. Definición de la unidad población	24
11.4.2. Criterios de selección de las unidades de muestreo	24
11.4.3. Diseño y tipo de muestreo.....	24
11.4.3.1. <i>Tamaño de la muestra</i>	24
11.4.3.2. <i>Definición de las variables y escalas de medición</i>	24

11.4.4.	Método de recolección de datos.....	26
11.5.	Técnicas y procedimientos.....	26
11.5.1.	Cultivo celular.....	26
11.5.2.	Medición de $[Ca^{2+}]_i$	27
11.5.3.	Protocolos experimentales por objetivo.....	29
11.6.	Análisis de datos.....	30
11.7.	Diseño estadístico.....	31
11.7.1.	Hipótesis estadística.....	31
11.7.2.	Prueba estadística.....	31
11.8.	Logística.....	31
11.8.1.	Recursos humanos.....	31
11.8.2.	Recursos materiales.....	32
11.8.3.	Recursos financieros.....	32
12.	Resultados	32
12.1.	El AA genera una señal de Ca^{2+} concentración-dependiente en fibroblastos WI-38.	32
12.2.	La estimulación repetida de los fibroblastos de pulmón humano con AA causa desensibilización de la señal de Ca^{2+}	35
12.3.	Efecto directo del AA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y no por los productos de su metabolismo y el efecto del ácido palmitoleico (AP) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano WI-38.....	36
12.4.	El AA activa la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38.	38
12.5.	La liberación de Ca^{2+} inducida por el AA es dependiente del RE, lisosomas y canales TPC1-2.....	41
13.	Discusión	44
14.	Conclusiones	51
15.	Bibliografía	52

1. Resumen

Antecedentes: La fibrosis pulmonar es una enfermedad pulmonar intersticial producida por la síntesis excesiva de matriz extracelular por parte de los fibroblastos, impulsada por un entorno inflamatorio, con citocinas y quimiocinas presentes, así como con altas concentraciones de ácido araquidónico (AA). Hasta este momento se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales el AA puede activar a los fibroblastos pulmonares. A pesar del conocimiento actual sobre el papel fundamental del calcio (Ca^{2+}) intracelular en la modulación de las diversas funciones celulares de los fibroblastos, incluyendo la producción de la matriz extracelular, y que el AA puede causar un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en diversos tipos celulares, a la fecha no se ha estudiado el efecto del AA sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano.

Objetivo: Evaluar el efecto del AA sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano (WI-38).

Métodos: Se incubaron fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 con el colorante fluorescente sensible a Ca^{2+} Fura-2/AM y el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por AA fue cuantificado mediante técnicas microfluorimétricas.

Resultados: La aplicación de AA generó un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de manera concentración-dependiente en fibroblastos de pulmón humano, con una concentración efectiva media (EC50) de 2.44 μM . El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el AA es activada directamente por esta molécula y no por los productos de su metabolismo. La aplicación consecutiva de AA causa desensibilización de la señal de Ca^{2+} intracelular. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el AA es debida a la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y de los lisosomas, y a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular.

Conclusión: El AA causa un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano (WI-38), a través de la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y por la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Estos resultados proporcionan la primera caracterización del efecto de la aplicación exógena de AA sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano que podrían contribuir a la comprensión del papel del AA en el proceso de fibrosis pulmonar.

2. Abreviaturas

[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio libre intracelular
0Ca	Solución salina fisiológica libre de calcio
5-HT	Serotonina
A.U.	Unidades arbitrarias
AA	Ácido araquidónico
ADP	Adenosín difosfato
AP	Ácido palmitoleico
ARC	Canal de Ca ²⁺ regulado por ácido araquidónico
ATP	Adenosín trifosfato
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
Ca ²⁺	Ion calcio
Cl ⁻	Ion cloro
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenasas
CPA	Ácido ciclopiazónico
CYP450	Citocromo P450
DAG	Diacilglicerol
EC50	Concentración efectiva 50
EET	Epoxieicosatrienoicos
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ETYA	Ácido eicosatrienoico
FBS	Suero fetal bovino
FP	Fibrosis pulmonar
FPI	Fibrosis pulmonar idiopática
Fura-2/AM	Fura-2 acetoximetil éster
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GABA-R	Receptor de ácido gamma amino butírico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GPN	Glycyl-L-fenilalanina 2-naftilamida
HCAEC	Células endoteliales de arteria coronaria humana

HETE	Ácidos hidroxiperoxieicosatetraenoicos
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
IP ₃ R	Receptor-canal sensible a inositol 1,4,5 trifosfato
K ⁺	Ion potasio
KATP	Canales de potasio sensibles a ATP
LOX	Lipoxigenasas
LT	Leucotrienos
MCP1/CCL2	Proteína quimiotáctica de monocitos 1/CCL2
MEC	Matriz extracelular
Mg ²⁺	Ion magnesio
MIP1α/CCL3	Proteína inhibidora de macrófagos 1α/CCL3
Na ⁺	Ion sodio
NAADP	Ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato
nAChR	Receptor a acetil colina neuronal
NCX	Intercambiador de Na ⁺ /Ca ²⁺
NE	Noradrenalina
PDGF	El factor derivado de plaquetas
PG	Prostaglandinas
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PLA ₂	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	ATPasa de transporte de Ca ²⁺ de la membrana plasmática
PSS	Solución salina fisiológica libre de calcio
RE	Retículo endoplásmico
RGE	Reflujo gastroesofágico
ROI	Región de interés (por sus siglas en inglés, Regions of interest)
RyR	Receptor-canal sensible a rianodina
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo endoplasmático
SOC	Por sus siglas en inglés store-operated channels
SOCE	Store-operated calcium entry, por sus siglas en inglés
STIM	Por sus siglas en inglés, stromal interaction molecule

TGF- β	Factor de crecimiento transformante β 1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TPC	Canales de dos poros
TRPML1	Canal iónico de la mucolipina-1
TRPV	Canal de potencial transitorio vaniloideas
TX	Tromboxano
UTP	Trifosfato de uridina
α -SMA	α -actina del músculo liso

3. Índice de figuras

- Figura 1** Principales elementos implicados en la inducción y progresión de la fibrosis
- Figura 2** Mecanismos involucrados en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$
- Figura 3** Estructura química del ácido araquidónico
- Figura 4** Vías metabólicas del AA
- Figura 5** Diagrama de estrategia de trabajo
- Figura 6** Sistema de captura de la señal de Ca^{2+} intracelular
- Figura 7** Efecto concentración-dependiente de AA sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38
- Figura 8** Efecto de la doble aplicación de AA $30\mu M$ sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38
- Figura 9** Efecto del AA, ETYA análogo no hidrolizable del AA y del ácido palmitoleico sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38
- Figura 10** Liberación de Ca^{2+} intracelular y entrada de Ca^{2+} del medio extracelular activada por AA en fibroblastos de pulmón humano de la línea WI-38
- Figura 11** La liberación de Ca^{2+} endógena causada por AA, es mediada por el RE, lisosomas y canales TPC1
- Figura 12** Resumen de los mecanismos de regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ de acuerdo a los resultados del presente trabajo en fibroblastos de pulmón humano

4. Índice de tablas

Tabla 1 Diseño del estudio

Tabla 2 Variables y escalas de medición

5. Introducción

La fibrosis pulmonar (FP) suele ser el patrón de enfermedad terminal común en las más de 300 enfermedades pulmonares intersticiales de origen conocido y desconocido (Janssen et al., 2015). La FP idiopática es la enfermedad pulmonar fibrótica más común, con aproximadamente 50,000 nuevos casos cada año, la cual presenta un desarrollo progresivo e irreversible y cuya etología es desconocida (Association, 2020; Yu & Tang, 2022). La FP se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular producida por los fibroblastos, además, la migración y activación de fibroblastos, seguida de su diferenciación a miofibroblastos, es la patogénesis central de la fibrosis pulmonar, por lo que, se considera al fibroblasto una de las células diana distintivas (Effendi & Nagano, 2022).

La FP empeora con el tiempo y los tratamientos actuales están centrados en la ralentización de su progresión, sin revertir la fibrosis establecida (Waters et al., 2018). Hasta la fecha, ninguna de las estrategias terapéuticas tiene como objetivo los mecanismos homeostáticos de Ca^{2+} o los eventos de señalización mediados por Ca^{2+} aunque se sabe que la señalización de Ca^{2+} media diferentes funciones del fibroblasto, incluidos migración, proliferación y diferenciación en miofibroblasto (Janssen et al., 2015). Por otra parte, se ha descrito que el AA genera una señal de Ca^{2+} en diferentes tipos celulares y que el AA y su metabolismo está relacionado con diversas enfermedades inflamatorias de pulmón (Tallima & El Ridi, 2018), como el asma y la fibrosis pulmonar (Claar et al., 2015). A la fecha, se desconoce si el AA exógeno tiene efectos sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano, así como las vías implicadas en este proceso. En los siguientes apartados de este trabajo de investigación se abordan los temas relacionados al AA, los fibroblastos pulmonares y a la señalización de Ca^{2+} intracelular, se exponen y analizan los resultados obtenidos y al final se describe el efecto que genera el AA en la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38.

6. Antecedentes

6.1. Antecedentes generales

6.1.1. Fibrosis pulmonar

La fibrosis pulmonar (FP) es una enfermedad pulmonar intersticial. Se produce como consecuencia de la lesión pulmonar repetitiva crónica, que puede deberse a herencia, infección o a la exposición ambiental a sustancias nocivas (Huang & Tang, 2021; Wijsenbeek & Cottin, 2020; Yu & Tang, 2022). El cambio patológico de reparación tisular aberrante resulta en la síntesis excesiva de matriz extracelular (MEC) que reemplaza al parénquima pulmonar normal. De forma gradual, los alveolos son reemplazados por tejido fibrótico, causando una pérdida irreversible de la capacidad de intercambio de gases que disminuye progresivamente la oxigenación tisular general (Waters et al., 2018; Yu & Tang, 2022). La FP idiopática (FPI) es la enfermedad pulmonar fibrótica más común, con aproximadamente, **50,000 nuevos casos cada año**, la cual presenta un desarrollo progresivo e irreversible y cuya etiología es desconocida (Association, 2020; Yu & Tang, 2022).

A la fecha se desconocen los mecanismos moleculares precisos implicados en la fisiopatología de los diferentes tipos de fibrosis pulmonar. Los agentes responsables de la iniciación del proceso fibrótico siguen estando poco definidos, sin embargo, en general, se acepta que la lesión repetida es causada por una interacción entre la predisposición genética y los agentes ambientales dañinos. Estudios genéticos han determinado que variaciones genéticas están asociadas con una mayor susceptibilidad a la fibrosis pulmonar, por ejemplo, el polimorfismo frecuente en el promotor de MUC5B (involucrado en limpieza de las vías respiratorias y defensa bacteriana) se asocia con un mayor riesgo de FPI y las mutaciones o el acortamiento de los telómeros están claramente asociadas con la progresión de la enfermedad (Wijsenbeek & Cottin, 2020; Wuyts et al., 2013). Por otro lado, la repetida exposición a microlesiones por: infecciones, humo del cigarro, sustancias tóxicas inhaladas del medio ambiente y el reflujo gastroesofágico, provocan daño epitelial, daño endotelial y destrucción capilar, lo que a su vez provoca la activación de plaquetas, aumento de la

permeabilidad vascular y la activación de la coagulación. Las proteínas que participan en la cascada de la coagulación al activar receptores específicos presentes en las células epiteliales pulmonares, fibroblastos y macrófagos, conducen a la liberación y activación de potentes mediadores proinflamatorios y profibróticos conocidos como citoquinas y quimiocinas (Wijsenbeek & Cottin, 2020; Wuyts et al., 2013; Wynn, 2008). Las citoquinas y quimiocinas clave que inducen un medio profibrótico incluyen el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor derivado de plaquetas (PDGF), proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)1/CCL2, proteína inhibidora de macrófagos (MIP)1 α /CCL3, y el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), entre otros. El TGF- β es el mediador profibrótico más importante caracterizado a la fecha, promueve la: apoptosis de células epiteliales, transición del epitelio mesenquimal, migración de las células epiteliales, producción de otros mediadores profibróticos, inducción de la producción de MEC (al promover la transcripción y al suprimir la actividad de las metaloproteinasas), activación de monocitos, activación y proliferación de fibroblastos, el reclutamiento de fibrocitos circulantes y la transformación de fibroblastos en miofibroblastos, entre otros. En este proceso, conocido como transición de fibroblastos a miofibroblastos, los fibroblastos pierden sus marcadores específicos y adquieren un fenotipo miofibroblástico, además expresan productos de células mesenquimales como la α -actina del músculo liso (α -SMA) y el colágeno. Este proceso conlleva a la formación de una matriz extracelular excesiva que causa una distorsión de la arquitectura pulmonar (Wijsenbeek & Cottin, 2020; Wuyts et al., 2013; Wynn, 2008; Zhang et al., 2020). En la **Figura 1**, se muestran los principales elementos del alveolo pulmonar implicados en la inducción y progresión de la fibrosis pulmonar.

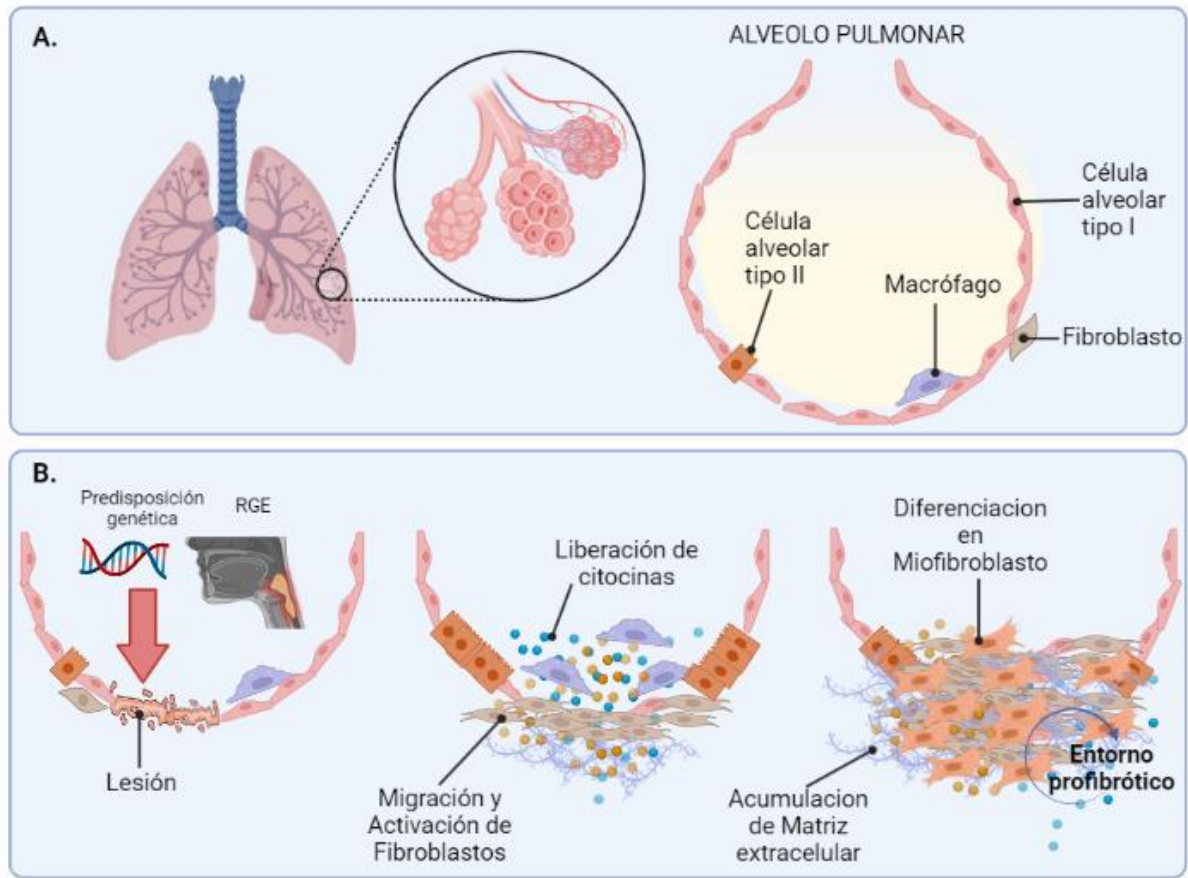


Figura 1. Principales elementos implicados en la inducción y progresión de la fibrosis. A) El alveolo pulmonar es la unidad fundamental para el intercambio de gases en el pulmón, el cual está constituido por: células alveolares tipo I, a través de las cuales se lleva a cabo el intercambio de gases; células alveolares tipo II, productoras del factor surfactante; macrófagos, encargados de la defensa contra microorganismos y partículas nocivas; y los fibroblastos, cuya función principal es la producción de la matriz extracelular. **B) Fisiopatología de la fibrosis pulmonar.** Diversos factores como son: la predisposición genética, los agentes ambientales dañinos y el reflujo gastroesofágico (RGE) causan daño crónico al epitelio alveolar. Subsecuentemente ocurre: un proceso de reepitelización anormal; el reclutamiento de macrófagos que liberan numerosas citocinas (incluido el TGF- β 1); y la migración y activación de los fibroblastos. Durante este proceso de reparación anormal, los fibroblastos producen cantidades excesivas de matriz extracelular y se diferencian en miofibroblastos. Todos estos cambios conllevan a la generación de un ambiente profibrótico y a una distorsión de la arquitectura pulmonar. Figura creada con BioRender.com.

6.1.2. Fibroblastos pulmonares

Los fibroblastos son células que están presentes en los tejidos conectivos del corazón, el tracto gastrointestinal, los músculos y los pulmones. Los fibroblastos pulmonares forman parte del parénquima de los pulmones y su principal función es la de sintetizar la matriz extracelular, manteniendo la integridad estructural del tejido, y en caso de daño, proliferar y diferenciarse en miofibroblastos para reparar las lesiones (Janssen et al., 2015; Lynch & Watt, 2018). En ciertas condiciones, la función de los fibroblastos está descontrolada, incluida su migración y activación, seguida de su diferenciación en miofibroblastos, que son la patogenia central de la FP; siendo estas células, una diana distintiva en el proceso de la FP (Effendi & Nagano, 2022; Janssen et al., 2015).

La mayoría de las funciones de los fibroblastos pulmonares, como son, la proliferación, síntesis/secreción de proteínas de la matriz extracelular, auto-activación y su transformación a miofibroblastos, están reguladas por la concentración del calcio (Ca^{2+}) libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Janssen et al., 2015; Lynch & Watt, 2018).

6.1.3. Regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

En fibroblastos pulmonares en reposo (no estimulados) la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal es de alrededor de 100 nM, mientras que la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular es de aproximadamente 2 mM. Por otro lado, la concentración de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico (RE), el principal almacén intracelular de Ca^{2+} , es de aproximadamente 1 a 2 mM y en los lisosomas de alrededor de 500 μM (Bagur & Hajnoczky, 2017; Islam, 2020; Tedeschi et al., 2019). Cuando las células son excitadas por estímulos químicos, físicos o eléctricos, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede aumentar de 100 nM (en reposo) a niveles cercanos a 1 μM (en células estimuladas). Este aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede llevarse a cabo por dos vías: 1) la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (p.e. RE y lisosomas) y 2) la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular.

6.1.3.1. Liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares

La liberación de Ca^{2+} del RE puede llevarse a cabo por dos vías: 1) a través del receptor-canal sensible a inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3R) o 2) a través del receptor-canal

sensible a rianodina (RyR) (Roach & Bradding, 2020) (ver **Figura 2**). La activación de los IP₃R parece ser la vía principal de liberación de Ca²⁺ en fibroblastos, para que se lleve a cabo este proceso se requiere de la unión de un agonista (histamina, acetilcolina, mediadores lipídicos de inflamación, entre otros) a un receptor acoplado a proteína G (GPCR), ubicado en la membrana plasmática. El agonista unido a los GPCR, promueven la activación de la fosfolipasa C (PLC), esta enzima hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), un fosfolípido de la membrana, generando, diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃); el IP₃ se une a su receptor (IP₃R) localizado en la membrana del RE, el IP₃R es un receptor canal, por lo tanto, la unión del IP₃ desencadena su apertura y con esto la liberación de Ca²⁺ desde el RE hacia el citoplasma (Berridge, 2016).

La otra vía de liberación de Ca²⁺ del RE es a través de los RyR, estos contienen múltiples dominios que forman sitios de unión para ligandos funcionales, incluidos iones, principalmente Mg²⁺ (magnesio) y Ca²⁺, por lo tanto, esta vía es sensible al aumento de la [Ca²⁺]_i, por ejemplo, el causado por la vía del IP₃R, antes descrita (Santulli et al., 2018). A este proceso se le conoce como liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (Clapham, 2007).

Recientemente se han propuesto a los lisosomas como importantes almacenes de Ca²⁺, en cuyo interior, la concentración de Ca²⁺ es de alrededor de 500 μM (Lloyd-Evans & Waller-Evans, 2020). Se han identificado diferentes canales de liberación de Ca²⁺ localizados en la membrana lisosomal, los principales entre ellos, y los mejor caracterizados, son el canal de dos poros (TPC) y el canal iónico de la mucolipina-1 (TRPML1). Los TPC se han revisado ampliamente, TPC1 se expresa principalmente en los compartimentos endosómicos, mientras que el TPC2 está predominantemente presente en las membranas lisosomales, liberando Ca²⁺ en respuesta al ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP), que es el segundo mensajero movilizador de Ca²⁺ endógeno más potente, producido tras una estimulación extracelular específica (como glucosa, colecistoquinina, histamina, insulina, entre otros) (Guse & Diercks, 2018; Lloyd-Evans & Waller-Evans, 2020; Tedeschi et al., 2019).

6.1.3.2. *Entrada de Ca^{2+} del medio extracelular*

La entrada de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el citoplasma, es mediada a través de diferentes canales de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática, estos se pueden dividir en: canales operados por voltaje y los canales operados por agonista, estos últimos incluyen a su vez, a los canales operados por receptores, a los canales operados por segundos mensajeros y a los canales operados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} . En células no excitables, como los fibroblastos, la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular se puede llevar a cabo a través de: 1) los SOC (por sus siglas en inglés store-operated channels), que dan origen a la SOCE (store-operated calcium entry, por sus siglas en inglés), mediada por el ensamblaje de las proteínas STIM (stromal interaction molecule, por sus siglas en inglés) y Orai; 2) canales de potencial transitorio vaniloideos (TRPV) y; 3) el canal de Ca^{2+} regulado por ácido araquidónico (ARC) que ha sido estudiado más recientemente (Bagur & Hajnoczky, 2017; Shuttleworth, 2009).

De los mecanismos antes mencionados los SOC representa la principal vía de entrada de Ca^{2+} en células no excitables. En el RE, STIM actúa como el sensor de la concentración de Ca^{2+} del RE, que después de una reducción en la concentración de Ca^{2+} en el lumen de este organelo, se multimerizan y se translocan hacia la periferia de la cisterna del RE para interactuar funcionalmente con el canal permeable a Ca^{2+} de la membrana plasmática Orai (Bendiks et al., 2020) (ver **Figura 2**). La entrada de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el citoplasma a través de los Orai por este mecanismo se le conoce como entrada de Ca^{2+} operada por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOCE) y media la entrada de Ca^{2+} inducida por los agonistas en fibroblastos humanos aislados de diversos tejidos incluyendo los pulmonares (Vazquez-de-Lara et al., 2018).

6.1.3.3. *Disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el citoplasma de la célula*

Después de la estimulación de la célula, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no debe permanecer elevada ya que podría desencadenar eventos como la apoptosis, por lo que la célula dispone de mecanismos que regresan $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles basales, estos incluyen la acción de mecanismos que median la salida de Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el medio

extracelular: el intercambiador de Na^+ (sodio) / Ca^{2+} (NCX) y la ATPasa de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) (Bagur & Hajnoczky, 2017). El NCX logra la extrusión de Ca^{2+} usando el gradiente electroquímico de Na^+ , durante cada ciclo, tres iones de Na^+ atraviesan la membrana aprovechando su gradiente de concentración, a cambio del contratransporte de un ion de Ca^{2+} contra su gradiente de concentración; el NCX tiene baja afinidad por Ca^{2+} , pero puede transportar los iones rápidamente (es decir, tiene alta capacidad de transporte), con hasta 5000 iones Ca^{2+} por segundo, por lo que es útil para mover grandes cantidades de Ca^{2+} en poco tiempo, además la dirección del intercambiador depende del potencial de membrana de la célula, por lo que puede cambiar su dirección de transporte, si la célula está lo suficientemente despolarizada (Conrard & Tyteca, 2019). Con una actividad complementaria a la del contratransportador NCX, PMCA asegura el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a valores muy bajos (alrededor de 100 nM), la PMCA tiene una afinidad mucho mayor a Ca^{2+} que la del NCX pero con una capacidad mucho menor, por lo que puede funcionar en un rango bajo de concentración de Ca^{2+} en el que el NCX es ineficaz; la bomba PMCA es una ATPasa tipo P y opera con una estequiometría $\text{Ca}^{2+}:\text{ATP}$ 1:1, existen cuatro isoformas de PMCA, siendo la PMCA1 y 4 las isoformas que se expresan en la mayoría de los tejidos (Conrard & Tyteca, 2019). Otro mecanismo del cual dispone célula para regresar el Ca^{2+} a niveles basales es la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (SERCA), esta es una ATPasa de tipo P que reside en la membrana del RE, esta bomba transporta dos iones Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el lumen del RE, a cambio de la hidrólisis de una molécula de ATP y permite restablecer los niveles lumbales de Ca^{2+} en el RE, existen 10 isoformas, SERCA1 se expresa principalmente en el músculo esquelético, SERCA2a en músculo cardíaco y esquelético, y SERCA2b y 3 en células no musculares (Bagur & Hajnoczky, 2017; Conrard & Tyteca, 2019).

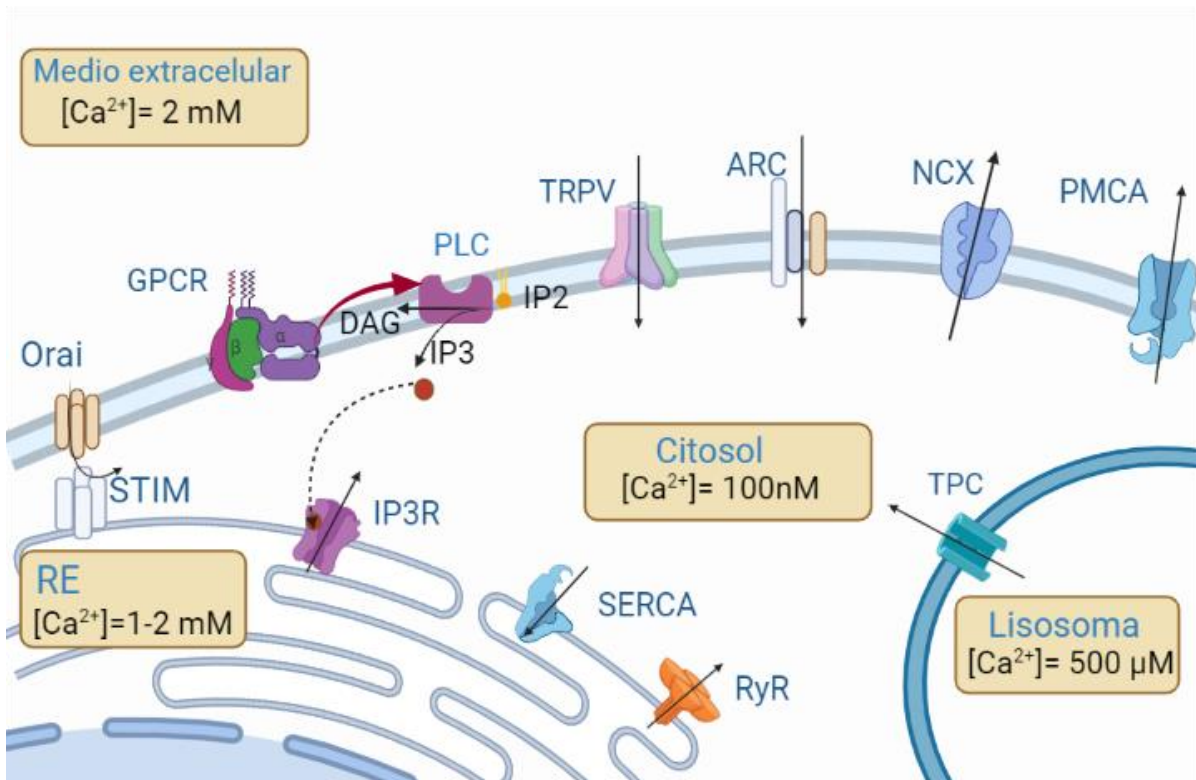


Figura 2. Mecanismos involucrados en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$. En una célula en reposo la $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol es de alrededor de 100 nM, en el medio extracelular 2 mM, en el retículo endoplásmico (RE) 1 a 2 mM y en los lisosomas de aproximadamente 500 μ M. Tras la activación de las células con agonistas que estimulan receptores acoplados proteínas G (GPCR), la fosfolipasa C (PLC) hidroliza el fosfolípido de membrana IP_2 en IP_3 . El IP_3 causa un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, a través de los receptores a IP_3 (IP_3R). Otros receptores que pueden contribuir a la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares son los receptores rianodínicos (RyR) y los canales de doble poro (TPC) localizados en la membrana de los lisosomas. El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por liberación de Ca^{2+} del RE puede ser acompañada de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, a través de los canales operados por almacenes intracelulares (SOC; STIM y Orai), canales de potencial transitorio vaniloideos (TRPV) y el canal de Ca^{2+} regulado por ácido araquidónico (ARC). El regreso de la $[Ca^{2+}]_i$ a los niveles basales, depende de la actividad de la ATPasa de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), del intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (NCX) y de la ATPasa de transporte de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (SERCA). Creado con BioRender.com.

Existen diferentes agonistas que pueden provocar la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, incluidos entre ellos: el adenosín trifosfato (ATP), el adenosín difosfato (ADP), la adenosina, el carbacol, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), el glutamato, la noradrenalina (NE), la serotonina (5-HT), el trifosfato de uridina (UTP). Recientemente

se ha reportado que diversos ácidos grasos libres, entre ellos, el ácido palmitoleico (AP) y el ácido araquidónico (AA), pueden actuar como agonistas que aumentan la $[Ca^{2+}]_i$ en diversos tipos de células (Itoh et al., 2003; Kotova et al., 2018; Maia et al., 2006; Tallima & El Ridi, 2018).

6.1.4. Ácido araquidónico

El ácido araquidónico (AA), también conocido como ácido all-cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico, es un ácido graso poliinsaturado omega-6 de 20 carbonos (**Figura 3**), que se encuentra típicamente esterificado a glicerol en fosfolípidos de membrana en la posición sn-2. El AA es un compuesto ubicuo de todas las células de los mamíferos y es uno de los ácidos grasos poliinsaturados más abundantes del tejido humano (Martin et al., 2016; Munaron, 2011).

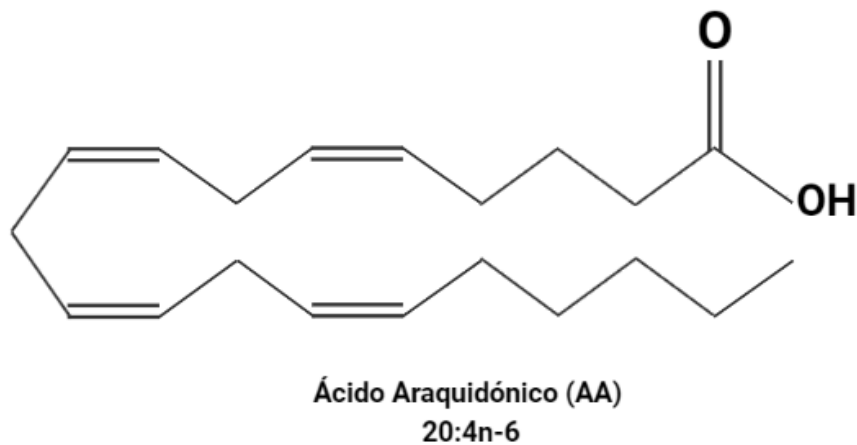


Figura 3. Estructura química del ácido araquidónico. Creado con BioRender.com

Múltiples estímulos conducen a la liberación del AA unido a la membrana, por medio de la activación de fosfolipasas celulares, principalmente la familia de la fosfolipasa A2 (PLA2). Una vez liberado, el AA es metabolizado en: a) prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) por la vía de las ciclooxigenasas (COX); b) leucotrienos (LT) por efecto de las lipoxigenasas (LOX) y; c) múltiples compuestos epoxieicosatrienoicos (EET) y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE) a través de la acción de las

monooxigenasas del citocromo P450 (CYP450) (**Figura 4**) (Kur et al., 2014; Tallima & El Ridi, 2018; Wang et al., 2021).

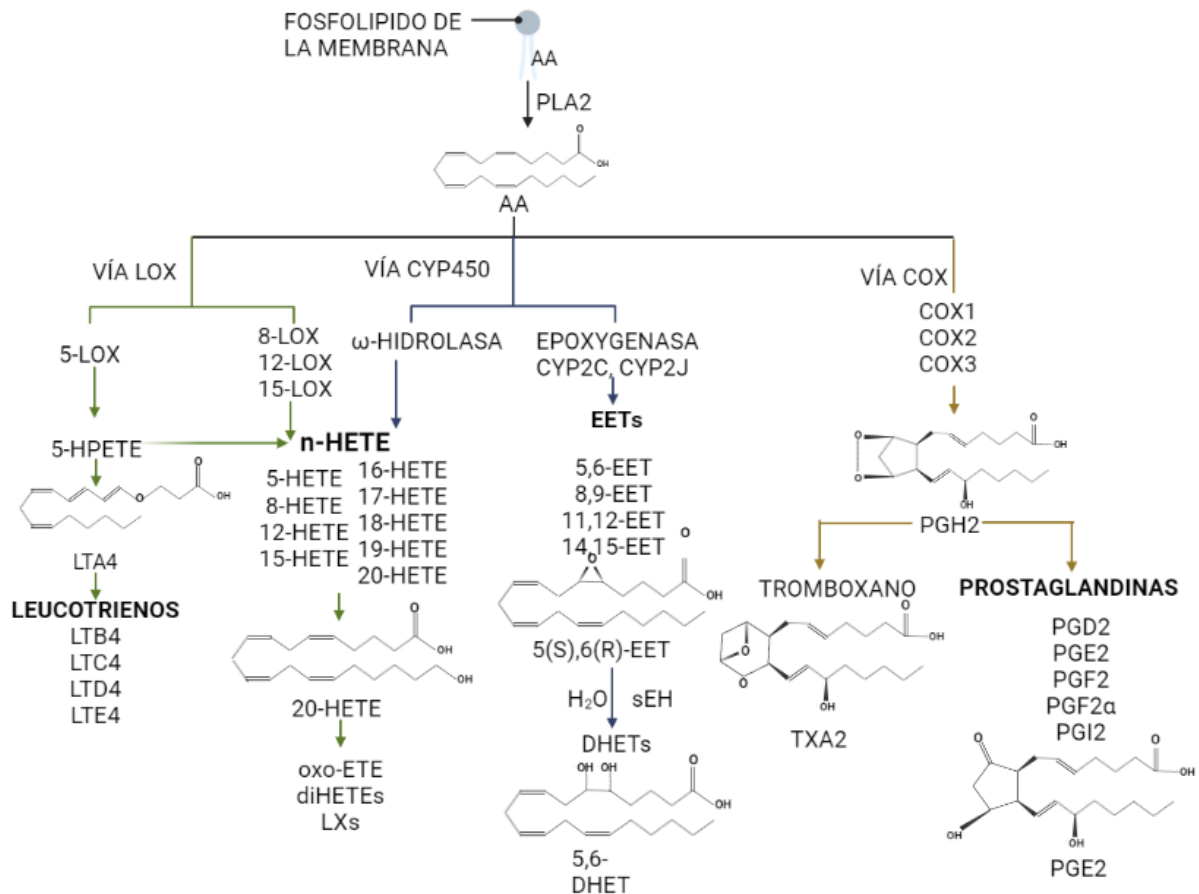


Figura 4. Vías metabólicas del AA. La enzima PLA2 hidroliza a los fosfolípidos de la membrana celular, produciendo AA libre. El AA libre es metabolizado por tres vías enzimáticas: 1) vía de las ciclooxygenasas (COX) que transforman al AA en prostaglandinas y tromboxanos; 2) vía de las lipooxygenasas (LOX) que metabolizan al AA en leucotrienos y ácidos hidroxicicosatetraenoicos (HETE); 3) vía del CYP450 que metabolizan al AA produciendo HETE de cadena media y compuestos epoxieicosatrienoicos (EET). Modificada de (Wang et al., 2021). Creada con BioRender.com.

Se ha observado que el AA y sus metabolitos modulan una gran variedad de procesos celulares, incluido el funcionamiento de los canales iónicos (Elinder & Liin, 2017), el crecimiento celular (Zuccolo et al., 2016), la proliferación, migración, apoptosis (Cantonero et al., 2020; Maia et al., 2006; Tallima & El Ridi, 2018), la

inflamación, la regulación del flujo sanguíneo (Kur et al., 2014) y el desarrollo neurológico (Salem & Van Dael, 2020), por mencionar algunos.

La modulación de estos procesos celulares es debida a que el AA, exógeno o endógeno, ya sea directamente o a través de sus diversos productos metabólicos, actúa sobre diferentes dianas moleculares, entre ellas encontramos a los canales de potasio (K^+) sensibles a ATP (K_{ATP}), canales de K^+ activados por Ca^{2+} , canales de sodio (Meves, 2008; Tallima & El Ridi, 2018), canales de K^+ mecanosensibles, uniones comunicantes (Brash, 2001), receptor de ácido gamma amino butírico (GABA-R), receptor a acetil colina neuronal (nAChR), diferentes canales de cloro (Cl^-) (Tallima & El Ridi, 2018), así como diferentes mecanismos involucrados en la regulación de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$.

6.2. Antecedentes específicos

Dado que muchas de las funciones de diversos tipos celulares están reguladas por la $[Ca^{2+}]_i$ y debido a que el AA puede modificar la $[Ca^{2+}]_i$, diferentes investigaciones se han enfocado en el estudio de los efectos del AA sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en diferentes tipos de células. Se ha demostrado que el AA puede aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ tanto por la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares como por la activación de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular.

Yeung-Yam-Wah y colaboradores en el 2012, reportaron que el AA causa la liberación de Ca^{2+} del RE en células β pancreáticas de ratas a través de los IP_3R (Yeung-Yam-Wah et al., 2012), así mismo, Berra Romani y colaboradores en el 2019, en células endoteliales microvasculares del cerebro humano, demostraron que la isoforma de IP_3R involucrada en este proceso es la tipo 3 (IP_3R3) (Berra-Romani et al., 2019), también Itoh y colaboradores, en células MIN6, demostraron que AA podría reclutar la vía de señalización $PLC\beta/IP_3$ mediante la activación $GPCR40$ (Itoh et al., 2003).

Además del RE, los lisosomas son importantes almacenes de Ca^{2+} , por lo que su investigación ha cobrado mayor relevancia para el entendimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$, Berra Romani y colaboradores

también reportaron que la aplicación exógena de AA provoca la salida de Ca^{2+} de los lisosomas a través de los TPC1-2 (Berra-Romani et al., 2019).

Por otro lado, el AA activa la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de la activación de canales TRPV4 en células endoteliales de arteria coronaria humana (HCAEC) (Zheng et al., 2013) en células formadoras de colonias endoteliales humanas (Zuccolo et al., 2016) y células endoteliales microvasculares del cerebro humano (Berra-Romani et al., 2019). Es importante señalar que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causado por el AA a través de esta vía, medía la dilatación de arteriolas coronarias humanas (Zheng et al., 2013) y estimula la proliferación de células formadoras de colonias endoteliales humanas (Zuccolo et al., 2016). El AA también activa la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de los canales activados por el AA (ARC) en cultivos primarios de células de músculo liso bronquial de humanos (Thompson et al., 2014). En adición, el AA modula la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de los SOC. Mientras que por un lado se ha demostrado que el AA bloquea la corriente SOC en células H4IIE de hígado de rata (Rychkov et al., 2005) por otro lado se reporta que el AA media la entrada de Ca^{2+} a través de canales Orai en una línea celular, modelo de tumor neuroendocrino gastroenteropancreático (Goswamee et al., 2018).

A pesar de las claras evidencias sobre el efecto que tiene el AA sobre diferentes mecanismos que regulan la homeostasis del Ca^{2+} en diferentes tipos celulares, su efecto sobre la señalización de Ca^{2+} en fibroblastos pulmonares no ha sido investigado. Es importante señalar que el AA y su metabolismo ha sido correlacionado con diversas enfermedades inflamatorias de pulmón (Tallima & El Ridi, 2018), como el asma y la fibrosis pulmonar (Claar et al., 2015), por ejemplo, TXA_2 es un mediador inflamatorio y bronco constrictor en el asma, así como, la $\text{PGF}_2\alpha$ es un mediador profibrótico en la fibrosis pulmonar (Mamazhakyrov et al., 2019).

Como único precedente del estudio del efecto del AA sobre la homeostasis del Ca^{2+} en fibroblastos, encontramos la investigación realizada por Munaron y colaboradores en 1997, realizada en fibroblastos embrionarios de ratón (BALB / 3T3 clon A31), donde mostraron que el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) incrementa los niveles de AA, el cual, a su vez provoca un aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En este

estudio a través de la inhibición de la producción de AA, mediante la inhibición de fosfolipasa A₂, se eliminó la respuesta de Ca²⁺ activada por AA, demostrando que la producción de AA es necesaria para el aumento de [Ca²⁺]_i; así mismo mediante la inhibición del metabolismo del AA, (aplicado indometacina, ácido nordihidroguaiaretico y econazol) y con la aplicación de ácido eicosatetraínoico (ETYA), un análogo de AA no metabolizable, demostraron que esta respuesta es debida únicamente al AA y no a sus metabolitos, eicosanoides (Munaron et al., 1997).

7. Justificación

La fibrosis pulmonar naturalmente empeora con el tiempo, los tratamientos actuales están centrados en la ralentización de su progresión, y ninguno revierte la fibrosis establecida (Waters et al., 2018), por lo que el trasplante de pulmón sigue siendo el único tratamiento definitivo. La carencia de tratamientos definitivos es debida a que se desconocen con precisión los mecanismos moleculares implicados en esta patología.

Es bien sabido que los fibroblastos son piezas claves en el proceso de fibrosis pulmonar, así mismo, se ha descrito que el trastorno del metabolismo de los lípidos puede desempeñar un papel clave en la fibrosis pulmonar persistente (Yu & Tang, 2022), en particular el metabolismo del AA, ya que algunos eicosanoides previenen y/o reparan la lesión pulmonar (PGD₂, PGE₂ y PGI₂) mientras que otros inducen y/o promueven la cicatrización pulmonar (TXA₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄) (Mamazhakupov et al., 2019).

Por otro lado, se ha descrito al Ca²⁺ intracelular como un regulador principal de las funciones de los fibroblastos y al AA como una molécula que puede aumentar la concentración de Ca²⁺ en diferentes células; la [Ca²⁺]_i en los fibroblastos puede mediar diferentes procesos implicados en la fibrosis, por ejemplo, la proliferación, la síntesis/secreción de proteínas de MEC, así como la autoactivación y la transformación a miofibroblasto (Janssen et al., 2015). De acuerdo con Munaron y colaboradores, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) incrementa los niveles de AA, provocando un aumento en [Ca²⁺]_i en fibroblastos embrionarios de ratón (Munaron et al., 1997), sin embargo, a la fecha, se desconocen las vías implicadas en el proceso

anterior, así como, si el AA tiene efectos sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en **fibroblastos de pulmón humano** lo que nos lleva a la investigación de las bases de este proceso, por lo que en este proyecto se estudió el efecto de la aplicación de AA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano WI-38 y se descifraron los mecanismos moleculares implicados en esta vía de señalización, los cuales pueden ser potenciales blancos para la farmacoterapia de la fibrosis pulmonar.

8. Planteamiento del problema

Las enfermedades respiratorias imponen una inmensa carga sanitaria a nivel mundial. La fibrosis suele ser el patrón de enfermedad terminal común en las más de 300 enfermedades pulmonares intersticiales de origen conocido y desconocido, por lo que, el fibroblasto se considera una de las células diana distintivas. Comprender el mecanismo de señalización de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano es crucial para el desarrollo a futuro de nuevas terapias para estas patologías. A pesar de que se sabe que, durante el proceso inflamatorio que causan estas enfermedades, los fibroblastos pulmonares quedan expuestos a altas concentraciones de AA, y que el AA puede causar un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en diversos tipos celulares, entre ellas fibroblastos embrionarios de ratón, aún no existen estudios que describan los mecanismos moleculares activados en la señalización del Ca^{2+} inducida por AA en fibroblastos pulmonares humanos. Por lo que nos generamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los efectos que causa el AA en la señalización de Ca^{2+} intracelular en fibroblastos de pulmón humano?

9. Hipótesis

El ácido araquidónico causa un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humanos (WI-38).

10.Objetivos

10.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del AA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

10.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto concentración-dependiente del AA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano.
- 2) Evaluar el efecto de la aplicación repetida de AA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano.
- 3) Evaluar el efecto del análogo no hidrolizable del AA (ETYA) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano.
- 4) Evaluar el efecto del ácido palmitoleico sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano.
- 5) Comparar el efecto del AA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano en ausencia y en presencia de Ca^{2+} extracelular.
- 6) Evaluar el efecto del AA sobre la liberación del Ca^{2+} de RE en fibroblastos de pulmón humano.
- 7) Evaluar el efecto del AA sobre la liberación del Ca^{2+} de los lisosomas en fibroblastos de pulmón humano.
- 8) Evaluar la participación de los canales TPC lisosomales en la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por el AA en fibroblastos de pulmón humano.

11.Material y métodos

11.1. Diseño del estudio

Tabla 1. **Diseño del estudio**

Por su Objetivo	Por su intervención	Por su temporalidad	Por la recolección de datos	Por la conformación de grupos
Descriptivo	Experimental	Transversal	Prolectivo	Homodémico

11.2. Ubicación espacio-temporal

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fisiología Cardiovascular ubicado en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, durante el periodo de enero del 2022 a agosto del 2022.

11.3. Estrategia de trabajo

En la **Figura 5**, se esquematiza la estrategia de trabajo que se llevó a cabo para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto.

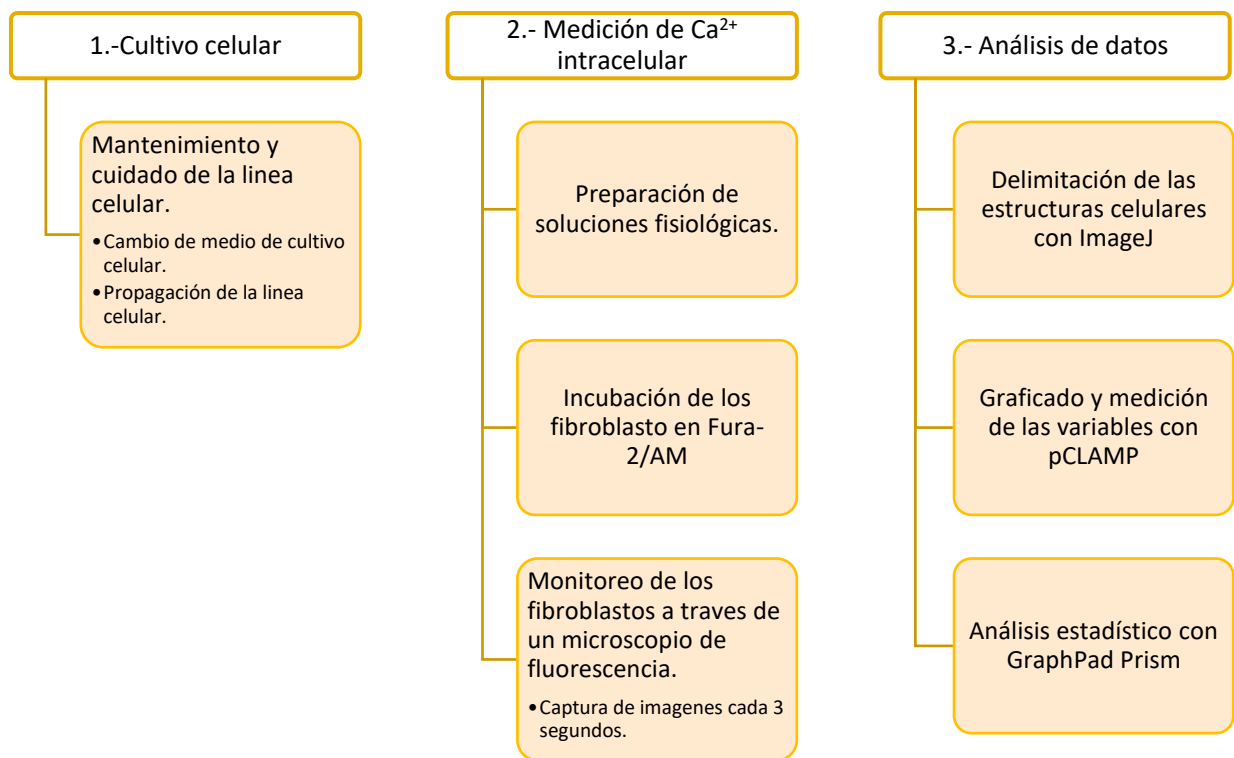


Figura 5. Diagrama de estrategia de trabajo. La estrategia de trabajo está dividida en 3 bloques: Cultivo celular, medición de Ca²⁺ intracelular y el análisis de los datos. Cada estrategia será explicada en las secciones correspondientes.

11.4. Muestreo

11.4.1. Definición de la unidad población

Se emplearon fibroblastos de pulmón fetal humano de la línea celular WI-38 adquirida de la empresa ATCC®, Virginia, Estados Unidos.

11.4.2. Criterios de selección de las unidades de muestreo

11.4.2.1. Criterios de inclusión

Se consideraron células viables del cultivo de fibroblastos de pasajes 5-10.

Se seleccionaron todas las células observables en el campo visible del microscopio de fluorescencia.

11.4.2.2. Criterios de exclusión

Fueron excluidos los cultivos de fibroblastos que no alcanzaron el 75% de su confluencia en el tiempo establecido

11.4.2.3. Criterios de eliminación

Se eliminaron a las células que presentaron cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones basales (antes de cualquier intervención farmacológica).

11.4.3. Diseño y tipo de muestreo

Muestreo aleatorio estratificado.

11.4.3.1. Tamaño de la muestra

Los experimentos se realizaron en células provenientes de al menos 3 pasajes.

11.4.3.2. Definición de las variables y escalas de medición

Variable dependiente: Concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, nivel de la $[Ca^{2+}]_i$, basal, y la diferencia entre el valor de la $[Ca^{2+}]_i$ en una célula después de ser estimulada y el valor de la $[Ca^{2+}]_i$ en la misma célula previo a la estimulación (amplitud del pico).

Variable independiente: ácido araquidónico.

Tabla 2. Variables y escalas de medición.

Medición de la señal de Ca ²⁺ intracelular						
Variables de estudio	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Instrumento de medición	Unidades de escala	
Concentración de Ca²⁺ intracelular [Ca²⁺]_i	El Ca ²⁺ es un catión con capacidad multifuncional como segundo mensajero	Intensidad de fluorescencia por área	Cuantitativa continua	Microscopio de fluorescencia y software especializado	Ratio: Relación de la emisión de fluorescencia (340/380 nm)	
[Ca²⁺]_i basal	[Ca ²⁺] _i en células en reposo (no estimuladas)	Niveles de fluorescencia iniciales, previos a cualquier maniobra farmacológica.	Continua	Microscopio de fluorescencia y software especializado	Relación de la emisión de fluorescencia (340/380 nm)	
Amplitud de la señal de Ca²⁺	Diferencia entre el valor de la [Ca ²⁺] _i en una célula después de ser estimulada y el valor de la [Ca ²⁺] _i en la misma célula previo a la estimulación.	Diferencia (resta) del pico máximo (máximo valor de fluorescencia) en presencia de un agonista y el valor de la fluorescencia basal.	Continua	Microscopio de fluorescencia y software especializado	Relación de la emisión de fluorescencia (340/380 nm)	

11.4.4. Método de recolección de datos

De forma experimental, los datos fueron obtenidos utilizando un software personalizado en lenguaje Linux, que permitió el control de los filtros en microscopio de fluorescencia y el almacenamiento de las imágenes tomadas por cámara en el microscopio en tiempo real cada 3 segundos. Esto permitió visualizar el registro de la señal de Ca^{2+} de los fibroblastos durante cada experimento. Posteriormente, se realizó el análisis de las imágenes con ayuda del programa ImageJ.

11.5. Técnicas y procedimientos

11.5.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular “WI-38” de fibroblastos de pulmón fetal humano adquirida de la empresa ATCC®, Virginia, Estados Unidos. Los fibroblastos se conservaron en cajas de cultivo T25 (25cm²) y se mantuvieron en medio de cultivo EMEM (Eagle’s Minimun Essential Medium) adquirido de la empresa ATCC®, Virginia, Estados Unidos, adicionado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomina y anfotericina B), ambos adquiridos de la empresa Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos. Los cultivos fueron conservados en una incubadora en condiciones de humedad controlada con 5% de CO₂ (dióxido de carbono), a una temperatura de 37°C.

Para el mantenimiento de la línea celular y obtención de las células para la experimentación, cuando los fibroblastos habían cubierto el 95-100% de la superficie del matraz T-25, éstos fueron despegados enzimáticamente de dicho matraz de la siguiente manera: se eliminó el medio de cultivo completo que contiene el matraz, se lavaron las células un par de veces con 2 ml de PBS estéril para eliminar los residuos de medio de cultivo y se agregaron 2 ml de PBS adicionado con Tripsina-EDTA 0.25% durante 7 minutos a temperatura ambiente (21-23°C). Posteriormente se agregaron 2 ml de medio de cultivo completo y las células se resuspendieron en esta solución para re-sembrarlas de la siguiente manera:

- 1.- En una nueva caja T25 (para obtener una nueva generación o pasaje celular).

2.- En cubreobjetos cuadrados de una dimensión de 11x11mm contenidos en cajas Petri de 22mm de diámetro para su utilización experimental al 7° día de cultivo.

En ambos casos, se les adicionó medio de cultivo completo y se mantuvieron en la incubadora y en las condiciones antes mencionadas. Cada 2 días el medio de cultivo fue removido, las células se lavaron dos veces con PBS y se les adicionó nuevo medio de cultivo completo.

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados bajo la norma oficial mexicana descrita en “Leyes y Códigos de México, de la Ley General de Salud en Materia de Investigación”, norma oficial mexicana NOM-065-SSA1-1993, donde están establecidas las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo, así como bajo las directrices internacionales para el uso de líneas celulares en la investigación biomédica (Geraghty et al., 2014).

11.5.2. Medición de $[Ca^{2+}]_i$

Al cumplirse el 7° día de cultivo de los fibroblastos sembrados en los cubreobjetos se procedió a remover el medio de cultivo y las células se incubaron en solución salina fisiológica (PSS) conteniendo $3\mu\text{M}$ del fluorocromo Fura-2/AM durante 45 minutos a temperatura ambiente (21°C - 23°C) en condiciones de oscuridad. Posteriormente los fibroblastos fueron lavados con PSS para remover los remanentes de Fura-2/AM y fueron mantenidos en esta última solución durante 30 minutos antes de realizar los ensayos de fluorescencia. La composición del PSS fue la siguiente en unidades mM: 150 NaCl, 6 KCl, 1 MgCl_2 , 10 D-glucosa, 10 HEPES, 1.5 CaCl_2 . El pH del PSS fue ajustado a un valor de 7.4 utilizando NaOH. Para la medición de la $[Ca^{2+}]_i$ los fibroblastos fueron visualizados en un microscopio de epifluorescencia, Axiolab Carl Zeiss, Germany (ver **Figura 6**), acoplado a una lámpara de mercurio (OSRAM HBO 50) como fuente de luz. La luz de excitación paso alternadamente a través de 2 filtros, uno de 340 nm y otro de 380 nm; utilizando una rueda gira filtros (Lambda 10, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) comandada por una computadora. Posteriormente la luz se dirigió al espejo dicroico, reflejando la luz a través del objetivo hacia las células. La luz emitida por las células pasó a través del objetivo hacia el espejo dicroico que desvió la luz hasta el filtro de emisión (510 nm). Las imágenes de

fluorescencia obtenidas cuando las células fueron excitadas a 340 nm y las imágenes de fluorescencia cuando las células fueron excitadas a 380 nm se capturaron por una cámara de alta sensibilidad (Extended-ISIS, Photonic Science, Millham, UK) y utilizando una tarjeta de adquisición (CYBEROPTICS PXC200AL, Aegis Electronic Group, USA) las imágenes se almacenaron en una computadora.

Posteriormente se analizaron las variaciones de la intensidad de fluorescencia emitida por cada una de las células a partir de las regiones de interés (ROI: regions of interest), estas son regiones elípticas delimitadas manualmente con la ayuda de un software de computadora. Cada ROI seleccionado delimitó el área celular, mediante la utilización del software ImageJ. Los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$, para cada ROI, se evaluaron en función de los cambios de la relación de fluorescencia 340/380 (Ratio 340/380); esto quiere decir que un aumento en el valor del Ratio 340/380 corresponde a un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. El Ratio 340/380 fue medido cada 3 segundos a temperatura ambiente.

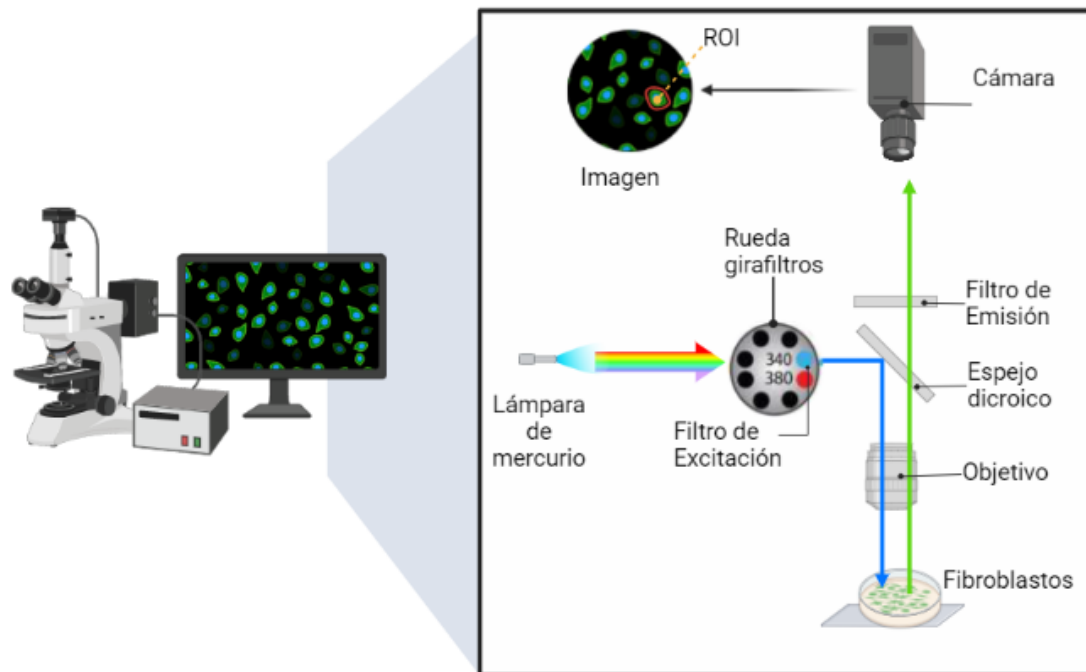


Figura 6. Equipo de microfluorimetría para la medición de la $[Ca^{2+}]_i$. Las células son excitadas alternativamente a 340 y 380 nm utilizando una lámpara de mercurio como fuente de luz y una rueda girafiltros comandada por una computadora. La luz emitida es captada por una cámara de alta sensibilidad y digitalizada con un convertor analógico-digital. Utilizando un software comercial,

la $[Ca^{2+}]_i$ fue registrada en cada fibroblasto localizado dentro del campo visivo del microscopio, dibujando sobre cada célula una región de interés (ROI). Creada con BioRender.com.

11.5.3. Protocolos experimentales por objetivo

Objetivo 1. Se aplicaron dosis crecientes de AA a los fibroblastos de pulmón humano, seguidas cada una de las aplicaciones por un periodo de lavado con PSS. Se cuantificó la amplitud de la señal de Ca^{2+} y se graficó en función del logaritmo natural de la concentración de AA aplicada.

Objetivo 2. De la gráfica obtenida de los experimentos realizados en el objetivo 1, se determinó la concentración máxima de AA que causa el mayor incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en los fibroblastos de pulmón humano. Dicha concentración máxima de AA fue aplicada a los fibroblastos y posterior a un periodo de lavado con PSS, se aplicó nuevamente la misma concentración de AA. Se comparó la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada por ambas aplicaciones de AA.

Objetivo 3. Con la finalidad de conocer si el efecto sobre la $[Ca^{2+}]_i$ causado por la aplicación de AA es ocasionado directamente por esta molécula o productos de su metabolismo, se utilizó el análogo no hidrolizable del AA, ácido eicosatetraenoico (ETYA). Se compararon las amplitudes de la señal de Ca^{2+} evocada por las mismas concentraciones de AA y ETYA.

Objetivo 4. Se examinó si otro ácido graso, el ácido palmitoleico, puede incrementar la $[Ca^{2+}]_i$, o si dicho efecto es exclusivamente evocado por el AA, comparando las amplitudes de la señal de Ca^{2+} evocada por las mismas concentraciones de AA y ácido palmitoleico.

Objetivo 5. Para comprobar si el AA activa una entrada de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el interior de los fibroblastos, los fibroblastos se incubaron en una solución fisiológica libre de Ca^{+2} (Ca_0) y en esas condiciones se aplicó la dosis máxima de AA. La amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada por AA en solución extracelular con Ca^{2+} fue comparada con la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada por el AA en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

Objetivo 6. Para examinar si el AA causa la liberación de Ca^{2+} del RE, se incubaron a los fibroblastos en una solución fisiológica libre de Ca^{2+} conteniendo 10 μM de ácido ciclopiazónico (CPA), un inhibidor selectivo de SERCA, el cual causa el vaciamiento de Ca^{2+} del RE. Posterior al vaciamiento del RE, en la continua presencia de CPA se aplicó AA y se comparó la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada con AA en ausencia de Ca^{2+} extracelular con la incubación con CPA y el registro control, sin la incubación con CPA.

Objetivo 7. Para examinar si el AA causa la liberación de Ca^{2+} de los lisosomas, se incubaron a los fibroblastos en una solución fisiológica libre de Ca^{2+} conteniendo Glycyl-L-fenilalanina 2-naftilamida (GNP), el cual causa la lisis de los lisosomas provocando la liberación de Ca^{2+} de estos almacenes. Posterior a la lisis lisosomal se aplicó AA y se comparó la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada con AA de los fibroblastos en ausencia de Ca^{2+} extracelular con la incubación de GNP y el registro control, sin la incubación GNP.

Objetivo 8. Para evaluar la participación de los canales de dos poros (TPC) de los lisosomas, en la señal de Ca^{2+} evocada por AA, se utilizó el antagonista de los TPC, Trans-Ned19. Los fibroblastos se incubaron en una solución fisiológica libre de Ca^{2+} extracelular con Trans-Ned19, posteriormente se adicionó AA. Se comparó la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada con AA de los fibroblastos en ausencia de Ca^{2+} extracelular con la incubación de Trans-Ned19 y el registro control, sin la aplicación de Trans-Ned19.

11.6. Análisis de datos

Para la obtención de los valores de fluorescencia, se empleó el programa Image J (National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), para la elaboración de gráficas y el análisis de resultados se utilizaron los programas Pclamp y GraphPad Prism 5.0 respectivamente.

Los datos obtenidos de la relación concentración-respuesta fueron ajustados a la siguiente ecuación:

Ecuación 1

$$Y = \frac{\text{Basal} + (\text{Respuesta máxima} - \text{Basal})}{(1 + 10^{\text{Log}EC_{50}-X})}$$

Y; representa la respuesta, es decir, la amplitud del pico de la señal de Ca²⁺ evocada por AA, Basal; corresponde al valor mínimo de la amplitud del pico de Ca²⁺, Respuesta máxima; corresponde al máximo valor de la amplitud del pico de Ca²⁺, el Log; representa el logaritmo de base 10, la EC₅₀; representa la concentración efectiva 50, o bien, la concentración de AA a la cual se obtiene el 50% de la respuesta y X; corresponde a la concentración de AA utilizada.

11.7. Diseño estadístico

11.7.1. Hipótesis estadística

Hipótesis nula (H₀): El ácido araquidónico causa un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular en fibroblastos de pulmón humanos (WI-38).

Hipótesis alternativa (H_A): El ácido araquidónico no causa un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular en fibroblastos de pulmón humanos (WI-38).

11.7.2. Prueba estadística

Se realizó el Test de Shapiro–Wilk para examinar la normalidad a cada protocolo experimental y se procedió a aplicar una prueba Kruskal Wallis como prueba no paramétrica.

11.8. Logística

11.8.1. Recursos humanos

El proyecto de investigación fue dirigido por el D.C. Roberto Berra Romani, investigador titular del laboratorio de Fisiología Cardiovascular, y codirigido por el D. C. Mario García Carrasco, investigador de la Facultad de Medicina.

El proyecto de investigación fue realizado por Mayte López Teyssier estudiante de la licenciatura en Biomedicina.

11.8.2. Recursos materiales

Para el desarrollo del proyecto de investigación se utilizó el equipo del cuarto de cultivo del laboratorio de Fisiología Cardiovascular que incluye: campana de flujo laminar, incubadora de CO₂, centrifuga, autoclave y materiales adicionales para los procedimientos de cuidado de un cultivo celular.

Para la medición de la [Ca²⁺]_i en los fibroblastos WI-38 se contó con un sistema de microfluorimetría que incluye un microscopio de fluorescencia, un sistema automático de intercambio de filtros de excitación, una cámara de fluorescencia de alta sensibilidad y una computadora con software integrado para la adquisición y análisis de datos.

En el laboratorio de Fisiología Cardiovascular se contó con los reactivos necesarios para cada protocolo experimental del proyecto antes descritos.

11.8.3. Recursos financieros

Este proyecto se realizó con recursos propios del laboratorio de Fisiología Cardiovascular Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma.

12. Resultados

12.1. El AA genera una señal de Ca²⁺ concentración-dependiente en fibroblastos WI-38.

En la **Figura 7A**, se muestran sobrepuestos, los registros típicos de la señal de Ca²⁺ evocada por la aplicación de 300 nM (línea azul), 3 μM (línea roja) y 30 μM (línea verde) de AA a fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubados con Fura-2 AM. La aplicación de AA 300 nM (línea azul), no modifica significativamente la [Ca²⁺]_i. Por otra parte, la aplicación de AA a una concentración de 3 μM (línea roja), causa un aumento rápido de la [Ca²⁺]_i, a este aumento rápido lo denominaremos como “pico”, este pico es seguido por una fase de decaída sostenida de la [Ca²⁺]_i, acompañada por aumentos transitorios del Ca²⁺, a los cuales denominaremos como “oscilaciones”. Cabe señalar que la [Ca²⁺]_i en la continua presencia de AA 3 μM (línea roja), se mantiene por encima de los niveles de Ca²⁺ basales (niveles de Ca²⁺ previos

a la aplicación del AA). Cuando se aplica AA a una concentración de 30 μM (línea verde), la amplitud del pico y de la fase sostenida de la señal de Ca^{2+} son mayores a las evocadas por AA 3 μM (línea roja). Estos resultados muestran una relación entre la concentración de AA aplicada y el tamaño de la señal de Ca^{2+} evocada por el agonista, a esta relación se le conoce como relación “concentración-respuesta”. Con la finalidad de caracterizar y cuantificar la relación concentración-respuesta del AA en fibroblastos de pulmón humano Wi-38, se procedió a aplicar concentraciones crecientes de AA (100 nM - 300 μM), de forma no acumulativa, a distintos cubreobjetos con fibroblastos y la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} obtenida con cada concentración de AA aplicada fue cuantificada y graficada como la media \pm el error estándar (ES) (círculos negros) en función del logaritmo (*Log*) de la concentración de AA ([AA]) (**Figura 7B**). La aplicación de 100 nM, 300 nM y 1 μM de AA, no causan efecto significativo sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en fibroblastos WI-38, con una media inferior a 0.1 unidades arbitrarias (A.U.). Al aplicar AA 3 μM causa un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 0.15 ± 0.02 A.U. El aumento máximo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se obtuvo al aplicar concentraciones de AA de 30 y 100 μM con una media \pm ES de 0.33 ± 0.02 y 0.35 ± 0.03 A.U., respectivamente. Al aplicar una concentración de AA de 300 μM , la amplitud de la respuesta se redujo a 0.24 ± 0.03 A.U. Los valores de la media \pm ES de la amplitud de la señal de Ca^{2+} (**Figura 7B**, círculos negros) fueron ajustados a la **Ecuación 1** descrita en la sección de Material y métodos. La curva concentración-respuesta obtenida (línea negra) presenta una forma sigmoidea, con un valor de $EC_{50} = 2.44$ μM . Con base en esta curva concentración-respuesta y a la concentración de AA utilizada en diversos trabajos publicados (Berra-Romani et al., 2019; Yeung-Yam-Wah et al., 2012; Zuccolo et al., 2016) se decidió llevar a cabo los subsecuentes objetivos planteados en la tesis utilizando la concentración de AA 30 μM , una de las concentraciones de AA con la que se alcanza el efecto máximo sobre la señal de Ca^{2+} intracelular en fibroblastos WI-38.

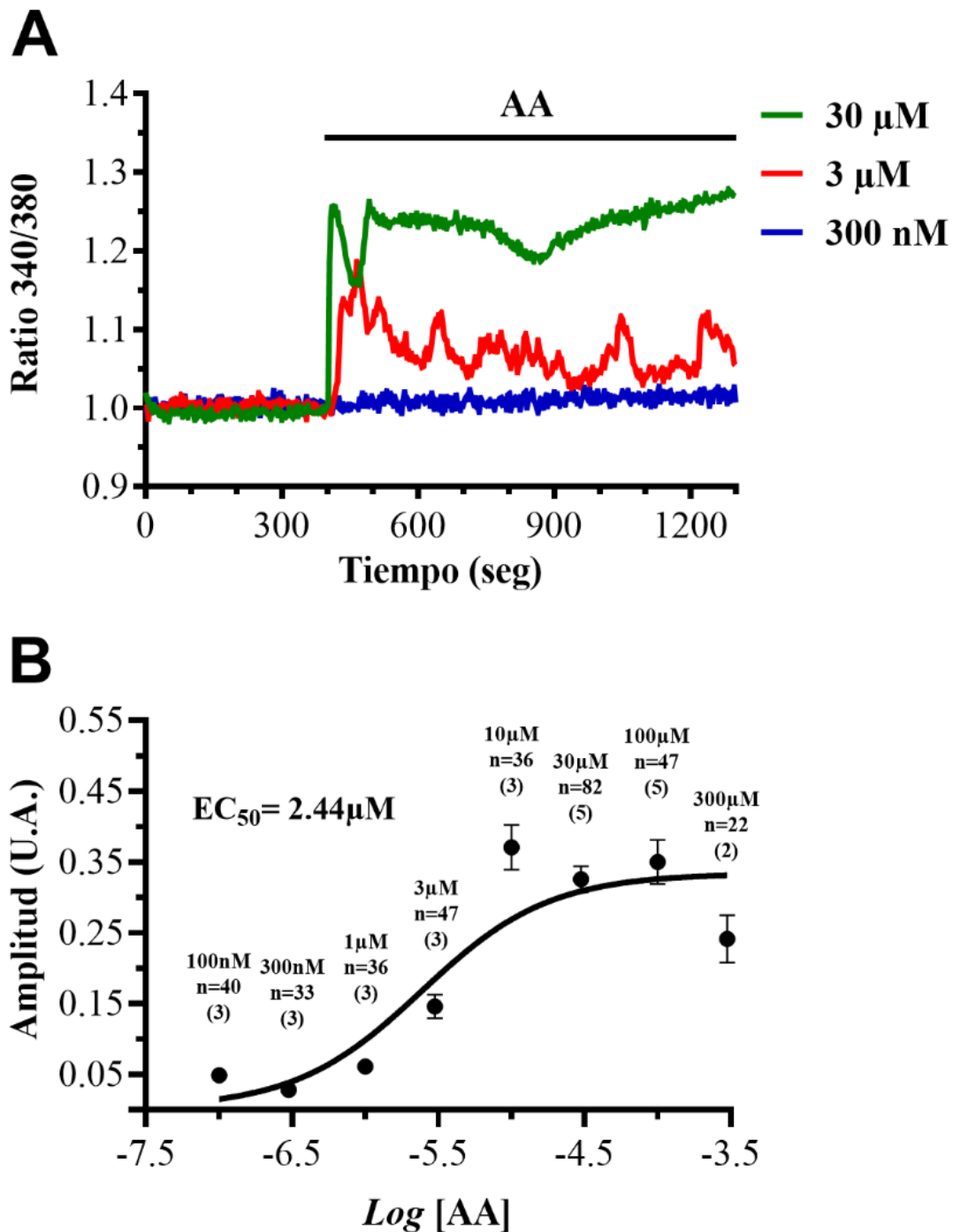


Figura 7. Efecto concentración-dependiente de AA sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38. (A) Registros típicos de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de 300 nM (línea azul), 3 μ M (línea roja) y 30 μ M (línea verde) de AA a fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubados con Fura-2 AM. Con fines comparativos, los valores de fluorescencia de cada

registro típico (F) fueron divididos entre la media del valor de fluorescencia en condiciones basales (antes de la aplicación de AA) (F0), de tal manera que la relación (F/F0) hace que se superpongan los valores de Ca^{2+} basal de los tres registros en el valor del Ratio 340/380 de 1. En esta figura y en todas las otras, la línea negra sobre los registros típicos indica el tiempo de aplicación del AA. **(B)** Curva concentración-respuesta no acumulativa de la media \pm ES de la amplitud del pico de Ca^{2+} en función del logaritmo de base 10 de los valores de las distintas concentraciones de AA aplicadas a los fibroblastos de pulmón humano (círculos negros). La línea negra se obtuvo ajustando los valores (círculos negros) a la **Ecuación 1** descrita en la sección de Material y métodos. El valor de $EC_{50}= 2.44 \mu\text{M}$, el coeficiente de determinación $R^2= 0.8363$. La n, representa el número de células estudiadas y los números entre paréntesis, indica el número de cultivos celulares de donde se obtuvo la n.

12.2. La estimulación repetida de los fibroblastos de pulmón humano con AA causa desensibilización de la señal de Ca^{2+} .

En la **Figura 8A**, se muestra un registro típico de la señal de Ca^{2+} evocada por la doble aplicación de AA $30 \mu\text{M}$ a fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubados con Fura-2 AM. La primera aplicación de $30 \mu\text{M}$ de AA causa un aumento rápido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, caracterizado por un pico y una fase sostenida. Al remover el AA la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ descendió sin regresar a los niveles basales de Ca^{2+} . La segunda estimulación de los fibroblastos con la misma concentración de AA ($30 \mu\text{M}$), provocó un segundo aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, con una morfología similar a la obtenida con la primera aplicación (pico + fase sostenida), sin embargo, la amplitud del pico de la segunda aplicación fue notoriamente menor a la causada por la primera aplicación de AA. En la **Figura 8B**, se muestran los valores de la media \pm ES de la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} evocada por la primera (barra azul) y segunda (barra roja) aplicación de AA $30 \mu\text{M}$. La amplitud fue de 0.24 ± 0.01 y 0.16 ± 0.01 A.U. para la primera y segunda aplicación de AA respectivamente ($p \leq 0.05$).

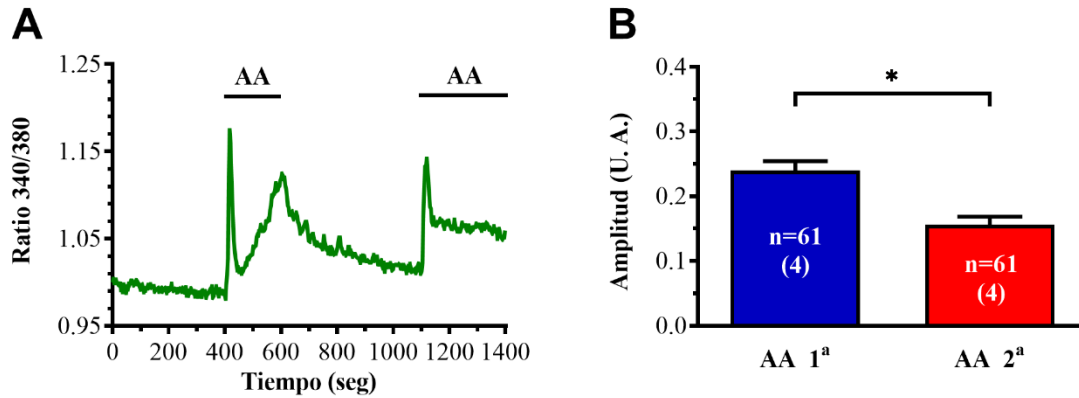


Figura 8. Efecto de la doble aplicación de AA 30 μ M sobre la señal de Ca²⁺ en fibroblastos de pulmón humano WI-38. (A) Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por la doble aplicación de 30 μ M de AA a un fibroblasto de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubado con Fura-2 AM. **(B)** Media \pm ES de la amplitud del pico de Ca²⁺ evocado por la primera (barra azul) y segunda (barra roja) aplicación de AA. La n, representa el número de células estudiadas y los números entre paréntesis, el número de cultivos celulares diferentes de donde se obtuvo la n. Prueba estadística de Mann Whitney (* p<0.05).

12.3. Efecto directo del AA sobre la [Ca²⁺]_i y no por los productos de su metabolismo y el efecto del ácido palmítico (AP) sobre la [Ca²⁺]_i en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

En la **Figura 9A**, se muestran sobrepuestos, los registros típicos de la señal de Ca²⁺ evocada por la aplicación de 30 μ M de AA (línea azul), 30 μ M de ETYA, un análogo del AA no metabolizable (línea roja) y 30 μ M de ácido palmítico (AP; línea verde) en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubados con Fura-2 AM. La aplicación de AA (línea azul), causa un aumento rápido de la [Ca²⁺]_i que consiste en un pico seguido por un aumento sostenido de la [Ca²⁺]_i. Se obtuvieron resultados similares cuando las células fueron estimuladas con ETYA (línea azul). El ETYA (30 μ M) induce un incremento de la [Ca²⁺]_i cuya cinética y amplitud fue similar a la de la señal de Ca²⁺ inducida por AA (30 μ M) en células del mismo cultivo celular. La aplicación de AP (línea verde), causa también un incremento de la [Ca²⁺]_i, sin embargo, este aumento fue lento en comparación con el evocado por AA y ETYA. En la **Figura 9B**, se muestra el valor de la media \pm el ES de la amplitud del pico de la señal de Ca²⁺ evocada por la aplicación de AA 30 μ M (barra azul), ETYA 30 μ M (barra roja), y AP 30

μM (barra verde). No se encontraron diferencias significativas entre la amplitud de la señal de Ca^{2+} activada por AA (0.33 ± 0.02 A.U.) y ETYA (0.34 ± 0.02 A.U.) (ns; $p \geq 0.05$). Por otro lado, la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} evocada por AP tuvo un valor de 0.18 ± 0.01 A.U., la cual fue estadísticamente menor a la evocada tanto por AA como por ETYA (*; $p \leq 0.05$).

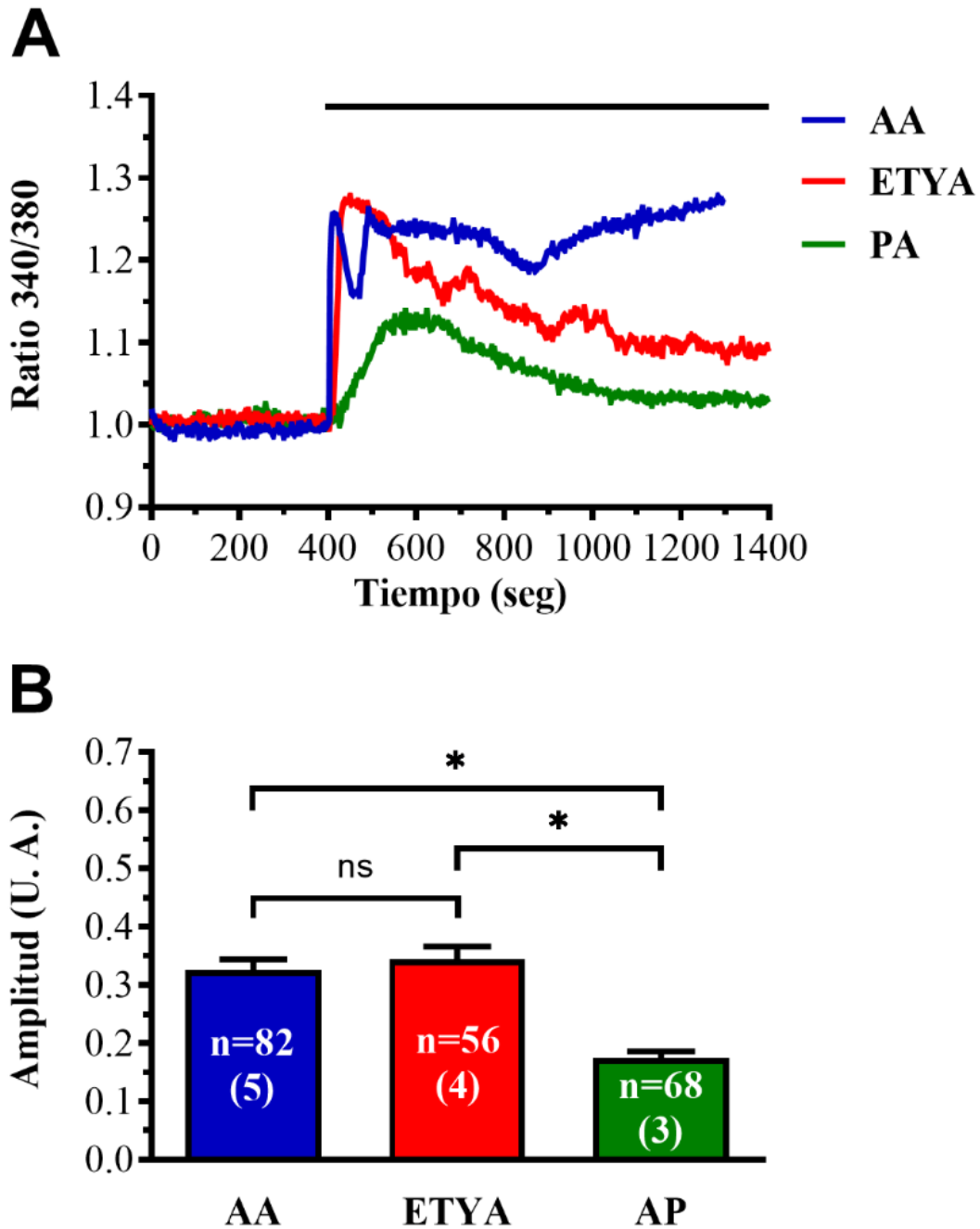


Figura 9. Efecto del AA, ETYA análogo no hidrolizable del AA y del ácido palmitoleico sobre la señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano WI-38. (A) Registros típicos de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de AA 30 μM (línea azul), ETYA 30 μM (línea roja) y AP 30 μM (línea verde) en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubados con Fura-2 AM. Con fines comparativos, los valores de fluorescencia de cada registro típico (F) fueron divididos entre la media del valor de fluorescencia en condiciones basales (antes de la aplicación de los agonistas) (F_0), de tal manera que la relación (F/F_0) hace que se superpongan los valores de Ca^{2+} basal de los tres registros en el valor del Ratio 340/380 de 1. **(B)** Media \pm ES de la amplitud del pico de Ca^{2+} evocado por la aplicación de AA 30 μM (barra azul), ETYA 30 μM (barra roja) y AP 30 μM (barra verde) en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubados con Fura-2 AM. La n, representa el número de células estudiadas y los números entre paréntesis, el número de cultivos celulares diferentes de donde se obtuvo la n. Prueba estadística de Mann Whitney (ns; $p \geq 0.05$, * $p \leq 0.05$).

12.4. El AA activa la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38.

En la **Figura 10A**, se muestran sobrepuestos, los registros típicos de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de 30 (línea azul) y 50 (línea roja) μM de AA a fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38 perfundidos con una solución extracelular libre de Ca^{2+} (0Ca). Con la finalidad de asegurar la ausencia de Ca^{2+} en el medio durante la estimulación con AA, el Ca^{2+} extracelular fue removido 100 segundos antes de la aplicación de AA (ver barra gris). La aplicación de ambas concentraciones de AA en un medio extracelular libre de Ca^{2+} evocaron un aumento rápido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (pico) seguido por el retorno de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ligeramente por debajo de los niveles basales de Ca^{2+} . En la sección de antecedentes generales, se describió que una de las principales vías de entrada de Ca^{2+} del medio extracelular en células no excitables como son los fibroblastos, es a través de los canales de Ca^{2+} operados por almacenes intracelulares (SOC) y la entrada de Ca^{2+} por esta vía es conocida como SOCE. Uno de los protocolos experimentales comúnmente utilizados para observar la SOCE, consiste en vaciar el RE estimulando a las células con un agonista en ausencia de Ca^{2+} extracelular y posteriormente, en continua presencia del agonista, adicionar a las células una solución extracelular con una concentración normal de Ca^{2+} . En la **Figura 10A** se muestra que después de vaciar el RE con 30 y 50 μM de AA en

ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, la adición de Ca^{2+} extracelular en la continua presencia del AA, causa un rápido aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que corresponde a la SOCE. En la **Figura 10B**, se muestra el valor de la media \pm el ES de la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de AA 30 μM en un medio con Ca^{2+} extracelular (barra negra, datos obtenidos, con fines comparativos, de la curva concentración respuesta mostrada en la **Figura 7B**), y la media \pm el ES de la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} evocada por 30 (barra azul) y 50 (barra roja) μM de AA aplicado en ausencia de Ca^{2+} extracelular (0Ca). La amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada en 0Ca por AA 30 μM y 50 μM fue de 0.16 ± 0.01 y 0.19 ± 0.01 A.U. respectivamente y fue significativamente menor a la evocada en solución extracelular con concentraciones normales de Ca^{2+} (0.33 ± 0.02 A.U.; $p \leq 0.05$). En la **Figura 10C**, se muestra la media \pm ES de la amplitud de la SOCE evocada por 30 (barra azul) y 50 (barra roja) μM de AA con un valor de 0.35 ± 0.02 y 0.29 ± 0.02 A.U. respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre ambas medias (ns; * $p \geq 0.05$).

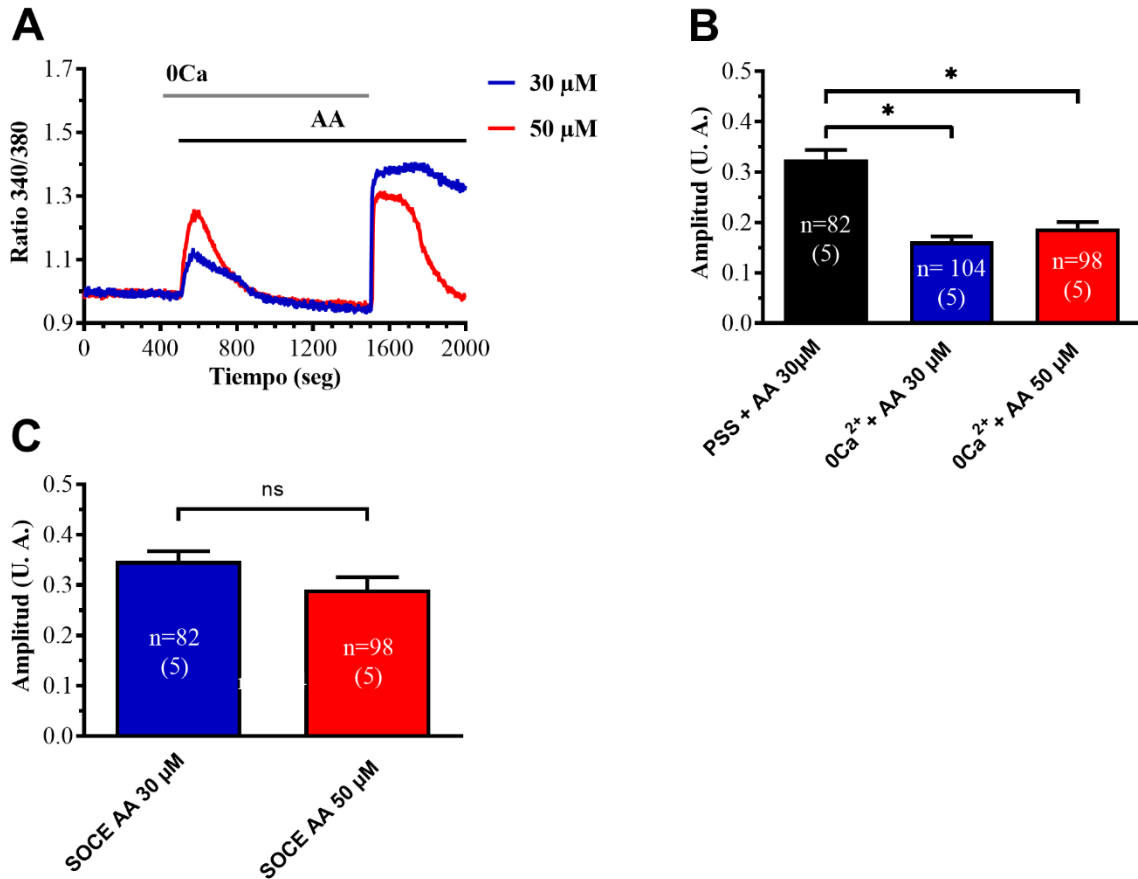


Figura 10. Liberación de Ca^{2+} intracelular y entrada de Ca^{2+} del medio extracelular activada por AA en fibroblastos de pulmón humano de la línea WI-38. (A) Registros típicos de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de AA 30 μM (línea azul) y 50 μM (línea roja) en fibroblasto de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubados con Fura-2 AM y perfundidos con una solución extracelular libre de Ca^{2+} (0Ca). Con fines comparativos, los valores de fluorescencia de cada registro típico (F) fueron divididos entre la media del valor de fluorescencia en condiciones basales (antes de la aplicación de los agonistas) (F_0), de tal manera que la relación (F/F_0) hace que se superpongan los valores de Ca^{2+} basal de los dos registros en el valor del Ratio 340/380 de 1. **(B)** Media \pm ES de la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de AA 30 μM en presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (barra negra). Con fines comparativos estos datos fueron obtenidos de la curva concentración-respuesta mostrados en la **Figura 7B**. Media \pm ES de la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de 30 (barra azul) y 50 (barra roja) μM de AA en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (0Ca) en fibroblasto de pulmón humano de la línea celular WI-38 incubados con Fura-2 AM. **(C)** Media \pm ES de la amplitud de la SOCE evocada por AA 30 (barra azul) y 50 (barra roja) μM de AA. La n, representa el número de células estudiadas y los números entre paréntesis, el número de cultivos celulares diferentes de donde se obtuvo la n. Prueba estadística de Mann Whitney (ns; $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$).

12.5. La liberación de Ca^{2+} inducida por el AA es dependiente del RE, lisosomas y canales TPC1-2

Recientes estudios demostraron que el AA induce la liberación de Ca^{2+} endógeno en diferentes tipos celulares (Berra-Romani et al., 2019; Munaron, 2011; Thompson et al., 2014; Yeung-Yam-Wah et al., 2012). Con la finalidad de estudiar los mecanismos moleculares implicados en la liberación endógena de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano inducida por AA, primero se vaciaron los almacenes intracelulares de Ca^{2+} con ácido ciclopiazónico (CPA) (10 μM). Estos experimentos se llevaron a cabo en un medio extracelular libre de Ca^{2+} (0Ca^{2+}) con la finalidad de evaluar el aumento de Ca^{2+} intracelular debido únicamente a la liberación de los almacenes internos de la célula, sin la interferencia de la entrada de Ca^{2+} del medio externo. Como se muestra en la **Figura 11**, la respuesta endógena de Ca^{2+} activada por el AA (**Figura 11A**), fue reducida significativamente por el vaciamiento del RE con CPA (**Figura 11B**). Como se ha descrito previamente, el CPA causa un aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, este aumento es debido a que el bloqueo de la SERCA por CPA impide que esta bomba recapture el Ca^{2+} que pasivamente se fuga del RE a través de canales de fuga de Ca^{2+} presentes en la membrana de este almacén intracelular. Para confirmar que el RE estuviera vacío, se aplicó 300 μM de adenosin-trifosfato (ATP), un agonista capaz de inducir la liberación de Ca^{2+} del RE (Daverkausen-Fischer & Pröls, 2022; Lembong et al., 2015). La aplicación de ATP no causó cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, confirmando el vaciamiento del RE. Posteriormente se procedió a aplicar 30 μM de AA. En estas condiciones el AA causa una repuesta de Ca^{2+} menor a la inducida sin CPA (**Figura 11A**), sin embargo, aún causa un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicando la posible participación de otros almacenes intracelulares de Ca^{2+} (p.e. lisosomas) como posible fuente endógena de Ca^{2+} . A continuación, evaluamos la contribución de la liberación de Ca^{2+} de los lisosomas con glicil-L-fenilalanina-2-naftalamida (GPN) (200 μM) administrado en condiciones de 0Ca (**Figura 11C**). El pretratamiento de las células con GPN induce un aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, causado por la disrupción de los almacenes de Ca^{2+} lisosomales y la subsecuente liberación de Ca^{2+} lisosomal hacia el citosol. La aplicación de AA en células pretratadas con GPN causa un aumento de la

[Ca²⁺]_i con una amplitud significativamente menor a la evocada por AA en ausencia de GPN (**Figura 11A**). En adición, la movilización de Ca²⁺ evocada por AA, fue inhibida por el pretratamiento de las células con 100 μM del inhibidor de los canales TPC-1 (NED-19) por 30 minutos, (**Figura 11D**). En la Figura 7E, se muestra el valor de la media ± el ES de la amplitud del pico de la señal de Ca²⁺ evocada por la aplicación de AA 30 μM en ausencia de Ca²⁺ en el medio extracelular (Ca₀, barra negra) y después de: 1) el vaciamiento del RE con CPA 10 μM (barra azul), disrupción de la integridad de los lisosomas con GPN 100 μM (barra roja) y después de la inhibición de los canales TPC-1 con NED-19 100 μM (barra verde). La media ± ES de la amplitud de la señal de Ca²⁺ evocada por AA en Ca₀ fue de 0.16 ± 0.01 A.U. y esta fue significativamente reducida a: 0.07 ± 0.01; 0.10 ± 0.01 y 0.04 ± 0.01 A.U. por el tratamiento con CPA, GPN y NED-19 respectivamente (p ≤ 0.05).

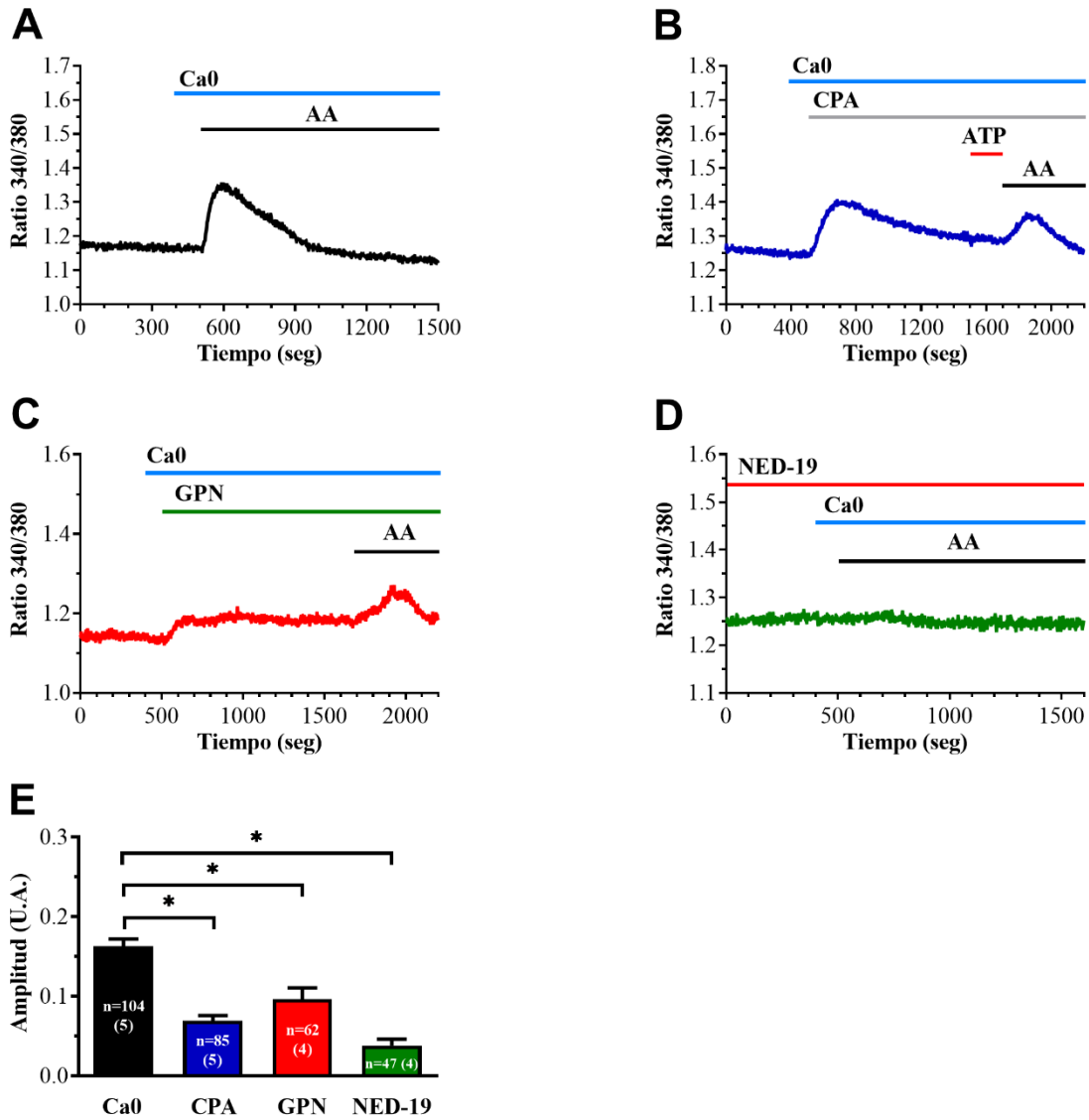


Figura 11. La liberación de Ca²⁺ endógena causada por AA, es mediada por el RE, lisosomas y canales TPC1. (A) Registro típico de señal de Ca²⁺ evocada por AA 30 μM en fibroblastos WI-38 perfundidos con una solución extracelular libre de Ca²⁺ (Ca0). (B) Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por AA 30 μM posterior al vaciamiento del RE con el inhibidor de la SERCA (CPA 10 μM) en una solución externa libre de Ca²⁺ (Ca0). Con la finalidad de confirmar el vaciamiento del RE, se aplicó ATP (300 μM). (C) Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por AA 30 μM posterior a la disrupción de los lisosomas con GPN 100 μM en ausencia de Ca²⁺ en el medio extracelular (Ca0). (D) Registro típico de la señal de Ca²⁺ evocada por AA 30 μM posterior a la inhibición de los canales TPC1-2 con NED-19 100 μM en ausencia de Ca²⁺ en el medio extracelular (Ca0). E) Media ± ES de la amplitud de pico de Ca²⁺ evocado por AA 30 μM en ausencia de Ca²⁺ en el medio extracelular (barra negra); después del: vaciamiento del RE con CPA (barra azul); disrupción de los lisosomas con GPN (barra roja) y de la inhibición de

los canales TPC1-2 con NED-19 (barra verde). La n, representa el número de células estudiadas y los números entre paréntesis, el número de cultivos celulares diferentes de donde se obtuvo la n. Prueba estadística de Mann Whitney (* $p \leq 0.05$).

13. Discusión

En el presente trabajo, se investigó por primera vez el efecto de la aplicación exógena de AA sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38, una línea celular de fibroblastos de pulmón humano aislada de tejido pulmonar de un embrión femenino de 3 meses de edad. El AA causa un aumento rápido transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ que decae lentamente hacia una fase sostenida de los niveles de Ca^{2+} que se mantiene por arriba de los niveles de Ca^{2+} basales (meseta). Este tipo de respuesta evocada por el AA, es similar a la reportada por Dr. Berra Romani y colaboradores en células endoteliales de microvasos de cerebro humano (Berra-Romani et al., 2019) y por Zuccolo y colaboradores en células endoteliales formadoras de colonias (Zuccolo et al., 2016). Si bien, esto fue visto en otras células no en fibroblastos, pueden ser un precedente de las posibles bases moleculares implicadas en este modelo celular. Estas bases moleculares implican: (1) la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} como son el RE y los lisosomas mediada por los canales TPC1-2 y (2) la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular.

La concentración de AA libre en plasma humano reportada, es de alrededor de 400-600 μM (Abdelmagid et al., 2015; Richmond et al., 2004). Dado a que la mayor parte de este AA plasmático se encuentra unido a la albumina (McArthur et al., 1999), la concentración de AA a nivel tisular y celular disminuye a un valor de entre 1-150 μM (Richmond et al., 2004; Thompson et al., 2014), esto también debido a la presencia de proteínas extracelulares unidoras de ácidos grasos y albumina (McArthur et al., 1999). Por esta razón muchas de las investigaciones realizadas sobre la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por el AA y la vía de señalización implicada se han realizado utilizando concentraciones de AA entre 1 y 45 μM (Dubois et al., 2014; Meves, 2008; Thompson et al., 2014). En el presente trabajo se encontró que el AA induce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de la concentración de AA utilizada, con una EC_{50}

2.44 μM y que la máxima amplitud de la señal de Ca^{2+} se obtuvo a concentraciones entre 10–100 μM . Cuando se aplicaron concentraciones mayores de AA (300 μM) evocan señales de Ca^{2+} con una amplitud menor a la de concentraciones menores. Este resultado podría estar correlacionado con el efecto citotóxico que producen concentraciones altas de AA en diferentes líneas celulares in vitro (Tallima & El Ridi, 2018), por ejemplo, la apoptosis reportada por Maia y colaboradores (Maia et al., 2006). En los experimentos de este trabajo realizados para investigar la vía de señalización de Ca^{2+} intracelular activada por el AA se utilizó la concentración de AA de 30 μM que por una parte causa un efecto máximo en los fibroblastos de pulmón humano WI-38 y por otro lado es una concentración similar a la utilizada por otros investigadores en diversos tipos celulares. Zuccolo y Colaboradores, en el 2016 (Zuccolo et al., 2016) y Dragoni y Colaboradores, en el 2015 (Dragoni et al., 2015) utilizando células endoteliales formadoras de colonias, encontraron que el AA causa un aumento máximo de la señal de Ca^{2+} a una concentración de 100 μM . Un estudio más reciente, realizado por el grupo de investigación del Dr. Berra Romani y colaboradores en 2019, demostró que el AA también puede activar una señal de Ca^{2+} en la línea de células endoteliales de microvasos cerebrales de humanos (hCMEC) con una $\text{EC}_{50} = 8.4 \text{ mM}$ y que la amplitud máxima de la señal de Ca^{2+} evocada por el AA se obtuvo con concentración de 30 y 300 μM (Berra-Romani et al., 2019). En adición, también se reportó que la aplicación de 50 μM de AA a fibroblastos murinos de la línea celular C3HA causa un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Maia et al., 2006). Es importante señalar que los niveles de AA a nivel tisular, pueden incrementarse por arriba de las centenas de micromoles en respuesta a la activación de las plaquetas (Neufeld & Majerus, 1983; Richmond et al., 2004) ejercicio físico (Giordano et al., 2011), a la inflamación (Hammarstrom et al., 1975) e isquemia tisular (Allaj et al., 2013; Jenkins et al., 2009). Tomando en conjunto estos datos se puede concluir que los fibroblastos de pulmón humano son sensibles a concentraciones de AA que pueden activar funciones fisiológicas tanto en estados de salud como de enfermedad.

La señal de Ca^{2+} evocada por el AA puede ser activada por muchos de sus derivados, tales como los ácidos epoxieicosatrienoicos (5,6-ETT; 8,9-ETT) y el

leuctrieno C4, los cuales son sintetizados, respectivamente por epoxioxigenasa del citocromo P450 y glutatión S-transferasa 2 (Wang et al., 2021). Un ejemplo de esto se observa en la investigación realizada por Harks y colaboradores, donde reportan que la PGF2 α induce una respuesta de Ca²⁺ en fibroblastos de riñón de rata normal caracterizada por un pico rápido de Ca²⁺, mediado por la liberación de Ca²⁺ de las reservas sensibles a IP₃, que, en casi todas las células, fue seguido por oscilaciones de calcio repetitivas (Harks et al., 2003). La respuesta de Ca²⁺ evocada por estos eicosanoides es relevante debido a que existen reportes en los que se han relacionado con la fibrosis pulmonar, por ejemplo, la PGF2 α que es reconocida como un mediador profibrótico (ver antecedentes específicos) por lo que es de gran importancia para este proyecto determinar si en la respuesta de Ca²⁺ observada tras la aplicación de AA participan sus metabolitos. Para comprobar que la respuesta en la [Ca²⁺]_i de los fibroblastos de pulmón humano es debida al efecto del AA y no de sus derivados metabólicos, se comparó esta señal con la evocada por el ácido eicosatrienoico (ETYA) un análogo no metabolizable del AA que bloquea a las lipooxigenasas, ciclooxigenasas y al CYP450 actuando como un falso sustrato (Meves, 2008). El ETYA (30 μ M) en fibroblastos de pulmón humano WI-38 indujo un incremento de la [Ca²⁺]_i cuya cinética y amplitud fue similar a la de la señal de Ca²⁺ inducida por AA (30 μ M) en células del mismo cultivo celular, con estos resultados se puede determinar que la respuesta en la señal de Ca²⁺ evocada por el AA en fibroblastos WI-38 es un efecto directo del AA y no de los productos de su metabolismo. Resultados similares han sido reportados en otros tipos celulares: células endoteliales de aorta de bovinos (Fiorio Pla & Munaron, 2001), células beta pancreáticas de rata (Yeung-Yam-Wah et al., 2012), células de carcinoma mamario humano (Fiorio Pla et al., 2008), células endoteliales formadoras de colonias (Zuccolo et al., 2016) y células de microvasos de cerebro humano (Berra-Romani et al., 2019), entre otras. En conjunto estos resultados, demuestran que el AA no necesita ser metabolizado para activar una señal de Ca²⁺ intracelular en fibroblastos de pulmón humano WI-38.

La cinética bifásica del incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ evocada por el AA fue constante en el rango de concentración de AA utilizadas. En diversos tipos celulares el AA induce señales de Ca^{2+} que consisten en un rápido aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (denominado como pico) que implican la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares; seguido de una fase sostenida de decaída lenta de la $[Ca^{2+}]_i$ hacia los niveles basales de Ca^{2+} (denominada como meseta) debida a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular (Fiorio Pla et al., 2010; Fiorio Pla & Munaron, 2001; Kohler et al., 2006; Mottola et al., 2005). Con la finalidad de conocer cuáles son las fuentes de Ca^{2+} que determinan la morfología de la señal de Ca^{2+} evocada por el AA en fibroblastos de pulmón humano de la línea celular WI-38, el AA fue aplicado en la ausencia de Ca^{2+} extracelular (0Ca), posteriormente el Ca^{2+} fue reintroducido a la solución de perfusión en la continua presencia del agonista. En todas las concentraciones de AA aplicadas (30 y 50 micromolar), el AA causa un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones de 0Ca, **demonstrando que el AA promueve la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Figura 10A y 10B)**. La subsecuente restitución del Ca^{2+} en la solución extracelular, induce una segunda elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, la cual depende de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular (**Figura 10A y 10C**), como se ha descrito en la sección de antecedentes a este ingreso de Ca^{2+} que se activa por el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} por la estimulación con el agonista (AA), en ausencia de Ca^{2+} , se le conoce como SOCE (**Figura 12**). En conjunto estos experimentos indican que el AA incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ en fibroblastos WI-38 causando la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y activando la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Similares resultados han sido reportados por otros investigadores en diferentes tipos celulares (Berra-Romani et al., 2019; Dragoni et al., 2015; Zuccolo et al., 2016). Cabe mencionar que al comparar la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada por AA 30 μ M en fibroblastos perfundidos con Ca0 y la amplitud de la señal de Ca^{2+} evocada por la misma concentración de AA (30 μ M) en fibroblastos perfundidos con una solución con Ca^{2+} normal (PSS ver figura 10B), se puede observar que la amplitud de la respuesta en 0Ca fue estadísticamente menor a la evocada en PSS. Estos resultados confirman que el AA además de provocar la liberación de Ca^{2+} de sus almacenes intracelulares también **promueve la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular**. Comparando la

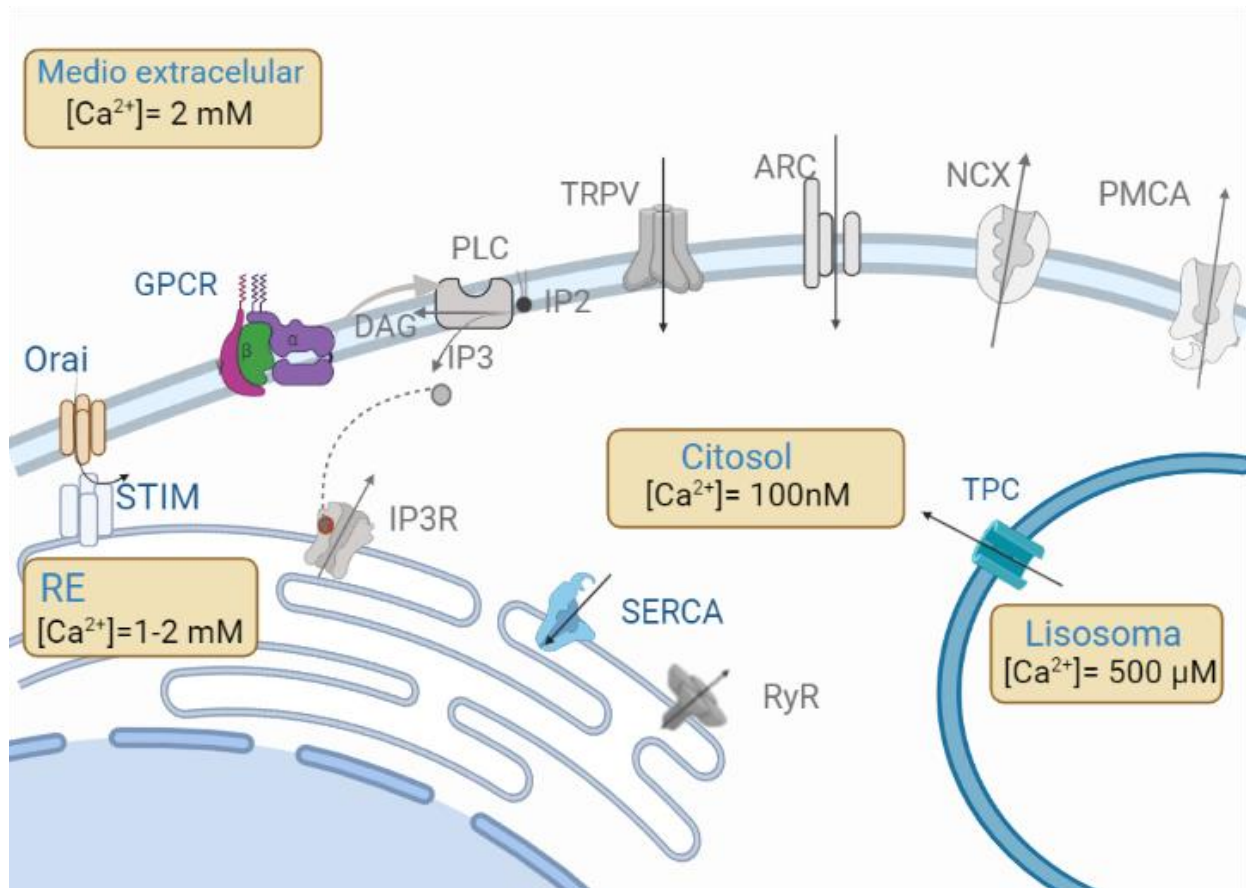
amplitud de la respuesta de Ca^{2+} y la amplitud de la SOCE, evocadas por AA a concentraciones de 30 y 50 μM , no se encontraron diferencias estadísticas significativas, confirmando que la concentración de AA que induce el máximo efecto en fibroblastos WI-38 tanto en la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, así como la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular se alcanza con la concentración de 30 μM .

Con la finalidad de indagar más profundamente sobre los mecanismos moleculares implicados en la señal de Ca^{2+} evocada por el AA en los fibroblastos de pulmón humano, el estudio se enfocó en la movilización de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares inducida por AA. Todos los experimentos fueron realizados en ausencia de Ca^{2+} extracelular (0Ca) para prevenir cualquier interferencia con la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. En la presente tesis primero estudiamos la contribución del RE como fuente de Ca^{2+} endógeno para la respuesta de Ca^{2+} activada por AA. El contenido de Ca^{2+} en el RE fue vaciado con ácido ciclopiazónico (CPA), en ausencia de Ca^{2+} extracelular. El CPA es un inhibidor de la SERCA que evita que esta proteína recapture el Ca^{2+} que normal y continuamente, se fuga del RE a través de canales de fuga presentes en la membrana de este organelo, por lo tanto, ocurre un aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que es debido al vaciamiento pasivo del RE (Zuccolo et al., 2019). La subsecuente adición de AA bajo estas condiciones falla en incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por lo tanto, **confirmando el papel del Ca^{2+} del RE en la respuesta de Ca^{2+} intracelular evocada por AA.** Además de que el AA puede causar la liberación de Ca^{2+} del RE, el AA es capaz de movilizar Ca^{2+} de los lisosomas a través de un mecanismo recientemente identificado, a través de TPC1-2, como se demostró en células beta del páncreas (Yeung-Yam-Wah et al., 2012), en células endoteliales formadoras de colonias (Zuccolo et al., 2016), y células endoteliales de microvasos de cerebro humano (Berra-Romani et al., 2019). Por lo tanto, nuestra segunda aproximación fue estudiar la participación de los lisosomas como fuente de Ca^{2+} endógeno para la respuesta de Ca^{2+} activada por AA. En los resultados obtenidos en este trabajo, la señal de Ca^{2+} evocada por el AA en fibroblasto de pulmón humano fue bloqueada por Ned-19 (100 μM), un inhibidor específico de la liberación de Ca^{2+} inducida por NAADP a través de los canales TPC, así como con Glycyl-L-fenilalanina

2-naftilamida (GPN, 100 μ M) (**Figura 11**) que provoca la lisis de los almacenes ácidos, **confirmando el papel del Ca^{2+} de los lisosomas en la respuesta de Ca^{2+} intracelular evocada por AA.** A la fecha no es claro cómo es que el AA puede inducir la liberación de Ca^{2+} de los lisosomas en los fibroblastos de pulmón humano. Recientemente ha surgido una propuesta que podría estar involucrada en este proceso, ya que se ha demostrado que existe una comunicación estrecha, dependiente de Ca^{2+} , entre los almacenes de Ca^{2+} del RE y de los lisosomas (Atakpa et al., 2018; Faris et al., 2019; Garrity et al., 2016; Ronco et al., 2015). Por ejemplo, el Ca^{2+} liberado del RE por IP_3 puede directamente ser transferido hacia el interior de las vesículas ácidas en los sitios de contacto entre el RE y los lisosomas, dando como resultado un incremento de Ca^{2+} en los lisosomas (Atakpa et al., 2018). El incremento del Ca^{2+} intraluminal puede a su vez activar a los TPC2 y, algunas veces, también TPC1 (Pitt et al., 2016). Una hipótesis alternativa, la cual no descarta las hipótesis anteriores, implica que el Ca^{2+} liberado por los IP_3 estimula la producción de NAADP dependiente de Ca^{2+} , el agonista fisiológico de los TPC (Di Nezza et al., 2017; Pitt et al., 2016). Finalmente, TPC1-2 puede activar la liberación de Ca^{2+} dependiente de IP_3 a través del proceso denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Galione, 2015; Moccia et al., 2006).

El hecho de que el AA movilice Ca^{2+} de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , indica que la liberación de Ca^{2+} intracelular tiene una función importante en la respuesta total de Ca^{2+} inducida por el AA en fibroblastos de pulmón humano. De acuerdo a lo antes mencionado, el vaciamiento del contenido de Ca^{2+} del RE con CPA previene la movilización de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares. La interpretación más probable de este hallazgo sería que el AA active a un receptor acoplado a proteínas G (GPCR), que conlleve a la estimulación de la PLC, síntesis de IP_3 y la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares a través del receptor-canal a IP_3 (IP_3R) (Berridge et al., 2003). Se ha demostrado que los ácidos grasos libres, incluyendo el AA, controla la secreción de insulina en células beta pancreáticas activando el receptor GPCR40 (Itoh et al., 2003). La activación de dicho receptor por ácidos grasos causa un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células pancreáticas (Itoh et al., 2003). Aunque la expresión de este receptor no ha sido demostrada en fibroblastos de

pulmón humano, dos resultados presentados en esta tesis darían aportar evidencia de su existencia. Por una parte, se ha demostrado que el receptor GPCR40 puede ser activado por varios ácidos grasos libres (Itoh et al., 2003). Nuestros resultados confirman que la señal de Ca^{2+} activada por AA puede ser también inducida por la aplicación de otro ácido graso libre, el ácido palmitoleico, el cual aplicado a una concentración similar a la del AA, es capaz de generar una señal de Ca^{2+} intracelular en los fibroblastos de pulmón humano. La segunda evidencia es que la aplicación repetida de AA en fibroblastos de pulmón humano, causó una desensibilización de la



respuesta, este fenómeno es característico de agonistas que actúan sobre los GPCR.

Figura 12. Resumen de los mecanismos de regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de acuerdo a los resultados del presente trabajo en fibroblastos de pulmón humano. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se debió a dos mecanismos la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Con la utilización de CPA en ausencia de Ca^{2+} extracelular se confirmó la participación del RE en la respuesta de Ca^{2+} intracelular evocada por AA, aún no se describe a través de qué canales es mediada esta liberación de Ca^{2+} del RE,

pero se sugiere que AA puede activar un **GPCR**, lo que conlleva a la estimulación de la PLC, síntesis de IP_3 y la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares a través del IP_3R . La inhibición de la señal de Ca^{2+} por GPN demostró el papel del Ca^{2+} de los **lisosomas** en la respuesta de Ca^{2+} intracelular evocada por AA, en adición la inhibición de la señal de Ca^{2+} por Ned-19 demostró que la liberación de Ca^{2+} de los lisosomas es medida por los canales **TPC**. El ingreso de Ca^{2+} que se activa por el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} por la estimulación con el agonista (AA), en ausencia de Ca^{2+} , demostró la activación de **SOCE** (Orai, STIM), que media la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. (Creado con BioRender.com).

14. Conclusiones

- I. El AA causa un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ dependiente de la concentración de AA utilizada en fibroblastos de pulmón humano WI-38.
- II. La aplicación repetida de AA causa desensibilización de la señal de Ca^{2+} intracelular en fibroblastos de pulmón humano.
- III. La señal de Ca^{2+} evocada por AA es mediada por dicho agonista y por los productos de su metabolismo.
- IV. El AP activa una señal de Ca^{2+} en fibroblastos de pulmón humano.
- V. El AA promueve la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular en fibroblastos de pulmón humano.
- VI. El AA causa la liberación de Ca^{2+} del RE y de los lisosomas en fibroblastos de pulmón humano.
- VII. La liberación de Ca^{2+} de los lisosomas evocada por el AA es mediada a través de los canales TPC.

15. Bibliografía

- Abdelmagid, S. A., Clarke, S. E., Nielsen, D. E., Badawi, A., El-Soheemy, A., Mutch, D. M., & Ma, D. W. (2015). Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PLoS One*, *10*(2), e0116195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116195>
- Allaj, V., Guo, C., & Nie, D. (2013). Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. *Cell Biosci*, *3*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-8>
- Association, A. L. (2020). *¿Qué es la fibrosis pulmonar?* . <https://www.lung.org/espanol/fibrosis-pulmonar>.
- Atakpa, P., Thillaiappan, N. B., Mataragka, S., Prole, D. L., & Taylor, C. W. (2018). IP3 Receptors Preferentially Associate with ER-Lysosome Contact Sites and Selectively Deliver Ca(2+) to Lysosomes. *Cell Rep*, *25*(11), 3180-3193 e3187. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.064>
- Bagur, R., & Hajnoczky, G. (2017). Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell*, *66*(6), 780-788. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>
- Bendiks, L., Geiger, F., Gudermann, T., Feske, S., & Dietrich, A. (2020). Store-operated Ca(2+) entry in primary murine lung fibroblasts is independent of classical transient receptor potential (TRPC) channels and contributes to cell migration. *Sci Rep*, *10*(1), 6812. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63677-2>
- Berra-Romani, R., Faris, P., Negri, S., Botta, L., Genova, T., & Moccia, F. (2019). Arachidonic Acid Evokes an Increase in Intracellular Ca(2+) Concentration and Nitric Oxide Production in Endothelial Cells from Human Brain Microcirculation. *Cells*, *8*(7). <https://doi.org/10.3390/cells8070689>
- Berridge, M. J. (2016). The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol Rev*, *96*(4), 1261-1296. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2016>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *4*(7), 517-529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>

- Brash, A. R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest*, 107(11), 1339-1345. <https://doi.org/10.1172/JCI13210>
- Cantoneo, C., Sanchez-Collado, J., Lopez, J. J., Salido, G. M., Rosado, J. A., & Redondo, P. C. (2020). Arachidonic Acid Attenuates Cell Proliferation, Migration and Viability by a Mechanism Independent on Calcium Entry. *Int J Mol Sci*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093315>
- Claar, D., Hartert, T. V., & Peebles, R. S., Jr. (2015). The role of prostaglandins in allergic lung inflammation and asthma. *Expert Rev Respir Med*, 9(1), 55-72. <https://doi.org/10.1586/17476348.2015.992783>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Conrard, L., & Tyteca, D. (2019). Regulation of Membrane Calcium Transport Proteins by the Surrounding Lipid Environment. *Biomolecules*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/biom9100513>
- Di Nezza, F., Zuccolo, E., Poletto, V., Rosti, V., De Luca, A., Moccia, F., Guerra, G., & Ambrosone, L. (2017). Liposomes as a Putative Tool to Investigate NAADP Signaling in Vasculogenesis. *J Cell Biochem*, 118(11), 3722-3729. <https://doi.org/10.1002/jcb.26019>
- Dragoni, S., Guerra, G., Fiorio Pla, A., Bertoni, G., Rappa, A., Poletto, V., Bottino, C., Aronica, A., Lodola, F., Cinelli, M. P., Laforenza, U., Rosti, V., Tanzi, F., Munaron, L., & Moccia, F. (2015). A functional transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel is expressed in human endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol*, 230(1), 95-104. <https://doi.org/10.1002/jcp.24686>
- Dubois, C., Vanden Abeele, F., Lehen'kyi, V., Gkika, D., Guarmit, B., Lepage, G., Slomianny, C., Borowiec, A. S., Bidaux, G., Benahmed, M., Shuba, Y., & Prevarskaya, N. (2014). Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell*, 26(1), 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.025>
- Effendi, W. I., & Nagano, T. (2022). Connective Tissue Growth Factor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Breaking the Bridge. *Int J Mol Sci*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23116064>

- Elinder, F., & Liin, S. I. (2017). Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels. *Front Physiol*, 8, 43. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00043>
- Faris, P., Pellavio, G., Ferulli, F., Di Nezza, F., Shekha, M., Lim, D., Maestri, M., Guerra, G., Ambrosone, L., Pedrazzoli, P., Laforenza, U., Montagna, D., & Moccia, F. (2019). Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Induces Intracellular Ca²⁺ Release through the Two-Pore Channel TPC1 in Metastatic Colorectal Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/cancers11040542>
- Fiorio Pla, A., Genova, T., Pupo, E., Tomatis, C., Genazzani, A., Zaninetti, R., & Munaron, L. (2010). Multiple roles of protein kinase a in arachidonic acid-mediated Ca²⁺ entry and tumor-derived human endothelial cell migration. *Mol Cancer Res*, 8(11), 1466-1476. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0002>
- Fiorio Pla, A., Grange, C., Antoniotti, S., Tomatis, C., Merlino, A., Bussolati, B., & Munaron, L. (2008). Arachidonic acid-induced Ca²⁺ entry is involved in early steps of tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res*, 6(4), 535-545. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0271>
- Fiorio Pla, A., & Munaron, L. (2001). Calcium influx, arachidonic acid, and control of endothelial cell proliferation. *Cell Calcium*, 30(4), 235-244. <https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0234>
- Galione, A. (2015). A primer of NAADP-mediated Ca²⁺ signalling: From sea urchin eggs to mammalian cells. *Cell Calcium*, 58(1), 27-47. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.09.010>
- Garrity, A. G., Wang, W., Collier, C. M., Levey, S. A., Gao, Q., & Xu, H. (2016). The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes. *Elife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.15887>
- Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J. R., Meredith, J., Stacey, G. N., Thraves, P., Vias, M., & Cancer Research, U. K. (2014). Guidelines for the use of cell lines

- in biomedical research. *Br J Cancer*, 111(6), 1021-1046.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>
- Giordano, R. M., Newman, J. W., Pedersen, T. L., Ramos, M. I., & Stebbins, C. L. (2011). Effects of dynamic exercise on plasma arachidonic acid epoxides and diols in human volunteers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 21(6), 471-479.
<https://doi.org/10.1123/ijsnem.21.6.471>
- Goswamee, P., Pounardjian, T., & Giovannucci, D. R. (2018). Arachidonic acid-induced Ca(2+) entry and migration in a neuroendocrine cancer cell line. *Cancer Cell Int*, 18, 30. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0529-8>
- Guse, A. H., & Diercks, B. P. (2018). Integration of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-dependent calcium signalling. *J Physiol*, 596(14), 2735-2743. <https://doi.org/10.1113/JP275974>
- Hammarstrom, S., Hamberg, M., Samuelsson, B., Duell, E. A., Stawiski, M., & Voorhees, J. J. (1975). Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E2, and prostaglandin F2alpha in epidermis of psoriasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(12), 5130-5134. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.5130>
- Harks, E. G., Scheenen, W. J., Peters, P. H., van Zoelen, E. J., & Theuvenet, A. P. (2003). Prostaglandin F2 alpha induces unsynchronized intracellular calcium oscillations in monolayers of gap junctionally coupled NRK fibroblasts. *Pflugers Arch*, 447(1), 78-86. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1126-8>
- Huang, W. J., & Tang, X. X. (2021). Virus infection induced pulmonary fibrosis. *J Transl Med*, 19(1), 496. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03159-9>
- Islam, M. S. (2020). Calcium Signaling: From Basic to Bedside. In M. S. Islam (Ed.), *Calcium Signaling* (pp. 1-6). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_1
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., . . . Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic

- beta cells through GPR40. *Nature*, 422(6928), 173-176. <https://doi.org/10.1038/nature01478>
- Janssen, L. J., Mukherjee, S., & Ask, K. (2015). Calcium Homeostasis and Ionic Mechanisms in Pulmonary Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 53(2), 135-148. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0269TR>
- Jenkins, C. M., Cedars, A., & Gross, R. W. (2009). Eicosanoid signalling pathways in the heart. *Cardiovasc Res*, 82(2), 240-249. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn346>
- Kohler, R., Heyken, W. T., Heinau, P., Schubert, R., Si, H., Kacik, M., Busch, C., Grgic, I., Maier, T., & Hoyer, J. (2006). Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(7), 1495-1502. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000225698.36212.6a>
- Kotova, P. D., Bystrova, M. F., Rogachevskaja, O. A., Khokhlov, A. A., Sysoeva, V. Y., Tkachuk, V. A., & Kolesnikov, S. S. (2018). Coupling of P2Y receptors to Ca(2+) mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. *Cell Calcium*, 71, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.11.001>
- Kur, J., McGahon, M. K., Fernandez, J. A., Scholfield, C. N., McGeown, J. G., & Curtis, T. M. (2014). Role of ion channels and subcellular Ca²⁺ signaling in arachidonic acid-induced dilation of pressurized retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(5), 2893-2902. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13511>
- Lloyd-Evans, E., & Waller-Evans, H. (2020). Lysosomal Ca(2+) Homeostasis and Signaling in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 12(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035311>
- Lynch, M. D., & Watt, F. M. (2018). Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest*, 128(1), 26-35. <https://doi.org/10.1172/JCI93555>
- Maia, R. C., Culver, C. A., & Laster, S. M. (2006). Evidence against calcium as a mediator of mitochondrial dysfunction during apoptosis induced by arachidonic acid and other free fatty acids. *J Immunol*, 177(9), 6398-6404. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6398>

- Mamazhakypov, A., Schermuly, R. T., Schaefer, L., & Wygrecka, M. (2019). Lipids - two sides of the same coin in lung fibrosis. *Cell Signal*, *60*, 65-80. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.04.007>
- Martin, S. A., Brash, A. R., & Murphy, R. C. (2016). The discovery and early structural studies of arachidonic acid. *J Lipid Res*, *57*(7), 1126-1132. <https://doi.org/10.1194/jlr.R068072>
- McArthur, M. J., Atshaves, B. P., Frolov, A., Foxworth, W. D., Kier, A. B., & Schroeder, F. (1999). Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res*, *40*(8), 1371-1383. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10428973>
- Meves, H. (2008). Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol*, *155*(1), 4-16. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.216>
- Moccia, F., Nusco, G. A., Lim, D., Kyojuka, K., & Santella, L. (2006). NAADP and InsP3 play distinct roles at fertilization in starfish oocytes. *Dev Biol*, *294*(1), 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.011>
- Mottola, A., Antoniotti, S., Lovisolo, D., & Munaron, L. (2005). Regulation of noncapacitative calcium entry by arachidonic acid and nitric oxide in endothelial cells. *FASEB J*, *19*(14), 2075-2077. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4110fje>
- Munaron, L. (2011). Shuffling the cards in signal transduction: Calcium, arachidonic acid and mechanosensitivity. *World J Biol Chem*, *2*(4), 59-66. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v2.i4.59>
- Munaron, L., Antoniotti, S., Distasi, C., & Lovisolo, D. (1997). Arachidonic acid mediates calcium influx induced by basic fibroblast growth factor in Balb-c 3T3 fibroblasts. *Cell Calcium*, *22*(3), 179-188. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(97\)90011-7](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(97)90011-7)
- Neufeld, E. J., & Majerus, P. W. (1983). Arachidonate release and phosphatidic acid turnover in stimulated human platelets. *J Biol Chem*, *258*(4), 2461-2467. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6401733>
- Pitt, S. J., Reilly-O'Donnell, B., & Sitsapesan, R. (2016). Exploring the biophysical evidence that mammalian two-pore channels are NAADP-activated calcium-permeable channels. *J Physiol*, *594*(15), 4171-4179. <https://doi.org/10.1113/JP270936>

- Richmond, R. S., Tallant, E. A., Gallagher, P. E., Ferrario, C. M., & Strawn, W. B. (2004). Angiotensin II stimulates arachidonic acid release from bone marrow stromal cells. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 5(4), 176-182. <https://doi.org/10.3317/jraas.2004.037>
- Roach, K. M., & Bradding, P. (2020). Ca(2+) signalling in fibroblasts and the therapeutic potential of KCa3.1 channel blockers in fibrotic diseases. *Br J Pharmacol*, 177(5), 1003-1024. <https://doi.org/10.1111/bph.14939>
- Ronco, V., Potenza, D. M., Denti, F., Vullo, S., Gagliano, G., Tognolina, M., Guerra, G., Pinton, P., Genazzani, A. A., Mapelli, L., Lim, D., & Moccia, F. (2015). A novel Ca(2+)-mediated cross-talk between endoplasmic reticulum and acidic organelles: implications for NAADP-dependent Ca(2+) signalling. *Cell Calcium*, 57(2), 89-100. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.01.001>
- Rychkov, G. Y., Litjens, T., Roberts, M. L., & Barritt, G. J. (2005). Arachidonic acid inhibits the store-operated Ca²⁺ current in rat liver cells. *Biochem J*, 385(Pt 2), 551-556. <https://doi.org/10.1042/BJ20041604>
- Salem, N., Jr., & Van Dael, P. (2020). Arachidonic Acid in Human Milk. *Nutrients*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/nu12030626>
- Santulli, G., Lewis, D., des Georges, A., Marks, A. R., & Frank, J. (2018). Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Subcell Biochem*, 87, 329-352. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_11
- Shuttleworth, T. J. (2009). Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins. *Cell Calcium*, 45(6), 602-610. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.02.001>
- Tallima, H., & El Ridi, R. (2018). Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - A review. *J Adv Res*, 11, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.11.004>
- Tedeschi, V., Petrozziello, T., & Secondo, A. (2019). Calcium Dyshomeostasis and Lysosomal Ca(2+) Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/cells8101216>
- Thompson, M. A., Prakash, Y. S., & Pabelick, C. M. (2014). Arachidonate-regulated Ca(2+) influx in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 51(1), 68-76. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0144OC>

- Vazquez-de-Lara, L. G., Tlatempa-Romero, B., Romero, Y., Fernandez-Tamayo, N., Vazquez-de-Lara, F., J. M. J.-J., Garcia-Carrasco, M., de-la-Rosa Paredes, R., Cisneros-Lira, J. G., Mendoza-Milla, C., Moccia, F., & Berra-Romani, R. (2018). Phosphatidylethanolamine Induces an Antifibrotic Phenotype in Normal Human Lung Fibroblasts and Ameliorates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *Int J Mol Sci*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092758>
- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., Hu, J., Fleming, I., & Wang, D. W. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 94. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>
- Waters, D. W., Blokland, K. E. C., Pathinayake, P. S., Burgess, J. K., Mutsaers, S. E., Prele, C. M., Schuliga, M., Grainge, C. L., & Knight, D. A. (2018). Fibroblast senescence in the pathology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 315(2), L162-L172. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00037.2018>
- Wijisenbeek, M., & Cottin, V. (2020). Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. Reply. *N Engl J Med*, 383(25), 2485-2486. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2031135>
- Wuyts, W. A., Agostini, C., Antoniou, K. M., Bouros, D., Chambers, R. C., Cottin, V., Egan, J. J., Lambrecht, B. N., Lories, R., Parfrey, H., Prasse, A., Robalo-Cordeiro, C., Verbeken, E., Verschakelen, J. A., Wells, A. U., & Verleden, G. M. (2013). The pathogenesis of pulmonary fibrosis: a moving target. *Eur Respir J*, 41(5), 1207-1218. <https://doi.org/10.1183/09031936.00073012>
- Wynn, T. A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214(2), 199-210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Yeung-Yam-Wah, V., Lee, A. K., & Tse, A. (2012). Arachidonic acid mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and an acidic store in rat pancreatic beta cells. *Cell Calcium*, 51(2), 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.11.012>
- Yu, Q. Y., & Tang, X. X. (2022). Irreversibility of Pulmonary Fibrosis. *Aging Dis*, 13(1), 73-86. <https://doi.org/10.14336/AD.2021.0730>

- Zhang, L., Chi, X., Luo, W., Yu, S., Zhang, J., Guo, Y., Ren, Q., & Zhang, W. (2020). Lung myofibroblast transition and fibrosis is regulated by circ0044226. *Int J Biochem Cell Biol*, 118, 105660. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105660>
- Zheng, X., Zinkevich, N. S., Gebremedhin, D., Gauthier, K. M., Nishijima, Y., Fang, J., Wilcox, D. A., Campbell, W. B., Gutterman, D. D., & Zhang, D. X. (2013). Arachidonic acid-induced dilation in human coronary arterioles: convergence of signaling mechanisms on endothelial TRPV4-mediated Ca²⁺ entry. *J Am Heart Assoc*, 2(3), e000080. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000080>
- Zuccolo, E., Dragoni, S., Poletto, V., Catarsi, P., Guido, D., Rappa, A., Reforgiato, M., Lodola, F., Lim, D., Rosti, V., Guerra, G., & Moccia, F. (2016). Arachidonic acid-evoked Ca(2+) signals promote nitric oxide release and proliferation in human endothelial colony forming cells. *Vascul Pharmacol*, 87, 159-171. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.09.005>
- Zuccolo, E., Laforenza, U., Negri, S., Botta, L., Berra-Romani, R., Faris, P., Scarpellino, G., Forcaia, G., Pellavio, G., Sancini, G., & Moccia, F. (2019). Muscarinic M5 receptors trigger acetylcholine-induced Ca(2+) signals and nitric oxide release in human brain microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol*, 234(4), 4540-4562. <https://doi.org/10.1002/jcp.27234>