

# **PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

## **ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL EN FIBROSIS QUÍSTICA**

### **Licenciatura en Biotecnología**

**Tutor: Valdivieso, Ángel Gabriel, Instituto de Investigaciones  
Biomédicas (BIOMED-UCA-CONICET)**

**Co-Tutor: María Romina Girotti**

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Celular y Molecular**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED, CONICET-  
UCA)**

Fecha

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

## Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Valdivieso, por haberme dado la oportunidad y el espacio para trabajar y desarrollarme profesionalmente. Le agradezco por su paciencia infinita y por haber sido una de las personas que permitió mi desarrollo académico a través de este trabajo.

Al Dr. Tomás Santa Coloma por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y a los diferentes equipos de investigación dentro del Instituto BIOMED por brindar su ayuda y colaboración.

Al Instituto de Investigaciones Biomédica (BIOMED) (y sus subsidiarios UCA y CONICET) por brindarme acceso a las instalaciones y recursos, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

A mi universidad, UADE, por haberme introducido a esta maravillosa carrera y abrirme las puertas a la investigación. A mi directora, Yanina Lujan Petracca y a Federico Prada por su apoyo en el proceso. A mi co tutora, María Romina Girotti por haberme apoyado y brindarme su ayuda en este proceso. A mis profesores, por estar disponibles siempre para brindarme su ayuda y formarme en todos estos años.

A mis padres que me dieron todo el cariño, amor, la fuerza, y me apoyaron en cada uno de mis proyectos y mis metas. A mi familia por apoyarme en cada etapa y paso que he dado.

## Resumen

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad multiorgánica autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *CFTR*. Estas mutaciones generan alteraciones en la actividad de transporte de cloruros generando daños progresivos en varios órganos. Estudios previos han mostrado que la dinámica mitocondrial es llevada a cabo por un grupo de proteínas que conforman la maquinaria de fisión-fusión mitocondrial, cuya regulación determina la morfología de la red mitocondrial. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar aspectos vinculados con la regulación de la dinámica mitocondrial y la existencia de cambios en la morfología mitocondrial asociados a la alteración actividad del CFTR en modelos de fibrosis quística. Para ello, se evaluó la morfología mitocondrial, el potencial de membrana ( $\Psi_m$ ) y los niveles de expresión de las proteínas MFN1 y DRP1 en presencia o ausencia del cóctel de estimulación de AMPc, en células con la mutación característica de FQ (IB3-1) y células donde el CFTR es funcional (S9 y C38). Los resultados obtenidos a partir de la visualización de la morfología mitocondrial mostraron un aumento en la fisión mitocondrial y una disminución de ramificaciones mitocondriales tanto en células IB3-1 como en presencia de los inhibidores del CFTR GlyH101 y CFTR(inh)-172 en células S9 y C38. Asimismo, se observó un aumento en los niveles de expresión de DRP1 junto con la disminución de la expresión de MFN1, acompañando lo observado en la morfología mitocondrial. Con respecto al potencial de membrana, este se encontró disminuido en células IB3-1. Estos resultados podrían sugerir que la actividad CFTR está involucrada en la remodelación o regulación de la morfología mitocondrial, produciendo una fragmentación de la red mitocondrial cuando la actividad del canal se encuentra reducida o alterada.

## Abstract

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive multiorgan disease caused by mutations in the *CFTR* gene. These mutations generate alterations in chloride transport activity leading to progressive damages in several organs. Previous studies have shown that mitochondrial dynamic is carried out by a group of protein that make up the mitochondrial fission-fusion machinery, whose regulation determinates the morphology of mitochondrial network. The aim of this work was to study aspects related to the regulation of mitochondrial dynamics and the existence of changes in mitochondrial morphology associated with altered CFTR activity in cystic fibrosis models. For this purpose, mitochondrial morphology, membrane potential ( $\Psi_m$ ) and protein expression levels of MFN1 and DRP1 in the presence or absence of cAMP stimulation cocktail were evaluated in cells with characteristic CF mutation (IB3-1) and cells where CFTR is functional (S9 and C38). Results obtain from visualization of mitochondrial morphology showed an increasement in mitochondrial fission and a reduction in branching in both IB3-1 and in the presence of the CFTR inhibitors GlyH101 and CFTR (inh)-172 in S9 and C38 cells. Likewise, an increasement in DRP1 expression levels was observed together with a reduction of MFN1 expression, accompanying what was observed in mitochondrial morphology. With respect to membrane potential, this was found decrease in IB3-1 cells. These results could suggest that CFTR activity is involved in the remodelling or regulation of mitochondrial morphology, producing a fragmentation of the mitochondrial network when the activity of the channel is reduced or altered.

# Índice

Agradecimientos .....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	4
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
1.1. Fibrosis quística .....	10
1.2. Diagnóstico de FQ.....	12
1.2.1. Pesquisa neonatal .....	12
1.2.2. Prueba de sudor .....	13
1.2.3. Detección molecular de mutaciones del gen CFTR.....	13
1.2.4. Criterios de diagnóstico de FQ .....	14
1.3. Tratamientos de FQ .....	14
1.4. El canal CFTR.....	17
1.4.1. Gen CFTR .....	17
1.4.2. Estructura de la proteína CFTR.....	19
1.4.3. Clasificación de las mutaciones del <i>CFTR</i> .....	21
1.5. Alteraciones mitocondriales en FQ.....	23
1.6. Morfología y dinámica mitocondrial .....	25
1.6.1. Dinámica mitocondrial .....	27
1.6.2. Fisión mitocondrial.....	29
1.6.3. Fusión mitocondrial.....	32
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
2.1. Hipótesis .....	35
2.2. Objetivo general .....	35
2.3. Objetivos específicos .....	35
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
3.1. CULTIVOS CELULARES .....	36
3.1.1. Líneas celulares .....	36
3.1.2. Congelamiento de células .....	37
3.1.3. Descongelamiento de células.....	38
3.1.4. Subcultivo y tratamiento de las células.....	38
3.2. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL .....	38
3.2.1. Marcación mitocondrial con la sonda fluorescente MitoTracker Orange .....	38

3.2.2.	Análisis de la Morfología mitocondrial en presencia de inhibidores .....	39
3.2.3.	Cuantificación de mitocondrias mediante el programa de computación MiNA.	41
3.2.4.	Cuantificación de subtipos mitocondriales mediante el programa de computación Micro-P .....	42
<b>3.3.</b>	<b>ANÁLISIS DE PROTEINAS MEDIANTE WESTERN BLOT .....</b>	<b>42</b>
3.3.1.	Extracción de proteínas.....	42
3.3.2.	Electroforesis y transferencia de proteínas .....	43
3.3.3.	Inmunodetección de proteínas por Western blot .....	43
<b>3.4.</b>	<b>ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA (<math>\Psi_m</math>).....</b>	<b>45</b>
3.4.1.	Medición del potencial de membrana con la sonda JC-1 .....	45
3.4.2.	Medición del potencial de membrana con la sonda TMRE.....	46
<b>3.5.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1.	La morfología mitocondrial se encuentra alterada en modelos celulares de fibrosis quística .....	49
4.2.	La inhibición de la actividad del CFTR induce fragmentación de la red mitocondrial.....	54
4.3.	Estudio de la expresión de proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial en modelos de fibrosis quística.....	60
4.4.	Estudio de la existencia cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) en los modelos utilizados para el estudio de fibrosis quística.....	64
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
5.1.	Modulación de la morfología mitocondrial mediada por el canal CFTR	67
5.2.	Estudio de la expresión de proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial en modelos FQ .....	69
5.3.	Potencial de membrana mitocondrial en modelos de FQ.....	70
5.4.	Perspectivas sobre el estudio de la dinámica mitocondrial en FQ .....	72

## Abreviatura

<b>AA</b>	aminoácido
<b>ABC</b>	familia de proteínas transportadoras ATP-binding cassette
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNmt</b>	ADN mitocondrial
<b>AMPc</b>	adenosín monofosfato cíclico
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	adenosín trifosfato
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>BSE</b>	“bundle signalling elements”
<b>CCV</b>	Consecuencias clínicas variables
<b>CCCP</b>	carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
<b>CDK1</b>	quinasa dependiente de ciclina 1
<b>CFMD</b>	“Cystic Fibrosis Mutation Database”
<b>CFTR</b>	“Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator”
<b>CIm</b>	Complejo I mitocondrial
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloruro
<b>CL</b>	cardiolipina
<b>c-Src</b>	protein-tyrosine kinase c-src
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>DNM2</b>	“dynamin 2 protein”
<b>DRP1</b>	“dynamin-related/like protein 1”
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EYFP</b>	“Enhanced yellow fluorescent protein”

<b>ΔF508</b>	mutación del residuo fenilalanina 508
<b>FCCP</b>	cianuro de carbonilo 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
<b>FQ</b>	Fibrosis Quística
<b>GED</b>	“GTPase effector domain”
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>GTPasa</b>	Guanosina trifosfatasa
<b>HR</b>	Regiones repetidas
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante (“horeseradish peroxidase”)
<b>IL-1β</b>	interleuquina-1 beta
<b>JC-1</b>	yoduro de tetraetilbencimidazolilcarbocianina
<b>Kb</b>	kilobases
<b>kDa</b>	KiloDaltons
<b>MFF</b>	“mitochondrial fission factor”
<b>MFN</b>	mitofusina
<b>MME</b>	membrana mitocondrial externa
<b>MMI</b>	membrana mitocondrial interna
<b>MSD</b>	Dominio transmembrana
<b>NBD</b>	dominio de unión a nucleótidos
<b>NGS</b>	“Next Generation Sequencing”
<b>OPA1</b>	“optic atrophy 1 protein”
<b>PCR</b>	“Polymerase Chain Reaction”
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>PKA</b>	proteína quinasa A
<b>PKC</b>	proteína quinasa C



<b>RE</b>	retículo endoplasmático
<b>ROS</b>	“reactive oxygen species” (especies reactivas de oxígeno)
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TBS</b>	Tris buffer salino
<b>TIR</b>	tripsinógeno inmunorreactivo
<b>TMRE</b>	tetrametilrodamina metil etil éster
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor - alfa
<b>VDAC1</b>	canales de aniones dependientes de voltaje 1
<b>VI</b>	Vía intravenosa
<b>VO</b>	Vía oral
<b>WB</b>	Western Blot
<b><math>\Psi_m</math></b>	potencial de membrana mitocondrial

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Fibrosis quística

La FQ es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población de origen europea, caracterizada por el transporte deficiente de iones cloruros como consecuencia de las mutaciones en el gen *CFTR* que codifica para un canal de cloruro (siglas en inglés para “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, en español Regulador de la Conductancia Transmembrana de la Fibrosis Quística). Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud ([https://www.who.int/genomics/publications/en/HGN\\_WB\\_report.pdf](https://www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_report.pdf)), su incidencia global es de 1 de cada 2500 recién nacidos. Sin embargo, esta incidencia varía según la población y su origen étnico. En Europa se ha reportado una incidencia de 1:2000 a 1:3000, mientras que en poblaciones con menor porcentaje de caucásicos su incidencia es menor, tal como en África (1: 7508) y Asia (1:40.000 a 1:100.000). En Latinoamérica se ha registrado una incidencia que va de 1:3900 a 1:9600 neonatos y 1:6000 recién nacidos en la Argentina (Ribeiro Ferreira da Silva Filho, Zampoli, Cohen-Cymberknoh, & Kabra, 2020).

La FQ afecta principalmente pulmones, páncreas, intestino, hígado, aparato reproductor y glándulas sudoríparas (Strausbaugh & Davies, 2007) (Goetz & Ren, 2019). Los síntomas más comunes de esta enfermedad son sudoración salada, tos persistente, infecciones pulmonares frecuentes, neumonías, bronquitis, incapacidad de ganar peso y respiración corta. Si bien la principal causa de muerte en estos pacientes es el daño pulmonar crónico y progresivo, el 85% de los infantes con FQ desarrollan insuficiencia pancreática exocrina; esto es causado por la formación de mucus que impide la liberación de enzimas encargadas en la absorción de nutrientes. Para evitar la malnutrición debida a problemas de absorción de nutrientes e insulino-deficiencias, los pacientes requieren un tratamiento de por vida con una dieta hipercalórica, la administración de enzimas pancreáticas y vitaminas liposolubles. La tasa de expectativa de vida de estos pacientes va entre los 30 y 40 años (<https://www.cysticfibrosis.org.uk>) con los tratamientos adecuados

diseñados para contrarrestar los síntomas, que van desde nebulizaciones para disolver el mucus y antibióticos para controlar las infecciones pulmonares (*Pseudomona auriginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Staphilococcus aureus*) (Cuthbertson et al., 2020).

La FQ fue descrita por primera vez como una enfermedad genética recesiva en 1949 por los investigadores Lowe y May. En 1972, Irena Antonowicz realizó un estudio de las enzimas mitocondriales y lisosomales provenientes de células linfocitarias de pacientes con FQ (Antonowicz, Sippell, & Shwachman, 1972), donde observó que la enzima lisosomal  $\alpha$ -glucosidasa, encargada de la degradación del glicógeno, se encontraba modificada. Este dato sugería que la FQ podría tratarse de un desorden lisosomal. A fines de la década del 70, Shapiro y Feigal reportaron la presencia de alteraciones en las mitocondrias de células provenientes de pacientes FQ (Shapiro, Feigal, & Lam, 1979). En ese mismo año, descubrieron alteraciones en el consumo de oxígeno asociado a la alteración de la cadena respiratoria y en el pH óptimo del Complejo I mitocondrial (CI<sub>m</sub>) (Feigal & Shapiro, 1979) por lo que sugerirían que el gen afectado en la FQ podría encontrarse en la secuencia codificante de una de las proteínas de dicho complejo. Mientras, en la década del 80, Quinton y col (Quinton, 1983) reportaron un aumento de los iones Cl<sup>-</sup> en células provenientes de glándulas sudoríparas en pacientes con FQ, lo que sugería la existencia de un defecto en el transporte de electrolitos en la membrana plasmática. Sin embargo, en 1989 y mediante la técnica de clonado posicional, Riordan y col (Riordan et al., 1989) descubrieron que el gen mutado en FQ era el *CFTR*. En 1991, se demostró que el CFTR es un canal de transporte de Cl<sup>-</sup> regulado por AMPc (Anderson et al., 1991) y sus mutaciones fueron clasificadas a nivel molecular (Welsh & Smith, 1993). Estos avances contribuyeron a una mayor comprensión de esta patología y aportaron nuevas herramientas para el diseño de nuevas terapias.

## **1.2. Diagnóstico de FQ**

La evaluación de la disfunción del CFTR es fundamental para definir el diagnóstico de la enfermedad. Según el Registro Nacional de Fibrosis Quística (RENAFQ) y la Sociedad Argentina de Pediatría (SAP), hasta 2018 se encontraron 1159 casos confirmados, la mayoría por la prueba del sudor y por análisis molecular. En el 79% de los casos se detectó la presencia de la delección de la fenilalanina 508 ( $\Delta F508$ ) con expresión homocigota y con menor frecuencia las mutaciones G542x, R334W, N1303K y G85E (Castaños et al., 2021).

### **1.2.1. Pesquisa neonatal**

La pesquisa neonatal se trata de estudios para la detección temprana de enfermedades genéticas y reducir mortalidad infantil. Este método de diagnóstico consiste en la medición de tripsinógeno inmunorreactivo (TIR), un precursor pancreático de la tripsina, cuya concentración se encuentra elevada en recién nacidos con FQ respecto a los sanos. La detección de niveles elevados de TIR a partir de sangre de recién nacidos con FQ fue descrita por primera vez en 1979 por los investigadores Crossle y col (Crossle, Elliot, & Smith, 1979). Para ello, se procede a extraer la muestra mediante la técnica de Guthrie dentro de la primera semana de vida. Una vez realizada la extracción, se deja secar parte de la muestra en discos de papel de filtro. Existen diferentes protocolos para la detección de TIR mediante la utilización de anticuerpos específicos que se utilizan actualmente para la detección: la medición de TIR asociada a la pancreatitis (TIR/PAP), la medición de TIR asociada al ADN (TIR/ADN) o la medición en tándem de TIR (TIR/TIR) (Castellani, Massie, Sontag, & Southern, 2016). En esta última se realiza un segundo ensayo entre las 2 y 3 semanas de vida. Luego, se realiza un análisis mediante algoritmos que permite detectar la concentración del tripsinógeno. Se confirma FQ cuando la concentración de TIR es mayor o igual a 50 ng/ml en ambos ensayos.

### 1.2.2. Prueba de sudor

La prueba de sudor de Gybson y Cooke (L. E. Gibson & Cooke, 1959), consiste en cuantificar la cantidad de electrolitos que se encuentran presentes en el sudor por medio de iontoforesis. Se trata de una de las pruebas más importantes para confirmar el diagnóstico ante un resultado de pesquisa neonatal positivo o algún antecedente familiar de FQ. Este método de diagnóstico consiste, en primer lugar, en estimular la secreción de sudor en una pequeña superficie de la piel del brazo o de la pierna del paciente con pilocarpina, donde se colocan electrodos que conducirán una pequeña corriente eléctrica para permitir la impregnación de la droga. El sudor producido es recolectado en un papel de filtro que se coloca sobre la zona de la piel estimulada y se analiza la concentración de cloruros a partir de la técnica de Schales-Schales (Schales & Schales, 1941). Esta técnica consiste en agregar una solución de nitrato mercúrico y un indicador (difenilcarbazona) a la muestra de sudor con cloruros. La concentración se determina en función a la formación de precipitado de cloruro mercúrico. Aunque es improbable tener FQ en el rango de cloruros normal (menos de 30 mmol/l), existen mutaciones en el gen como la c.3717 + 12191C>T que generan valores bajos de cloruro en sudor. Por esta razón, este método de diagnóstico es complementado con otros. Este estudio se debe repetir a los 2 meses de edad y a los 6-12 meses de edad para monitorear la enfermedad.

### 1.2.3. Detección molecular de mutaciones del gen CFTR

Otro mecanismo utilizado para el diagnóstico de FQ es la detección molecular del gen *CFTR*. Este mecanismo consiste en tres pasos sucesivos cuyo objetivo es hallar mutaciones causantes de FQ. El primer paso consiste en la detección de las mutaciones más frecuentes en la población; esto se debe realizar teniendo en cuenta la clasificación de mutaciones de la base de datos CFTR2 (<http://www.cftr2.org>). Se utiliza la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que permite identificar la presencia de estas variantes, en especial la mutación F508 a partir de cebadores específicos. También se utiliza la secuenciación NGS ("Next Generation Sequencing") que a diferencia de la PCR, la detección de mutaciones frecuentes es más sensible

ya que permite la detección simultánea de variantes de un solo nucleótido y/o deleciones largas en uno o múltiples exones (Bergougnoux, Taulan-Cadars, Claustres, & Raynal, 2018).

En caso de que no se detecte ninguna de las mismas, se procede a realizar un escaneo de las 27 regiones codificantes del gen *CFTR* a partir de NGS (“Next Generation Sequencing”) para identificar variantes raras presentes en los intrones. Estas variantes suelen afectar la estructura, el tamaño y la estabilidad de la secuencia del transcripto. Si aún no se detecta ninguna variante causante de FQ, se procede a la identificación de variantes dentro de regiones regulatorias. Estas variantes alteran la expresión de la proteína y para la detección de las mismas, se utiliza la secuenciación completa del locus mediante NGS y/o estudios topológicos del dominio R (Moisan et al., 2016).

#### **1.2.4. Criterios de diagnóstico de FQ**

Se han establecido diversos criterios y pasos a seguir para el diagnóstico de FQ. Resumidamente, en primer lugar debe dar positivo en la pesquisa neonatal, seguido por la confirmación mediante la determinación de cloruro en el test de sudor (mayor o igual a 60 mmol/l) o identificando 2 mutaciones causantes de FQ en trans y concentración de cloruros mayor a 30 mmol/l (Farrell et al., 2017). Se establece que es probable que el paciente tenga FQ cuando los valores de cloruro estén en el rango de 30-59 mmol/l en dos determinaciones diferentes. Para confirmar que el paciente tiene FQ, se debe realizar un estudio extendido de mutaciones de *CFTR* mediante secuenciación y/o análisis funcional de *CFTR* (DPN o MCI). No obstante, todos los pacientes con FQ deben ser tipificados genéticamente, incluso si el diagnóstico fue confirmado a partir de la prueba de sudor o mediante análisis de ADN (Castaños et al., 2021).

### **1.3. Tratamientos de FQ**

En la actualidad, la FQ se trata de una enfermedad incurable en la que los diferentes tratamientos tienen como objetivo mejorar la calidad de vida de los pacientes y frenar el progreso de la enfermedad. Dichos

tratamientos en general son planificados en base a las necesidades y complicaciones de cada paciente.

Uno de los tratamientos utilizados involucra el despeje de las vías respiratorias que consiste en la fisioterapia, ejercicio físico y técnicas de respiración seguidas de nebulización con solución hipertónica. De esta manera, se mejora la función pulmonar al remover las secreciones viscosas en el tracto respiratorio en donde se acumulan microorganismos. En el caso de que el paciente tenga un cuadro severo, debe administrarse antibióticos por vía oral (VO) o por vía intravenosa (VI) seguido de nebulizaciones. Se utiliza el tratamiento con antibióticos para prevenir infecciones crónicas cuando más de la mitad de los cultivos dan positivo para un tipo particular de microorganismo. Dichas infecciones deben ser tratadas con antibióticos de amplio espectro seguido de la administración de amoxicilina + ácido clavulánico en una sola dosis para disminuir la toxicidad (Castaños et al., 2021). Sin embargo, este tratamiento con antibióticos es diseñado en función al microorganismo causante de la infección (Tabla 1).

<b>Patógeno</b>	<b>Tratamiento del Primer Aislamiento</b>	<b>Tratamiento en caso de reincidencia</b>	<b>Tratamiento en pacientes clínicamente comprometido</b>
<b><i>Staphilococcus aureus metilicino sensible</i></b>	Amoxicilina + ácido clavulánico (VO) durante 2 a 4 semanas.	Cefalexina (VO) por 2 a 4 semanas.	Cefalotina o menopenem + amikacina (VI) o teicoplanina (VI) durante 14 días.
<b><i>Staphilococcus aureus metilicino resistente</i></b>	Rifampicina (VO) + TMP-SMX durante tres semanas + baños de clorheximidina al 4% durante 2 semanas	Vancomicina nebulizada por un mes + rifampicina (VO) y TMP-SMX	Se trata con tigeclicina (VI) + vancomicina (VI) o teicoplanina (VI) por 14 días.
<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>	Amoxicilina/ ácido clavulánico (VO) por 4 semanas combinado con azitromicina (VO) o claritromicina (VO)	Amoxicilina/ ácido clavulánico VO) por 2 a 4 semanas	Ceftazidima (VI) + amikacina (VI) durante 14 días.
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	Ciproxacina (VO) por 3 semanas + colistimetato sódico inhalado cada 12 horas por 3 meses	Ciproxacina (VO) por 3 semanas + colistimetato sódico inhalado cada 12 horas por 3 meses	Ceftazidima (VI) + amikacina (VI) por 2 semanas y tobracina por 1 mes

<b><i>Burkholderia cepacia</i></b>	TMP-SMX (VO) por 4 semanas	TMP-SMX (VO) por 4 semanas	Tratamiento combinado (ceftazidina, menopenem, tobracina, aztreonam, fosfomicina-tobracina) por 14 días
<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	TMP-SMX (VO) por 3 semanas	TMP-SMX (VO) por 3 semanas	TMP-SMX (VO) por 3 semanas
<b><i>Achromobacter xyloxidans</i></b>	TMP-SMX (VO) por 4 semanas o colistidina inhalada por 3 meses	TMP-SMX (VO) por 4 semanas o colistidina inhalada por 3 meses	Colistina (VI) o TMP-SMX (VI) por 2-3 semanas

**Tabla 1. Tratamiento con antibiótico según el tipo de patógeno** (Castaños et al., 2021)

En cuanto al tratamiento de la insuficiencia pancreática, los pacientes deben recibir suplementos de vitaminas A, D, E, K y zinc, seguida de una dieta estricta para aportar nutrientes.

Recientemente, se han desarrollado terapias cuyo objetivo es corregir el mal funcionamiento del CFTR. A estas terapias se las denominan *terapias modulatorias* y se las utiliza en conjunto con los tratamientos convencionales mencionados anteriormente. Estas terapias modulatorias se clasifican según su mecanismo como terapias potenciadoras o correctoras (Quintana-Gallego, Delgado-Pecellín, & Acuña, 2014). Las terapias potenciadoras mejoran la apertura del canal de CFTR para incrementar el transporte de Cl<sup>-</sup> cuando la proteína está insertada en la membrana apical. Para ello se utilizan fármacos como el ivacaftor que son utilizados para modular la función del CFTR anormal (Sermet-Gaudelus, 2013). Mientras que las terapias correctoras actúan mejorando el tráfico intracelular de la proteína desde el retículo endoplasmático hacia la membrana. Un fármaco usado en la terapia correctora es el tezacaftor, el cual está indicado para contrarrestar los efectos de la mutación  $\Delta F508$ , reduciendo al 35% las excreciones respiratorias (Sala & Jain, 2018). Otro fármaco corrector es el lumacaftor, el cual está indicado para el tratamiento de mutaciones de clase II.

El trasplante de pulmón se utiliza como tratamiento cuando ya el daño pulmonar es muy severo (Valdivieso & Santa Coloma, 2013). No obstante, luego de múltiples infecciones con *P. auriginosa*, esta tiende a volverse



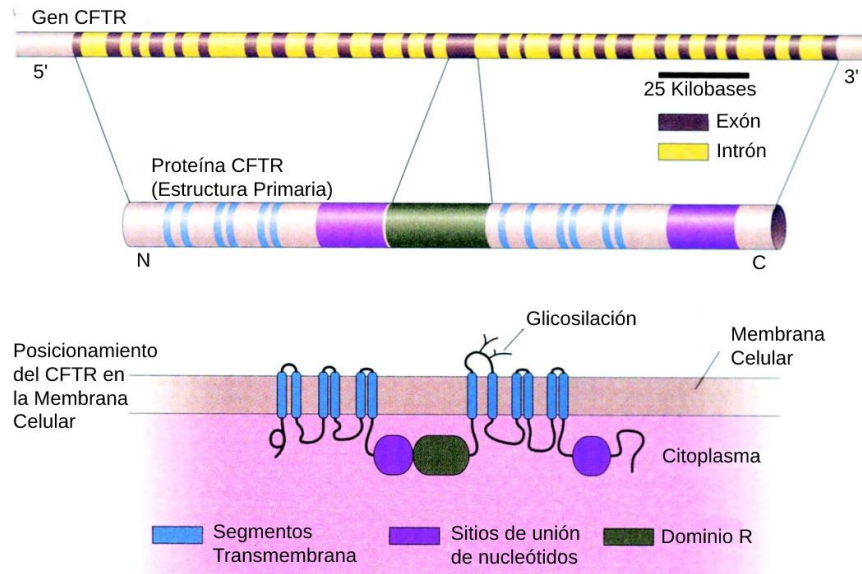
resistente a los antibióticos debido a la formación de “films” bacterianos en la pared del epitelio pulmonar que dificultan combatirlo con antibióticos generales (Granchelli et al., 2018). Recientemente, se han desarrollado nuevos fármacos terapéuticos que permiten corregir, al menos parcialmente, la mutación G551D en el gen *CFTR* como el ivacaftor (Kalydeco <sup>TM</sup>; VX-770). Asimismo, se han desarrollado tratamientos como el fármaco Orkambi® (ivacaftor y lumacaftor) aprobada por el FDA en 2015, el fármaco Symkevi® (ivacaftor y tezacaftor) y la terapia triple TriKAFTA (elexacaftor, tezacaftor e ivacaftor) para tratar la mutación heterocigota F508del (Balfour-Lynn & King, 2020).

## 1.4. El canal CFTR

El CFTR fue descubierto por Riordan y Col (Riordan et al., 1989) mediante la técnica de clonado posicional. Posteriormente, se describió que era un canal de iones  $Cl^-$  dependiente de AMPc (Anderson et al., 1991). Además del transporte de iones  $Cl^-$ , este canal ha sido asociado con el transporte de bicarbonato (H. C. Chan et al., 2006) y glutatión (Kogan et al., 2003), aunque existen algunas controversias sobre estas funciones. La importancia de este canal parecería que va más allá de su función como canal de  $Cl^-$  ya que los cambios en la actividad de esta proteína se han asociado a diversos procesos celulares, como por ejemplo modulación de genes (Valdivieso et al., 2007), la modulación de la apoptosis (Kim et al., 1999), la proliferación (Bellec et al., 2015), el pH extracelular (Yamamoto & Ehara, 2006) (Massip-Copiz & Santa-Coloma, 2018), cambios mitocondriales (Valdivieso & Santa Coloma, 2013) y autofagia (Maiuri et al., 2019).

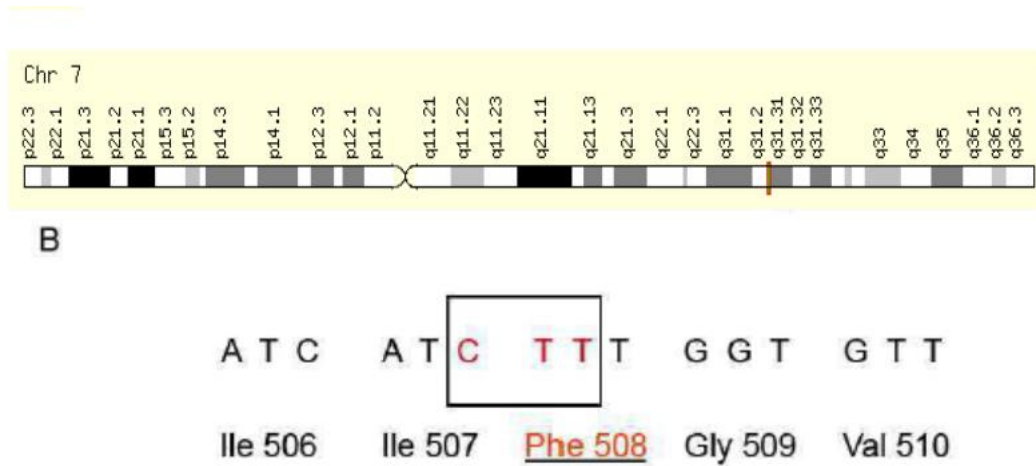
### 1.4.1. Gen CFTR

El gen codificante de la proteína CFTR (Riordan et al., 1989), se encuentra presente en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31), cuyo locus tiene un tamaño de 250 kilobases (kb) organizado en 24 exones y un transcrito maduro de 6,5 kb (Figura 1).



**Figura 1. Representación gráfica del gen CFTR, la estructura primaria de la proteína CFTR y el posicionamiento del CFTR en la membrana** (R. L. Gibson, Burns, & Ramsey, 2003).

Actualmente, existen más de 2100 mutaciones posibles identificadas por la “Cystic Fibrosis Mutation Database” (CFMD) ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca)), incluyendo deleciones, mutaciones sin sentido, en el marco de lectura, entre otras. Sin embargo, la deleción de 3 pares de bases resultante de la pérdida de la fenilalanina en la posición 508 de la secuencia proteica del CFTR ( $\Delta F508$ ) tiene una frecuencia del 70% de las personas que padecen esta enfermedad (Figura 2).



**Figura 2. Ubicación del gen CFTR y la mutación más frecuente  $\Delta F508$ .** (A) Esquema de la ubicación del gen CFTR en el brazo largo cromosoma 7 humano. (B) Características de la mutación  $\Delta F508$ , la mutación más frecuente del CFTR, donde se resalta las bases delecionadas. (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CFTR&search=CFTR>)

#### 1.4.2. Estructura de la proteína CFTR

La proteína CFTR es una glicoproteína integral de membrana de 1480 aminoácidos, cuya masa molecular es de 168 KiloDaltons (kDa), localizada en la región apical de las células epiteliales. La principal función del CFTR es el transporte activo de iones cloruros, aunque en los últimos años se lo ha encontrado asociado además al transporte de iones bicarbonato (H. C. Chan et al., 2006) y glutatión (Kogan et al., 2003). Además de su función en el transporte de iones, la actividad de este canal se encuentra asociada con la homeostasis de las sales disueltas en la superficie de las células epiteliales (Kunzelmann, 2003), la acidificación de organelas intracelulares (Haggie & Verkman, 2009) y la regulación de canales ATP (Sugita, Yue, & Foskett, 1998).

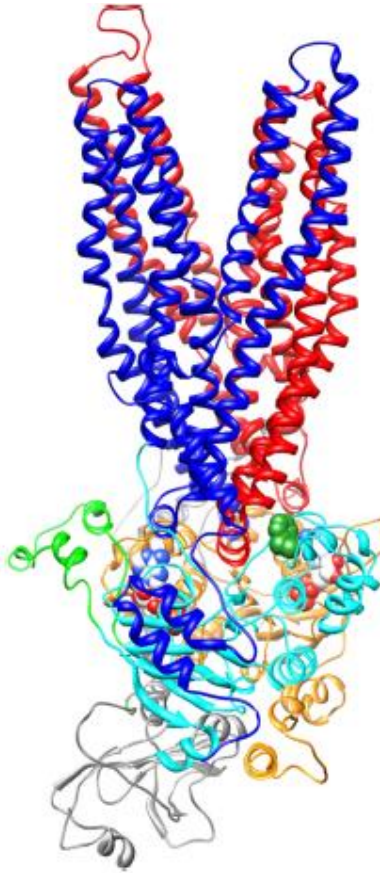
El canal CFTR pertenece a la superfamilia de proteínas transportadoras ABC (ATP Binding Casser) (Holland, Cole, Kuchler, & Higgins, 2003). Sin embargo, el CFTR se diferencia de otros transportadores ABC en que su actividad es regulada por AMPc (Anderson et al., 1991). Este canal se encuentra insertado en la membrana plasmática gracias a dos dominios transmembrana (MSD1 y MSD2). Cada dominio MSD consiste en 6 hélices hidrofóbicas que forman el poro en la membrana plasmática. A su vez, posee 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) compuestos por 150 aminoácidos (AA) cada uno (Rowe & Clancy, 2006). En estos dominios se hidroliza ATP para brindar la energía necesaria para producir la apertura del canal. Sin embargo, dicha apertura se produce cuando el dominio regulatorio intracitoplasmático (dominio R) es activado por la proteína quinasa A (PKA), dependiente de AMPc. Este dominio R, codificado por un solo exón, posee numerosos residuos (69 de los 241 AA) arreglados en grupos alternados de cargas positivas y negativas (Sheppard & Welsh, 1999). De estos sitios, 9 de cada 10 son secuencias consenso para la fosforilación por PKA. Su actividad dependiente de AMPc es una característica distintiva del CFTR respecto a

otros canales cloruros. En menor medida, la actividad del canal puede ser regulada por otras quinasas como PKC (Chappe et al., 2003), c-Src (Massip-Copiz, Clauzure, Valdivieso, & Santa-Coloma, 2017), interferon- $\gamma$  (Besancon et al., 1994), TNF- $\alpha$  (Bitam et al., 2015) y progesterona (Mularoni, Beck, Sadir, Adessi, & Nicollier, 1995) capaces de disminuir la expresión del CFTR. Además, existen moléculas capaces de modular los niveles de AMPc, como la epinefrina, el isoproterenol, el carbachol y proteína G, capaces de inducir indirectamente la activación (Allan et al., 1990).

La actividad transportadora de CFTR está controlada por la unión e hidrólisis de ATP en el sitio 2, generando el armado y el desarmado del dímero NBD. Durante el ciclo de transporte, el sitio de unión de ATP NBD1 permanece firmemente cerrado alrededor de una gran cantidad de moléculas de ATP, mientras que el sitio de unión de ATP NBD2 sufre cambios conformacionales, cerrándose después de la unión de una molécula de ATP para formar el dímero NBD, pero abriéndose nuevamente después de la escisión de ATP para liberar los productos de la hidrólisis de ATP. Esta reorganización dinámica permite controlar el flujo de iones cloruros. En el modelo estructural, el MSD1 está compuesto de dos extensiones largas  $\alpha$ -hélice de segmentos transmembrana con la intervención de una  $\alpha$ -hélice corta (denominada hélice de acoplamiento) en su ubicación más citoplasmática orientada paralela al plano de la membrana (Mornon, Lehn, & Callebaut, 2008) (Figura 3). A su vez MSD1 se comunica con los NBDs por interacción directa con los sitios de unión de ATP.

La delección de 3 pares de bases en la secuencia del gen *CFTR*, que causa la pérdida de la fenilalanina en la posición 508 ( $\Delta F508$ ), se encuentra localizada en el primer NBD, entre los dos segmentos más conservados de la secuencia. A pesar de la simetría en ambos motivos de la proteína y la secuencia conservada de NBD, la identidad entre estos dos motivos es modesta en comparación con las secuencias en el extremo carbonilo del NBD. De los 66 residuos asociados a estas regiones, el 27% de ellos son idénticos y 11% son similares entre sí. No obstante, la maduración del CFTR salvaje también puede ser ineficiente ya que más del 70% de las moléculas

inmaduras no alcanzan el estado de maduración debido a la escasa formación de complejos de oligosacáridos.



**Figura 3. Modelo molecular del canal de Cl de CFTR.** El dominio 1 que atraviesa la membrana (MSD1) está coloreado de azul; dominio 1 de unión a nucleótidos (NBD1), cian; MSD2, rojo; NBD2, ámbar y el dominio regulatorio (RD), gris; La inserción reguladora de NBD1 es de color verde (Lewis et al., 2004). Se muestran la posición de F508 (verde) y los nucleótidos unidos al dímero NBD (carbono, blanco; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo; fósforo, naranja).



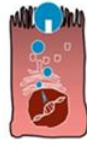
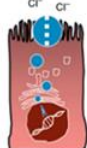


### 1.4.3. Clasificación de las mutaciones del *CFTR*

Las mutaciones del CFTR son clasificadas según su mecanismo de disfunción (Tabla 2), donde las de Clase I, II y III generan los fenotipos más severos debido a una escasa o nula actividad del CFTR:

- **Clase I:** mutaciones en el marco de lectura. Son mutaciones sin sentido que generan señales prematuras de terminación y bloquean la síntesis proteica

debido a una degradación acelerada del ARNm. Como resultado, estas proteínas truncadas no llegan a la membrana. La frecuencia de estas mutaciones sin sentido es del 8%.

- **Clase II:** estas mutaciones están caracterizadas por el procesamiento deficiente del CFTR que resulta en la ausencia de proteínas funcionales en la membrana plasmática. El ejemplo de este tipo de mutación es la  $\Delta F508$ , localizada en el dominio NBD1, que genera una proteína mal plegada, inmadura y poco estable. Esta proteína mal plegada es reconocida por mecanismos de control de calidad seguido del marcado de la misma con ubiquitina y degradada por el proteosoma (Farinha et al., 2013).
- **Clase III:** estas mutaciones producen un CFTR bien procesado y estable, que es transportado a la membrana. Estos canales expresados no tienen fallas en las propiedades de conducción. Sin embargo, la regulación de la actividad si se encuentra afectada, lo que provoca una disminución en la activación del canal. Un ejemplo es la mutación G551D que afecta la interacción entre el sitio de unión de ATP 1 y 2.
- **Clase IV:** estas mutaciones están caracterizadas por la perturbación del flujo de aniones a través del CFTR. En estas mutaciones, el CFTR se procesa correctamente y genera corrientes de cloruros estimuladas por AMPc, aunque su magnitud es muy reducida en comparación con el CFTR de tipo salvaje (Sheppard et al., 1993).
- **Clase V:** mutaciones en la secuencia promotora. Estas mutaciones provocan una disminución de la expresión del CFTR. Dichas mutaciones alteran la transcripción, generan transcritos alterados del CFTR (ejemplo 3849 + 10kb C→T) y sustituciones de aminoácidos (A455E) que causan una maduración poco eficiente de la proteína (Zielenski & Tsui, 1995).
- **Clase VI:** estas mutaciones generan la disminución de la estabilidad del CFTR en la membrana plasmática (Haardt, Benharouga, Lechardeur, Kartner, & Lukacs, 1999), como la mutación Q1412X que trunca 70 aminoácidos del CFTR. Esto genera una proteína similar en sus propiedades a la salvaje, pero con una estabilidad reducida.

	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V	Clase VI
<b>Descripción</b>	Proteína CFTR no funcional (síntesis truncada)	Proteína CFTR poco funcional	Defecto en la regulación del transporte cloruros	Defecto de la conductancia del canal de cloruros con alguna funcionalidad del CFTR	Cantidad disminuida de proteína CFTR funcional	Disminución de la estabilidad de la proteína CFTR
<b>Ejemplos</b>	G542X, R1162X, R552X, W1282X, T128X, A553X	ΔF508, N1303K, 1507 del	G551D, G551S, G1349D, V520F	R117H, R347P, R334W	3849+10kb -> 2789+5G -> A455E	N287Y
						

**Tabla 2. Clasificación y descripción de las mutaciones en el CFTR** (Quintana-Gallego et al., 2014)

La base de datos CFTR2 (<https://cftr2.org/>), un análogo de la base de datos CFMD ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca)), permite evaluar la severidad de la enfermedad en función de las diversas mutaciones analizadas y las clasifica en: causantes de FQ, de consecuencias clínicas variables (CCV), de consecuencias desconocidas y no causante de FQ. Para que se dé la enfermedad, es necesaria la detección de dos mutaciones causantes de FQ en trans o al combinarse una mutación causante de FQ con una mutación CCV.

### 1.5. Alteraciones mitocondriales en FQ

La primer evidencia de alteraciones mitocondriales relacionados con la FQ fue durante la década de los 70s, donde se demostró que la tasa de consumo de oxígeno se encontraba afectada debido a alteraciones en el complejo I y ATPasas (Shapiro et al., 1979) (Feigal & Shapiro, 1979). En 1986, se reportaron casos de pacientes con FQ con alteraciones en la citocromo c oxidasa (Battino, Rugolo, Romeo, & Lenaz, 1986) y la deshidrogenasa 6-fosfato (Congdon, Aggarwal, Littlewood, & Shapiro, 1981).

En este Laboratorio se estudió la expresión diferencial de genes en FQ mediante la técnica de “differential display”, donde se demostró que el gen *MT-ND4* (Valdivieso et al., 2007) y *C1SD1* (Taminelli et al., 2008) presentaban una expresión reducida en células FQ. El gen mitocondrial *MT-ND4* codifica la subunidad 4 de NADH ubiquinona oxidorreductasa en el Complejo I mitocondrial (CI<sub>m</sub>) y su expresión es fundamental para el correcto ensamblado del CI<sub>m</sub> (Valdivieso et al., 2007). Esto permitió corroborar posteriormente que la actividad del CI<sub>m</sub> se encontraba reducida en células con fenotipo FQ (Valdivieso et al., 2012) y un posible rol de IL-1 $\beta$  en esta regulación (Clauzure et al., 2014). Por otra parte, *C1SD1* es un gen que codifica una proteína de la familia CDGSH que se une a un grupo de 2Fe-2S coordinado por 3 cisteínas y una histidina (Wiley, Rardin, & Dixon, 2009). Asimismo, Wiley y col. reportaron la localización de esta proteína sobre la membrana mitocondrial externa (MME) mediante microscopía electrónica. Paralelamente, Taminelli y col. caracterizaron la localización mitocondrial de *C1SD1* mediante microscopía confocal. La expresión reducida de *C1SD1* podría estar vinculada con la regulación de la cadena respiratoria (Taminelli et al., 2008), aunque se requieren más estudios para determinar su rol en FQ. Recientemente, diversos estudios sugieren que el consumo de oxígeno, la actividad del CI<sub>m</sub>, el potencial de membrana y la fosforilación oxidativa se encuentran desregulados en células FQ (Rossi, Morelli, Galietta, & Colin, 2019) (Vendrusculo, Heinzmann-Filho, da Silva, Ruiz, & Donadio, 2019).

Otros defectos mitocondriales han sido también observados en FQ, como son el patrón de expresión de proteínas mitocondriales (Valdivieso, 2019), el pH intracelular (Chen, Cai, & Sheppard, 2009) y la alteración de la vía de señalización mitocondrial del Ca<sup>2+</sup> (Madácsy, Pallagi, & Maleth, 2018) (Rimessi, Bezzetti, Paternani, et al., 2015), muchos de ellos asociados a la estimulación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación de la membrana lipídica (Turrens, 2003). Además, se han encontrado bajos niveles de glutatión reducido mitocondrial (mtGSH) y defectos en el transporte de GSH en células que tienen un “knock-out” del CFTR, resultando en la oxidación del GSH (Kelly-Aubert et al., 2011). La reintroducción de un CFTR funcional restaura los niveles de mtGSH, atenuando



la despolarización mitocondrial y la secreción de IL-8 (Patergnani, Vitto, Pinton, & Rimessi, 2020).

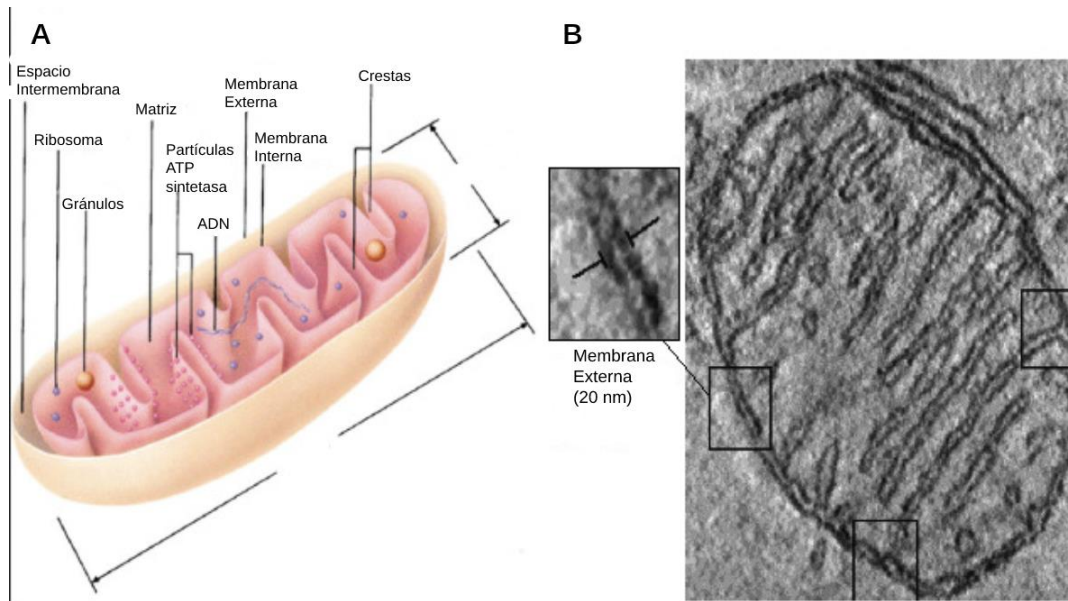
Por otra parte, existen alteraciones mitocondriales que están asociadas a la reincidencia de infecciones bacterianas. Esto se debe a que las infecciones bacterianas afectan las mitocondrias al causar una disminución en el potencial de membrana y la fragmentación mitocondrial para evadir la inmunidad del hospedador (Tiku, Tan, & Dikic, 2020). Las células epiteliales del tracto respiratorio y las células del sistema inmune son sensibles a los patógenos tras infecciones consecutivas activando respuestas de estrés mitocondrial y preservando la homeostasis. Rimessi y col. (Rimessi, Bezzerri, Patergnani, et al., 2015) han reportado que la exposición a *P. aeruginosa* induce la fragmentación mitocondrial, producción aumentada de  $O_2^-$  y la activación del receptor NLRP3. De este modo, se han reportado alteraciones mitocondriales en células FQ tanto en presencia como ausencia de infecciones bacterianas, lo que genera la interrogante sobre si la falla del CFTR predispone a las células a defectos en la inmunidad innata causados por la regulación de la función mitocondrial.

## 1.6. Morfología y dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son un tipo de organelas únicas, ya sea en cuanto a su origen, fisiología o función. Además de su típica función descrita como la casa de poder de la célula debido a su función en la producción de energía, también cumplen una función como centros de señalización a través de su comunicación con otras organelas de la célula. Esto le permite desempeñar diferentes funciones como la regulación de la homeostasis de  $Ca^{2+}$ , regulaciones en el metabolismo energético a partir de la producción de ATP, producción de ROS y mecanismo de respuesta frente al estrés celular. Están conformadas por cuatro partes distintivas (Figura 4): una membrana mitocondrial externa (MME), una membrana mitocondrial interna (MMI), un espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Patergnani et al., 2020). Ambas membranas están compuestas por diferentes tipos de fosfolípidos

como esfingolípidos, colesterol, fosfatidilglicerol y cardiolipina (CL) (Mejia & Hatch, 2016). En la matriz mitocondrial reside el ADN mitocondrial que contiene la información para la codificación de 13 proteínas; dichas proteínas son constituyentes centrales de los procesos respiratorios. Estas regiones bien definidas le permiten desempeñar diferentes funciones como la fosforilación oxidativa en la MMI, el metabolismo de carbohidratos y cadenas de ácidos grasos, la síntesis de lípidos y esteroides, la replicación del ADN mitocondrial y la expresión de productos génicos llevada a cabo en la matriz mitocondrial (Aravamudan, Thompson, Pabelick, & Prakash, 2013).

El origen de las mitocondrias está basado en la teoría endosimbiótica. Esta teoría postula que las mitocondrias y otros plástidos, fueron alguna vez procariotas libres que fueron incorporadas por otras células como arqueas y eucariotas primitivas. Con el paso del tiempo estas células fueron cambiando y perdieron parte de su autonomía. La fundamentación de esta teoría se basa en las características similares en cuanto a la fisiología y bioquímica de las células procariotas. Estas organelas tienen un genoma similar al procariota en miniatura, el cual codifica para 63 proteínas en las mitocondrias y pueden sintetizar más de 2000 proteínas. Durante el proceso evolutivo, muchos de los genes presentes en las mitocondrias fueron transferidos a los cromosomas de su hospedador que son expresadas como proteínas citosólicas. Esta incorporación se dio en dos etapas. La primera fusión de procariotas que se produjo tras un período de colaboración metabólica entre ambas células (simbiosis) antes de la incorporación de la bacteria. Posteriormente a la incorporación, la célula desarrolló todo un sistema de orgánulos membranosos y un citoesqueleto, y la bacteria se convirtió en la mitocondria con el paso del tiempo (endosimbiosis primaria). Así, tendríamos una célula similar a las eucariotas actuales. Posteriormente, hubo una segunda colonización de estas células eucariotas por parte de procariotas con clorofila, probablemente similares a las cianobacterias actuales, que con el tiempo se transformaron en los cloroplastos (endosimbiosis secundaria), resultando en las células fotosintéticas como las de los vegetales que poseen tanto mitocondrias como cloroplastos.



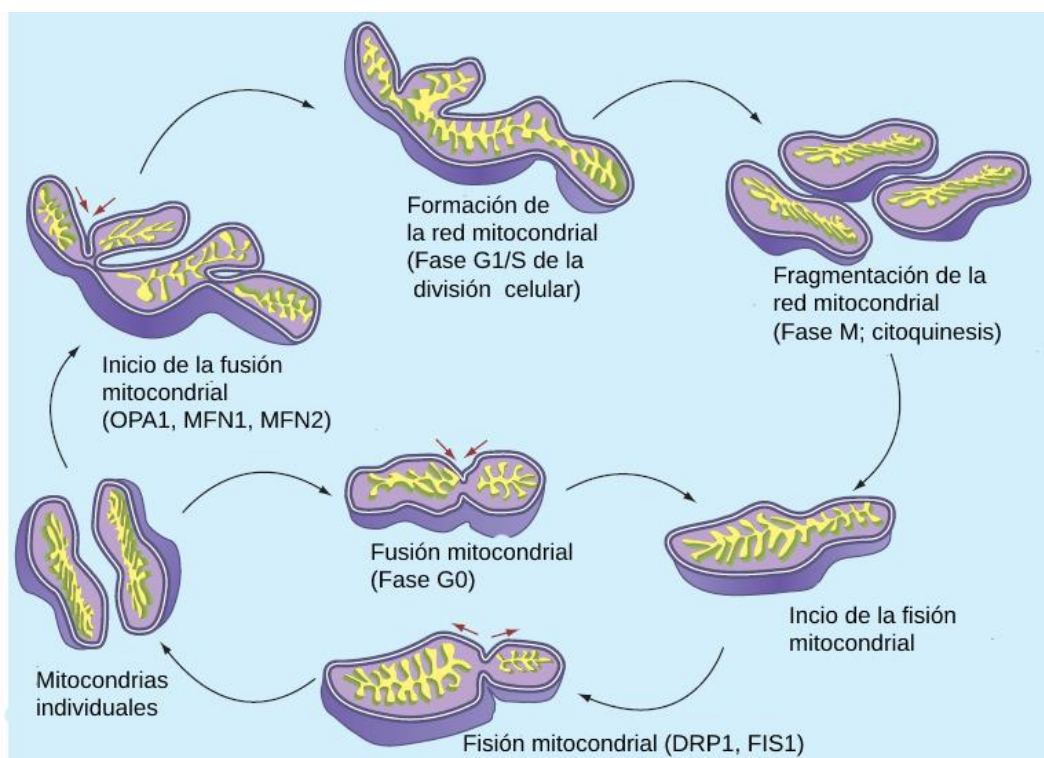
**Figura 4. Morfología mitocondrial.** (A) Esquema representativo de las regiones que conforman a la mitocondria y (B) su visualización a partir de microscopía electrónica. (Frey & Mannella, 2000).

### 1.6.1. Dinámica mitocondrial

Más allá de la clásica representación de las mitocondrias como guijarros o granos de arroz a la que estamos acostumbrados encontramos en la bibliografía, las mitocondrias son organelas dinámicas que se encuentran reguladas por ciclos coordinados de fisión y fusión. Estos procesos controlan la morfología, la distribución, la conexión y el tamaño de las mitocondrias dentro de las células bajo diferentes condiciones de estímulo y crecimiento (Aravamudan et al., 2013). Esta adaptabilidad dinámica es fundamental en diferentes procesos biológicos, entre ellos el ciclo celular, la apoptosis, la inmunidad innata, la autofagia, la señalización redox, la homeostasis de calcio y el funcionamiento mitocondrial en sí (Tilokani, Nagashima, Paupe, & Prudent, 2018). Estas transiciones dinámicas son posibles gracias a un conjunto de proteínas que conforman la maquinaria de fisión y fusión mitocondrial, cuya regulación determina la morfología de la red mitocondrial. La desregulación en el balance de fisión y fusión mitocondrial puede conducir a un exceso de mitocondrias esféricas de

tamaño reducido, o bien a un incremento de mitocondrias largas y ramificadas. Un exceso en la fisión mitocondrial, con reducción significativa del proceso de fusión, puede conducir a una fragmentación de la red mitocondrial, generalmente asociada a la disfunción mitocondrial en condiciones de muerte celular por apoptosis, necrosis y condiciones de estrés elevado (Tilokani et al., 2018). Por otra parte, un exceso de fusión mitocondrial puede conducir a un estado donde las mitocondrias no pueden renovarse eficientemente, alterando el proceso de mitofagia (autofagia especializada de las mitocondrias) (Maiuri et al., 2019). Por lo tanto, el correcto balance entre la fisión y fusión mitocondrial son importantes para asegurar el funcionamiento de las mitocondrias y para poder responder a las demandas nutricionales y metabólicas de la célula.

Como se detallará más adelante, existe un conjunto de proteínas encargadas de llevar a cabo los procesos de fusión y fisión, las cuales son las principales reguladoras de la morfología mitocondrial. Existen diferentes factores que pueden modular a estas proteínas (Aravamudan et al., 2013), de los cuales el más conocido es el  $\text{Ca}^{2+}$  ya que en grandes concentraciones del mismo, estimula la fragmentación mitocondrial. Asimismo, el equilibrio entre la fusión y fisión depende del estadio en el ciclo celular (Tilokani et al., 2018). En la fase G0 suele haber una mayor fusión mitocondrial, mientras que cuando la célula entra en la fase M, la fisión está estimulada (Figura 5). La presencia de agentes como ROS, condiciones anómalas de estrés o estímulos ambientales, pueden generar un desequilibrio y afectar el funcionamiento mitocondrial, con consecuencias sobre la apoptosis e incluso sobre la inmunidad innata.

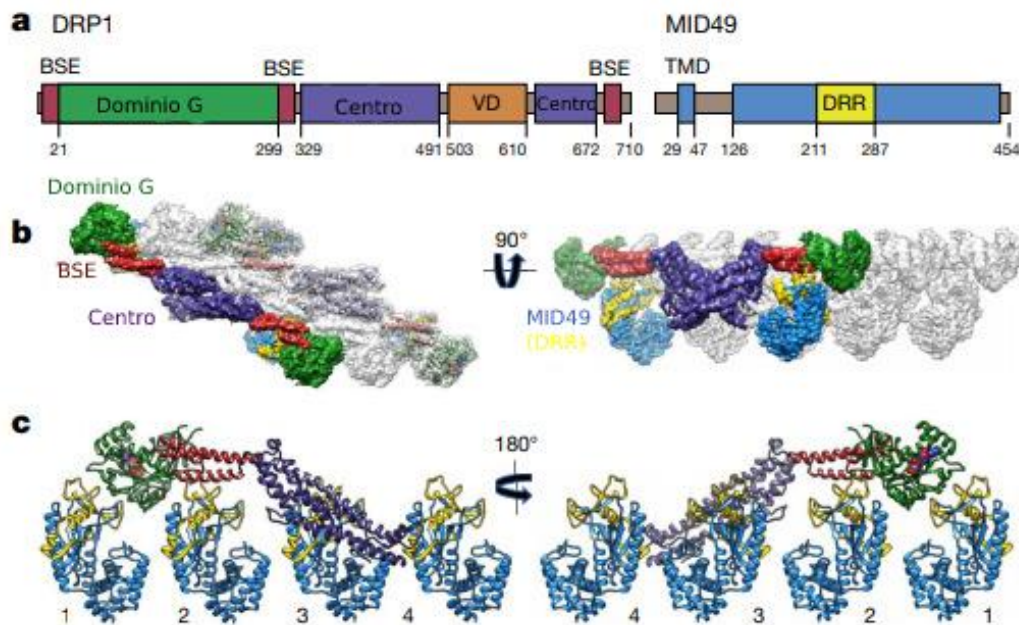


**Figura 5. Fusión y fisión mitocondrial asociado al estadio del ciclo celular** (Aravamudan et al., 2013).

### 1.6.2. Fisión mitocondrial

La fisión mitocondrial es el proceso por el cual a partir de una mitocondria se obtienen dos mitocondrias hijas. Este proceso es regulado por el reclutamiento de la proteína DRP1 sobre la MME. Esta proteína fue descubierta inicialmente en *Caenorhabditis elegans* (Labrousse, Zappaterra, Rube, & van der Blik, 1999), pero ha sido encontrada en una gran variedad de levaduras (Bleazard et al., 1999) y células de mamíferos (Smirnova, Griparic, Shurland, & Van der Blik, 2017). Se trata de una proteína citosólica compuesta por 4 dominios diferentes: un dominio GTPasas en el N-terminal, un dominio central, un dominio variable, el GED en el C-terminal (Kraus & Ryan, 2017) y elementos de unión de señales (BSE) que conecta al dominio GTPasa con el dominio central, permitiendo que DRP1 se una a las membranas y se dé la oligomerización (Figura 6). Como carece de un dominio de unión a los fosfolípidos de la membrana mitocondrial, requiere de la presencia de proteínas

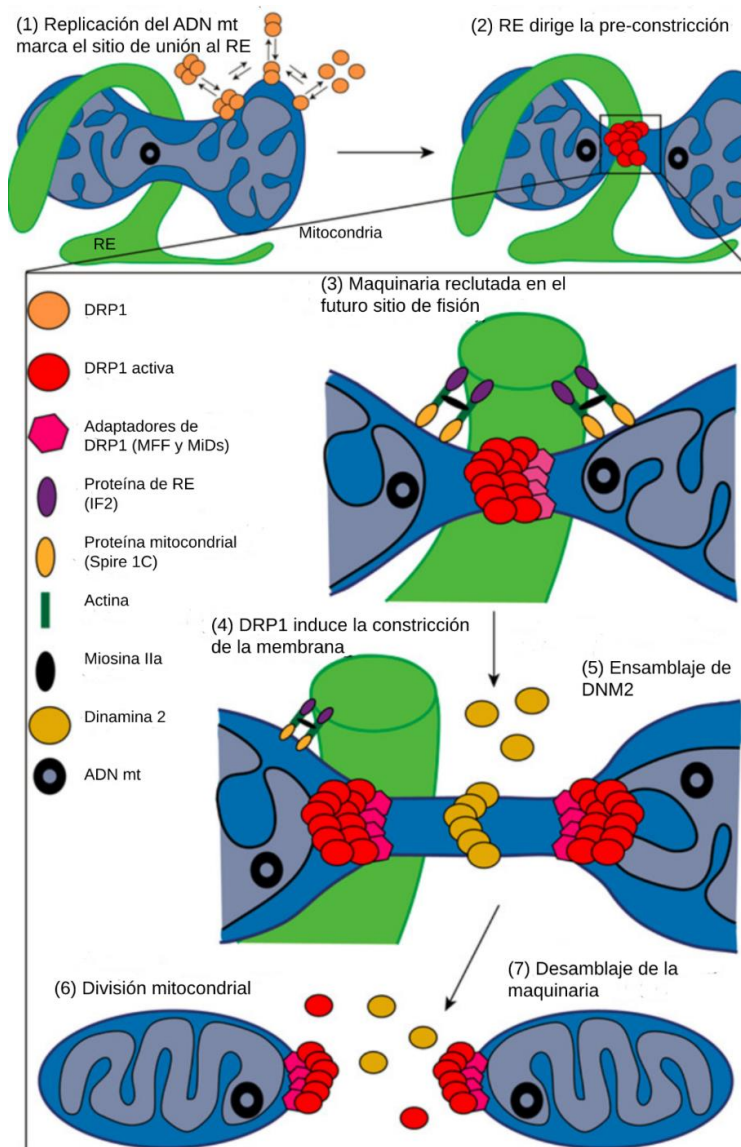
adaptadoras, como MiD49 y MiD51. Estas proteínas adaptadoras actúan como receptores de DRP1 en mamíferos, como así también el factor de fisión mitocondrial (MFF) en mamíferos (Otera et al., 2010) y Mdv1 en levaduras (Losón, Song, Chen, & Chan, 2013). La sobreexpresión de MFF lleva al incremento en la escisión, mientras que una expresión escasa genera una mayor ramificación de las mitocondrias seguido al descenso del reclutamiento de DRP1 (Cribbs & Strack, 2007).



**Figura 6. Esquema estructural de DRP1 y MID49.** (A) Estructura primaria de DRP1 (izquierda) y MID49 (derecha). (b y c) Esquema de la estructura secundaria de DRP1 (Kalia et al., 2018).

El proceso de fisión se origina mediante la unión del dominio central de DRP1 a la MME. La acumulación de las formas oligoméricas en los sitios ER le permite formar hélices oligoméricas en dos puntos diferentes de la MME (Fröhlich et al., 2013) (Figura 7). La forma dimérica y oligomérica se encuentran en equilibrio en el citoplasma y en la mitocondria, y la constricción de la membrana es un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Luego, la unión de INF2 y Spire2 inducen a la nucleación de la actina y la

polimerización de los sitios ER. Posteriormente, la presencia de Miosina IIa genera la contracción de la actina a partir de fuerza mecánica, provocando la pre-constricción mitocondrial. En los sitios ER polimerizados, las proteínas MiD49 y MiD51 reclutan a la proteína DRP1 donde se oligomeriza en forma de anillo, mediada por la hidrólisis de GTP, al unirse a las fibras de actina. Finalmente, Dnm2 es reclutado por la constricción generada por DRP1, donde se une al complejo proteico y lleva a cabo la escisión mitocondrial.



**Figura 7. Modelo simplificado del Proceso de fisión mitocondrial en mamíferos.** Representación esquemática del proceso requerido para la división mitocondrial. (Tilokani et al., 2018).

Existen dos tipos diferentes de división mitocondrial (Kleele et al., 2021) que están estrechamente vinculados a la división celular y al proceso de mitofagia, donde las regiones dañadas de la mitocondria son separadas de las regiones sanas. En ambos tipos de división participa la proteína DRP1 que puede ser activada o inactivada mediante la interacción de receptores mitocondriales, de modificaciones post-traduccionales, por la interacción con filamentos de actina en el citoplasma u otras organelas. Por ejemplo, DRP1 es activada durante la mitosis a partir de la fosforilación en la serina 616 mediante CDK1 y la quinasa dependiente de ciclina B, lo que estimula la oligomerización de DRP1 e induce la fisión mitocondrial. A su vez, DRP1 puede ser fosforilada por otras quinasas, como PKC durante la muerte celular y AKAP1 que fosforilan a DRP1 en el residuo 637 e inhiben la fisión mitocondrial, actuando como inhibidor de la degradación autofagocítica y la muerte celular.

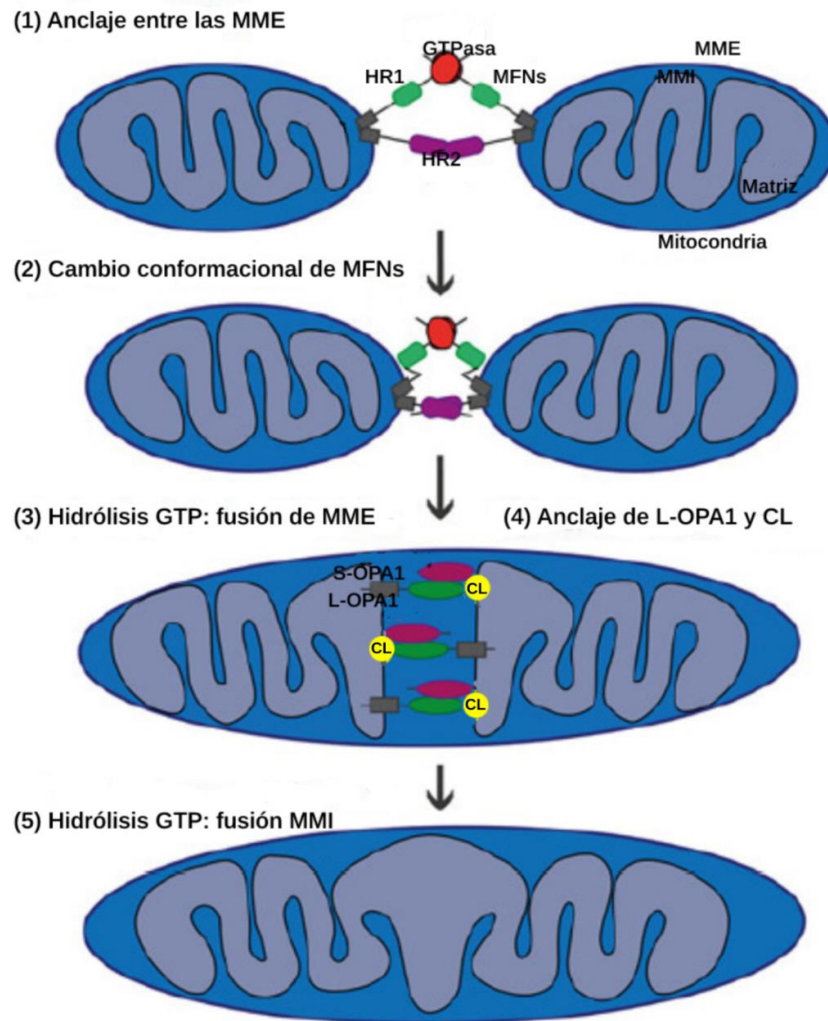
### **1.6.3. Fusión mitocondrial**

La fusión mitocondrial es el proceso de unión de dos mitocondrias que entran en contacto. Este proceso es mediado por las proteínas mitofusinas 1 y 2 (MFN1 y MFN2) que se localizan en la MME, y por la proteína OPA1 localizada en la membrana mitocondrial interna (MMI). Las mitofusinas son proteínas GTPasas con dos dominios transmembrana separados por un "loop". Estos dominios están compuestos por la región N-terminal, que contiene GTPasas y las regiones repetidas HR1 y HR2 en el C-terminal. Estas regiones HRs suelen dar origen a sitios de unión con la membrana, por medio de dos cisteínas oxidadas que forman puentes disulfuro entre MFN1 y MFN2. Estas mitofusinas son direccionadas a las mitocondrias por secuencias en sus dominios transmembrana y C-terminales, se acumula en áreas de contacto entre mitocondrias adyacentes y estable complejos homo-heterotípicos que desencadenan la fusión mitocondrial (Koshiba et al., 2004).

La fusión mitocondrial está compuesta de tres pasos: 1) la unión en trans; 2) el acoplamiento de dos membranas que aumenta el área de contacto y disminuye la distancia entre las dos membranas; 3) la fusión de



dos mitocondrias debido a cambios conformacionales inducidos por la hidrólisis de GTP (Figura 8).



**Figura 8. Modelo simplificado de la fusión mitocondrial en mamíferos.** Representación esquemática del proceso de fusión mitocondrial (Tilokani et al., 2018).

No obstante, existen diferentes modelos propuestos que intentan explicar el mecanismo en que se da la fusión. Por un lado, se propone que las interacciones antiparalelas de las mitofusinas están establecidas por sus dominios HR2 y la GTPasas, lo que causa la unión de la MME de dos mitocondrias opuestas. Esto genera la hidrólisis del GTP, induciendo un cambio conformacional de MFN1. Este cambio conformacional, al cambiar el potencial de membrana de pendiente de GTPasas, conduce al acoplamiento y aumento

de sitios de contacto con la membrana que asegura la fusión de las MME. Seguido a esta fusión, OPA1 y cardiolipina (CL) impulsan la fusión de las MMI, al darse una interacción entre esas proteínas a ambos lados de la membrana después de la hidrólisis de GTP dependiente de OPA1 (Koshihira et al., 2004). Un segundo modelo, postula que la fusión de las membranas adyacentes está asegurada por la oligomerización dependiente de GTP y por péptidos que alteran la conformación de la hélice de HR1. Este cambio interfiere en la unión entre HR1 y HR2, abre la estructura y facilita la fusión (Qi et al., 2016). Recientemente, se ha propuesto que el extremo C-terminal de MFN1, que se une al dominio HR2, contiene una hélice anfipática requerida para la inserción de MFN1 a la MEM y promueve la fusión mitocondrial (Huang et al., 2017).

Por otra parte, la proteína OPA1 es un complejo proteico con 8 variantes conocidas (Olichon et al., 2002) que se encuentra insertado dentro de la MMI a través del N-terminal de 100 residuos seguidos de un dominio transmembrana. OPA1 contiene una secuencia líder mitocondrial dentro del extremo N-terminal muy básico, un dominio GTPasa, un dominio central de dinamina que se conserva en todas las dinaminas y un extremo carboxilo de función desconocida (Aijaz, Erskine, Jeffery, Bhattacharya, & Votruba, 2004). La sobreexpresión de OPA1 induce la fusión mitocondrial, mientras que la reducción de su expresión induce fisión mitocondrial (Tondera et al., 2009).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

La hipótesis de este trabajo es que la actividad del CFTR es capaz de regular la dinámica mitocondrial alterando la morfología mitocondrial en células FQ. De este modo, la falla en la correcta función de este canal produciría profundos cambios en la función mitocondrial.

### **2.2. Objetivo general**

Estudiar diversos aspectos relacionados con la modulación de la dinámica mitocondrial en modelos celulares de fibrosis quística.

### **2.3. Objetivos específicos**

- Analizar la existencia de cambios en la morfología mitocondrial en fibrosis quística mediante diversos análisis de fotografías tomadas por microscopía confocal.
- Estudiar la expresión de proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial en modelos de fibrosis quística.
- Estudiar si existen cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) en los modelos utilizados de fibrosis quística.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**Reactivos.** CFTR (inh)-172, GlyH101 fueron de Calbiochem (San Diego, CA). Las soluciones madre de inhibidores de la ruta se prepararon a 1000 X en DMSO de grado de cultivo. En cuanto a los anticuerpos se utilizaron el anticuerpo policlonal secundario anti-ratón de peroxidasa de rábano picante (HRP) (sc-2008) de y el anticuerpo policlonal secundario anti-conejo HRP (sc-2007) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); el anticuerpo policlonal de conejo anti-actina (A2066) de Sigma-Aldrich; el anticuerpo monoclonal de ratón DRP1 (4E11B11, nº 14647), anticuerpo policlonal de conejo Phospho-DRP1 (Ser616, nº 3455) y el anticuerpo monoclonal de conejo de mitofusina-1 (D6E2S, nº 14739) eran de Cell Signaling Technology (Danvers, MA); el anticuerpo monoclonal de ratón VDAC1 (20B12, sc-58649) era de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, CA). MitoTracker Orange CMTMRos (Molecular Probes, M7510) y MitoProbe™ JC-1 (Molecular Probes, M34152) fueron de ThermoFisher Scientific.

#### 3.1. CULTIVOS CELULARES

##### 3.1.1. Líneas celulares

Como modelo de estudio de FQ, se emplearon las células IB3-1, S9 y C38. Estas células fueron adquiridas en ATCC (Rockville, MD). Actualmente se encuentran discontinuadas y son distribuidas por “Johns Hopkins University Special Collection”. Las células IB3-1 (ATCC® CRL2777™) son una línea celular adherente de epitelio bronquial provenientes de un paciente con FQ, inmortalizada con adenovirus 12-SV40 (Ad12-SV40) (Zeitlin et al., 1991). Estas células poseen la mutación más común en FQ ( $\Delta F508$ : delección de la fenilamina 508) y una mutación sin sentido (W1282X, señal de terminación prematura) en el segundo alelo que determinan por sí misma una enfermedad severa (Shoshani et al., 1992). Como contraparte se utilizaron la línea celular S9 (ATCC® CRL2778™), que son células IB3-1 transducidas con un virus adeno-asociado (AAV por su siglas en inglés) como vector para expresar de

forma estable el canal CFTR salvaje, por lo que no requieren antibióticos para mantener la expresión del CFTR normal (Egan et al., 1992). La línea celular C38 (ATCC® CRL2779™) también proviene de las células IB3-1 pero expresan un CFTR funcional con una porción N-terminal truncada (del 1-119). Además, para lograr obtener mitocondrias marcadas de manera estable, las células C38 fueron transfectadas con el plásmido pEYFP-Mito (#6115-1, Clontech Laboratories, CA) por electroporación (Valdivieso et al., 2012).

Las células fueron cultivadas en DMEM/F12 (Life Technologies, GIBCO BRL, Rockville, MD) con 15 mM de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (bicarbonato) y 15 mM de HEPES, suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios S.A., Mercedes, Buenos Aires, Argentina), penicilina 100U/ml y Estreptomina 100 mg/ml (Life Technologies, GIBCOBRL). Los cultivos fueron crecidos a una temperatura de 37 °C en una atmósfera de aire humidificado que contiene un 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **3.1.2. Congelamiento de células.**

Con el fin de preservar las características originales de la línea celular, luego del descongelamiento y replicación, se procedió a congelar parte de las células obtenidas (entre 3 y 8 x 10<sup>6</sup> células por criotubo). Las células sub-confluentes se trataron con una solución de tripsina-EDTA (tripsina 0,25 %-EDTA 0,02 % en PBS 1X), aproximadamente durante 5 a 10 min, y posteriormente fueron disgregadas por pipeteo. La tripsina fue inactivada con medio de cultivo suplementado con 10 % de SFB, las células fueron precipitadas por centrifugación a 400 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas con una solución de congelamiento A (SFB 80 % + DMEM/F12 20 %) en hielo. Luego se agregó gota a gota una solución de congelamiento B (DMEM/F12 80 % + DMSO 20 %), de modo que la concentración final del medio de congelamiento fue DMSO 10%, SFB 40% y DMEM/F12 50 %. Cada criotubo se preparó con un volumen final de 500 µl de la suspensión celular y fueron almacenados a -80° C durante al menos 16 h dentro de un recipiente de Telgopor para disminuir la pendiente de congelamiento y finalmente a -196 °C en un termo con nitrógeno líquido.

### **3.1.3. Descongelamiento de células.**

Se retiró el criotubo con células del nitrógeno líquido y se sumergió en un baño de agua a 37 °C con agitación constante. Inmediatamente después del descongelamiento, las células se pasaron a una placa con 10 ml de DMEM/F12 + SFB 5 %. Una vez adheridas al fondo, el medio fue reemplazado por medio fresco para eliminar los restos de DMSO presentes en el medio de congelamiento. Las células fueron crecidas en estufa a 37 °C con una atmósfera de aire saturado de agua y con 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **3.1.4. Subcultivo y tratamiento de las células.**

Para realizar el subcultivo de células se procedió a levantar las células con la solución de tripsina-EDTA, como se indicó anteriormente en la sección de congelamiento. Las células fueron resuspendidas en medio DMEM/F12 + SFB 5 %, contadas y sembradas en la densidad celular y soporte requerido para cada experimento (usualmente  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). Las células fueron incubadas a 37 °C, con una atmósfera de aire saturado de agua y con 5 % de CO<sub>2</sub>. Antes de los tratamientos, las células fueron cultivadas 24 h en medio DMEM/F12 sin suero. Las células fueron tratadas con cóctel de estimulación del CFTR (AMPc 200 µM, IBMX 200 µM e isoproterenol 10 µM) en medio DMEM/F12 libre de suero durante 24 h.

## **3.2. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL**

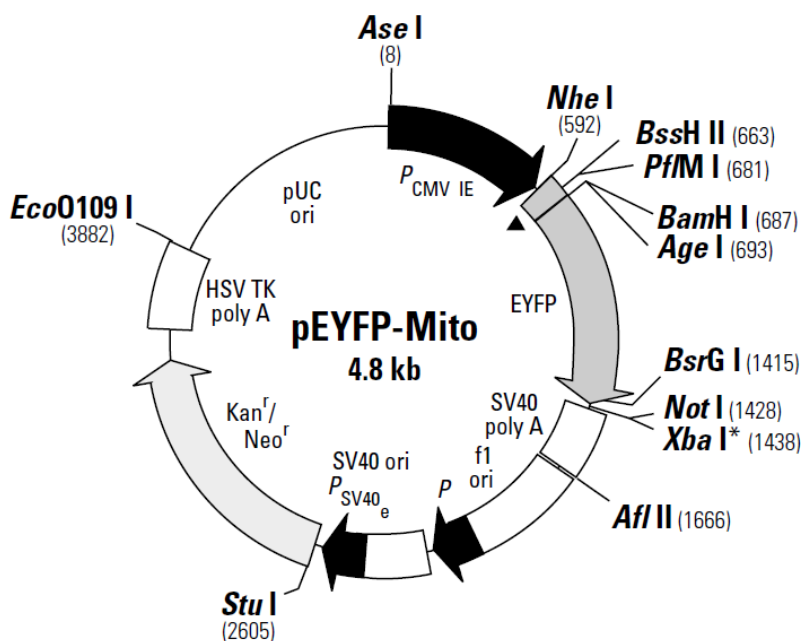
### **3.2.1. Marcación mitocondrial con la sonda fluorescente MitoTracker Orange**

Las células fueron cultivadas con una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas aptas para microscopía de 15 mm (Jet BioFil, Guangzhou, China). Para estudiar la modulación de la morfología mitocondrial mediada por el canal CFTR, se cultivaron las células en condiciones basales y de estimulación del canal mediante AMPc. Para ello, las células se dejaron crecer por 48 h con medio de cultivo DMEM/F12 con SFB 5 % a 37 °C. Luego, se incubaron las células con medio DMEM/F12 sin SFB por 24 h para sincronizarlas a un estado

metabólico basal y fueron tratadas con el cóctel de AMPc (AMPc 200  $\mu$ M, IBMX 200  $\mu$ M e isoproterenol 10  $\mu$ M) en medio DMEM/F12 libre de suero por 24 h. También se incubaron células en medio sin SFB sin cóctel de AMPc para determinar la morfología mitocondrial dependiente de la presencia del CFTR y no de su activación por AMPc agregado. Para realizar la marcación mitocondrial, luego del tiempo de tratamiento se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se les agregó medio DMEM/F12 sin suero con 25 nM de la sonda mitocondrial fluorescente MitoTracker Orange CMTMRos (M7510, ThermoFisher Scientific). Esta sonda fluorescente tiñe las mitocondrias en función de su potencial de membrana y presenta una longitud de excitación y emisión de 560-615 nm respectivamente. Las células fueron incubadas por 20 minutos con MitoTracker Orange y pasado dicho tiempo se realizaron 3 lavados con PBS 1X para retirar el exceso. Se tomaron imágenes por microscopía confocal (microscopio Zeiss LSM510, Jena, Alemania) a una temperatura de 37 °C y CO<sub>2</sub> controlado, usando el objetivo 63X/1.2 NA. Se utilizó la línea láser de 543 nm y el filtro BP 560-615 nm.

### **3.2.2. Análisis de la Morfología mitocondrial en presencia de inhibidores**

Para realizar un análisis más completo de la morfología mitocondrial, las líneas celulares S9 y C38 fueron incubadas en presencia de los inhibidores del CFTR (inh)-172  $\mu$ M y GlyH101 5  $\mu$ M, y en condiciones basales (DMSO). Para ello se utilizaron dos métodos de marcación mitocondrial: la marcación con Mitotracker Orange en S9, descrita anteriormente y la marcación mitocondrial con la proteína EYFP en C38. La proteína EYFP (“Enhanced yellow fluorescent protein”) se encuentra incorporada en el plásmido pEYFP-Mito (Catálogo #6115-1, CLONTECH Laboratories, Mountain View, CA) (Figura 9), la cual se encuentra fusionada a un péptido mitocondrial permitiendo su expresión. Esta proteína posee una longitud de onda de excitación y de emisión de 513 nm y 527, respectivamente.



**Figura 9. Plásmido pEYFP-Mito.** En esta esquematización del plásmido se observa que el mismo está compuesto de un promotor de citomegalovirus humano (CMV), una secuencia proveniente de la subunidad 8 del citocromo c oxidasa humana para el direccionamiento mitocondrial, el gen *EYFP*, señal de poliadenilación y origen de replicación de SV40. Contiene un promotor de SV40 seguido de un gen de resistencia de Neomicina y una señal de poliadenilación proveniente de la quinasa timidina (TK) del virus de Herpes simple (HSV). La resistencia de neomicina permite realizar la selección de células eucariotas usando genética. Por último, posee un promotor de origen procarionta para la expresión del gen de resistencia a la kanamicina/neomicina y un origen de replicación proveniente de *E. Coli* (pUC). La imagen proviene de la Información del Vector proveniente del fabricante (CLONTECH Laboratories, Mountain View, CA).

Se cultivaron las células C38 en DMEM/F12 con SFB 5% hasta obtener una densidad celular de  $20 \times 10^6$  células/mL en medio sin suero. El plásmido fue transfectado por medio de un electroporador de onda cuadrada BTX-ECM-830 (Genetronix Inc., San Diego, CA) usando diferentes condiciones de electroporación: 140 Volts, 70 msec, 1 pulso, en cubetas de 4 mm de ancho "Gene Pulser" (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA). Se transfectaron  $4 \times 10^6$  células con 40  $\mu$ g de plásmido en un volumen final de 400  $\mu$ l en medio sin suero. Las células transfectadas fueron seleccionadas mediante la incubación con G418 en medio DMEM/F12 con SFB 5%. Una vez seleccionadas fueron



cultivadas en placas aptas para microscopía de 15 mm (Jet BioFil, Guangzhou, China) con una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> e incubadas en medio sin suero. Las células fueron estimuladas de manera similar a la descrita anteriormente y fueron tratadas con los inhibidores CFTR (inh) 5  $\mu$ M y GlyH101 5  $\mu$ M con diferentes tiempos de incubación: 1 h, 2 h y 4 h. Las imágenes fueron obtenidas a partir de microscopía confocal de fluorescencia usando los filtros LP 530 nm para YFP y el filtro BP 560–615 nm para el Mitotracker.

### **3.2.3. Cuantificación de mitocondrias mediante el programa de computación MiNA**

Para realizar la cuantificación de mitocondrias se utilizó el análisis de ramificaciones mitocondriales MiNA (Valente, Maddalena, Robb, Moradi, & Stuart, 2017), la cual se trata de un conjunto de macros utilizados por el programa Image J. Estos permiten efectuar un análisis semi-automático de las redes mitocondriales de células de mamíferos. Dicha herramienta es de libre acceso en <https://github.com/ScienceTollkit/MiNA>. A partir de esta herramienta se analizaron las imágenes obtenidas de las células IB3-1, C38 y S9 en condiciones basales y en bajo la estimulación del CFTR para detectar los cambios en la morfología mitocondrial. Dichas imágenes fueron sometidas a un pre-procesamiento para mejorar la nitidez de las imágenes y cambiar la escala del contraste original, mediante la herramienta de contraste adaptativo local (CLAHE) que ajusta la intensidad de los píxeles de una imagen. Las imágenes procesadas fueron convertidas en binarias por el programa MiNA donde se asigna un valor mínimo y máximo de intensidad deseada. La imagen binaria es convertida en esqueleto mediante un algoritmo del programa MiNA que utiliza iteraciones paralelas para remover los píxeles externos; los píxeles internos son agrupados en función a cómo se relacionan entre ellos espacialmente, lo que permite definir la longitud de cada ramificación y el número de estas. El análisis MiNA permite distinguir entre las estructuras individuales y las redes, a partir de las cuales se computan 9 parámetros: el número de estructuras individuales sin ramificaciones, el número de redes, la longitud promedio de las ramificaciones en las redes, la longitud media de las ramificaciones en las redes, el número promedio de ramificaciones por red, el número medio de ramificaciones por

red, la desviación estándar del número de ramificaciones por red y la huella mitocondrial.

### **3.2.4. Cuantificación de subtipos mitocondriales mediante el programa de computación Micro-P**

Además, se realizó la cuantificación de la morfología mitocondrial mediante el programa de computación Micro-P (Peng et al., 2011) de acceso libre que permite clasificar las mitocondrias en distintos subtipos de manera automática. Se analizaron las imágenes obtenidas en los estudios realizados con las células IB3-1, C38 y S9 cultivadas en presencia y en ausencia de AMPc para detectar cambios generales en los subtipos mitocondriales. El análisis de las imágenes con este programa arroja una imagen que distingue 6 subtipos mitocondriales según forma y tamaño, de distintos colores, junto con una tabla que expresa la cantidad de mitocondrias pertenecientes a cada subtipo: a) glóbulos pequeños (azules); b) glóbulos grandes (amarillas); c) tubular simple (verde); d) túbulos retorcidos (naranja); e) túbulos ramificados (púrpura), y f) bucle (rojo) (Peng et al., 2011). Estos subtipos suelen ser indicadores útiles sobre las condiciones específicas de la célula. Se utilizaron estos datos para cuantificar y graficar los subtipos mitocondriales que presentaron cambios significativos, expresados como porcentaje.

## **3.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT**

### **3.3.1. Extracción de proteínas**

Se procedió a realizar la extracción de proteínas celulares totales a partir del lisado de las células en solución amortiguadora de RIPA (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, SDS al 0,1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, Triton X-100 al 1%, glicerol al 10%, pH 7,4) (Clauzure et al., 2017). Las células fueron lavadas con una solución de PBS 1X (NaCl 80 gr, KCl 2 gr, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14,4 gr, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4 gr, a pH=7,2-7,4) dos veces y tratadas con 100 µl de RIPA en presencia de un cóctel inhibidor de proteasas (Cat. # HY-K0010, MedChemExpress, EE. UU, NJ) más inhibidores de la fosfatasa (Cat. # HY-K0022, MedChemExpress). Las células fueron disgregadas y recogidas mediante el raspado con rastrillo,

colocadas en tubos de 1,5 mL e incubadas 1 h en hielo. Luego, los lisados fueron centrifugados a 14000 x g durante 20 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recuperados y divididos en dos partes. Una parte de la proteína fue usada en la determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951). La otra parte de la proteína fue desnaturalizada durante 5 min a 100 °C en solución amortiguadora de carga para SDS-PAGE (Tris 50 mM, DTT 10 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, pH 6,8) y almacenada a -20 °C hasta su posterior uso.

### **3.3.2. Electroforesis y transferencia de proteínas**

Cada muestra de proteínas (entre 30-50 µg en función de lo obtenido) fue separada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10 % en solución amortiguadora Tris-glicina (Tris 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0,1 %, pH 8,8). La electroforesis se inició a 80 Volts (V) hasta que la muestra entró en el gel de separación. Luego, el voltaje se subió a 100 V por 2 h. Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa utilizando una solución amortiguadora de transferencia (glicina 39 mM, Tris-base 48 mM, SDS 0,037 %, metanol 20 %, pH 8,3) durante 4 hs a un voltaje constante de 100 V y con un límite de 400 Amperes (A).

### **3.3.3. Inmunodetección de proteínas por Western blot**

Para la inmunodetección, las membranas fueron bloqueadas 1 h con BSA 5 % con Tween-20 (0,1 % v/v) en PBS 1X. Luego del bloqueo, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario en PBS 1X Tween-20 (0,1 % v/v) (Tabla 1), a 4 °C en agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min en PBS 1X con Tween-20 (0,1 % v/v) en agitación y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón o anti-conejo, según el anticuerpo primario utilizado, acoplado a HRP (“horsesradish peroxidase”) en PBS 1X con Tween-20 0,05 % (Tabla 3).

Anticuerpos	Catálogo, fabricante	Dilución
<b>Primarios</b>		
Anti-Phospho-DRP1	3455; Cell Signaling Technology	1:1000
Anti-DRP1	14647; Cell Signaling Technology	1:1000
Mitofusin-1	14739; Cell Signaling Technology	1:1000
VDAC	SC-58649; Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Anti-actina	A2066; Sigma-Aldrich	1:2000
<b>Secundarios</b>		
Goat anti-mouse IgG-PA	sc-2008; Santa Cruz Biotechnology	1:2000
Goat anti-rabbit IgG-PA	sc-2007; Santa Cruz Biotechnology	1:2000

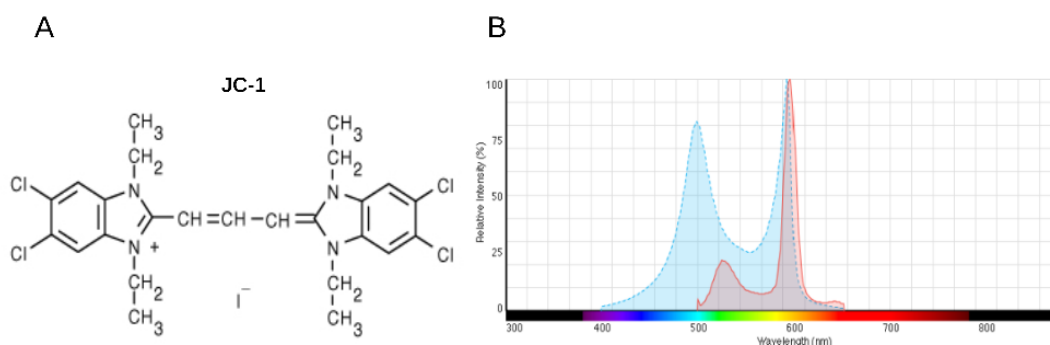
**Tabla 3. Anticuerpos y diluciones utilizadas para la realización de los Western blot.**

Se repitieron los lavados y las membranas fueron incubadas con una mezcla realizada con 2,5 mL de solución A (luminol 1,25 mM, ácido cumárico 0,2mM, Tris 50 mM pH 8,8) y 2,5 mL de solución B (4,55 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en 5 mL de Tris 50 mM pH 8,8), y los resultados de quimioluminiscencia fueron visualizados en un equipo ImageQuant 4000 (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ). La expresión fue cuantificada por densitometría mediante el programa Image J (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). Luego del revelado con los anticuerpos de p (616)-DRP1 y actina, las membranas fueron tratadas con un protocolo de “stripping” suave para reprobar las membranas con DRP1 total (protocolo de Abcam, USA, <https://www.abcam.com/protocols/western-blot-membrane-stripping-for-restaining-protocol>). Brevemente, las membranas fueron incubadas con la solución amortiguadora (glicina 200 mM, SDS 0,1 %, Tween-20 1 %, pH 2,2) por 10 min a TA, la solución fue recambiada por otra fresca e incubada 10 min, y finalmente se realizaron 2 lavados de 10 min con PBS 1X, dos lavados con TBS 1X 10 min, y finalmente se bloqueó con BSA 5 % Tween-20 0,1 %. Se normalizó la expresión de la proteína de interés con la expresión de actina, aunque en el caso de la medición de la activación de DRP1 la expresión de p(616)-DRP1 fue normalizada con DRP1 total.

### 3.4. ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE MEMBRANA ( $\Psi_m$ )

#### 3.4.1. Medición del potencial de membrana con la sonda JC-1

Para el análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) se utilizó la sonda fluorescente JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetracloro-1, 1', 3, 3'-yoduro de tetraetilbencimidazolilcarbocianina, Molecular Probes, Invitrogen, USA) y se realizó la medición en placas de 96 pocillos con paredes negras y fondo transparente (Greiner Bio-One, Germany; 655090). El colorante JC-1 es un marcador radiométrico que se acumula en el interior de las mitocondrias de acuerdo con su potencial de membrana y genera espectros de emisión sensibles a la concentración. En su forma monomérica, esta sonda muestra una emisión de fluorescencia verde ( $\sim 529$  nm) que al formar J-agregados dependientes de la concentración en la mitocondria cambia su fluorescencia a rojo ( $\sim 590$  nm) (Figura 10). De este modo, la despolarización mitocondrial muestra una disminución de la proporción de la intensidad de fluorescencia rojo/verde.



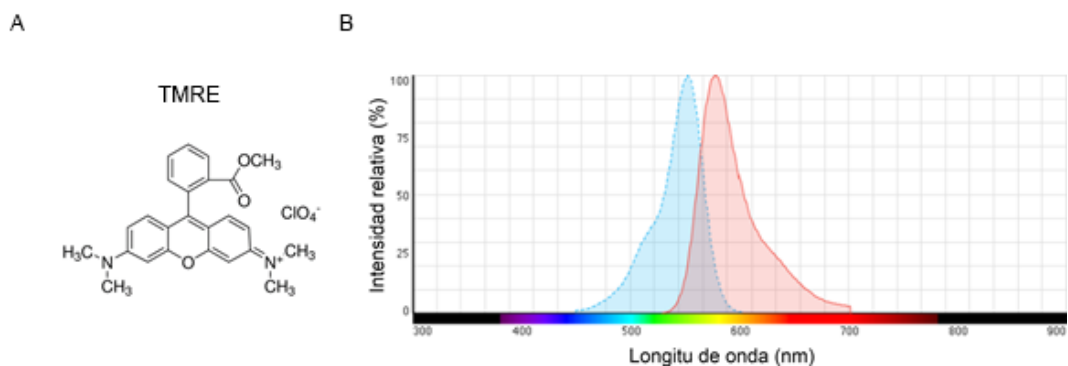
**Figura 10. Sonda JC-1. A)** Estructura química de la sonda JC-1. **B)** Espectro de fluorescencia (emisión/excitación) para JC-1. Las imágenes fueron extraídas de la página del vendedor (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T669>).

Se sembraron 10.000 células por pocillo para cada línea celular (IB3-1, S9 y C38) por duplicado. Se realizaron tratamientos en presencia y ausencia de AMPc como se mencionó en los ensayos mencionados previamente. Como controles positivos se realizaron incubaciones con los desacoplantes de la cadena de transporte de electrones cianuro de carbonilo 4-(trifluorometoxi)

fenilhidrazona (FCCP) y carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) con una concentración final de 10  $\mu$ M por 20 min. Estos controles permiten evaluar la fluorescencia específica aportada por el  $\Psi_m$ . Luego de los tratamientos, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se incubó con JC-1 (dilución 1:1000 en medio DMEM/F12 sin suero) por 20 min a 37° C. Se retiró la solución de tinción y se realizaron 3 lavados con medio libre de suero. Se midió el  $\Psi_m$  en espectrofluorímetro (NOVOstar, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) con los filtros de 485 nm y 540 nm correspondientes a las longitudes de onda de emisión de la fluorescencia verde y roja respectivamente. El colorante JC-1 sufre un cambio reversible en la emisión de fluorescencia de verde a naranja verdoso (rojo) a medida que aumenta el  $\Psi_m$ . Las células con un alto  $\Delta\Psi$  formarán agregados de JC-1 y emitirán un rojo fluorescente; aquellos con  $\Delta\Psi$  reducido contendrán mayor cantidad de JC-1 monomérico (verde fluorescente). La cuantificación se realizó mediante el cálculo de la proporción de la intensidad de fluorescencia rojo/verde y tras la substracción de la fluorescencia en presencia de FCCP y/o CCCP para cada línea celular y tratamiento.

#### **3.4.2. Medición del potencial de membrana con la sonda TMRE**

El perclorato del ester etílico de tetrametilrodamina (TMRE) (Molecular Probes, Thermofisher) es una sonda catiónica fluorescente de color rojo-anaranjado que penetra en la célula y es rápidamente secuestrada por las mitocondrias activas. Cuando la mitocondria pierde su  $\Psi_m$ , deja de acumularse TMRE en su interior y la señal decae. Tiene una longitud de onda de excitación de 549 nm, y de emisión de 575 nm (Figura 11).



**Figura 11. Sonda TMRE. A)** Estructura química de la sonda TMRE. **B)** Espectro de fluorescencia (emisión/excitación) para TMRE. Las imágenes fueron extraídas de la página del vendedor (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T669>).

Las células IB3-1, S9 y C38 fueron crecidas por 24 h en medio de cultivo DMEM/F12 con SFB 5 % a 37 °C hasta obtener una confluencia del 90%. Se realizaron tratamientos en presencia y ausencia de AMPc en las condiciones establecidas previamente y se procedió a incubar las células con FCCP (concentración final utilizada 20  $\mu$ M) por 1 h. Las mitocondrias fueron marcadas con el TMRE diluido en medio DMEM/F12 sin suero (concentración final 40 nM) durante 30 min a 37 °C. Luego, las células fueron levantadas con tripsina y centrifugadas a 800 rpm por 5 min. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con buffer HANK's y se resuspendieron en dicho buffer. Finalmente, se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo. Para la cuantificación, a la fluorescencia media obtenida para cada línea celular y tratamiento se le restó la fluorescencia de fondo ("background") en presencia de FCCP.

### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa ORIGIN Pro (Originlab Co., Northhampton, MA, USA) para realizar los análisis estadísticos y los diferentes gráficos. Para el análisis estadístico de morfología mitocondrial (con los programas Micro-P y MiNA), todos los datos de microscopía confocal fueron esquematizados como diagramas de caja de al menos 3 experimentos independientes. Se adquirieron

al menos 10 imágenes para cada tratamiento y se analizaron de 10 a 30 células por experimento. Los análisis de diagramas de caja representan los percentiles 25 y 75 alrededor de la mediana y los bigotes representan los valores máximo y mínimo. Los resultados de los WBs corresponden a la media de al menos 5 experimentos independientes (media  $\pm$  SEM). La normalización de los WB se realizó mediante el método de punto fijo (Degasperi et al., 2014). En el caso de la medición del  $\Psi_m$ , se analizaron 10 replicados técnicos correspondientes a un solo experimento. La presencia de diferencias significativas fue determinada mediante test de Student, ANOVA de una o dos vías y la prueba post hoc de Tukey (ORIGIN Pro), como se indica en las leyendas de las figuras (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; y \*\*\*  $p < 0,001$ ).



## 4. RESULTADOS

Para poder realizar estudios de dinámica mitocondrial y analizar si existen cambios en la morfología de la red mitocondrial bajo distintos tratamientos, es fundamental contar con métodos adecuados de marcación de mitocondrias. Estos deberían permitir realizar principalmente mediciones *in vivo* debido a la naturaleza dinámica de los procesos de fusión y fisión mitocondrial.

Para estudiar si la morfología mitocondrial se encuentra afectada en FQ, se utilizó como modelo de trabajo las células IB3-1, C38 y S9, descritas en materiales y métodos, que han sido ampliamente utilizadas en este laboratorio (Clauzure et al., 2014) (Massip-Copiz et al., 2017) (Taminelli et al., 2008) (Valdivieso et al., 2012) (Valdivieso, Clauzure, Massip-Copiz, & Santa-Coloma, 2016) (García et al., 2021). Las células IB3-1 poseen la mutación  $\Delta F508$  en un alelo y la mutación sin sentido W1282X (señal de terminación prematura) en el otro alelo del gen CFTR, afectando la correcta función del canal en estas células (Zeitlin et al., 1991). La línea celular S9 deriva de células IB3-1 que fueron transducidas con un vector viral que expresa el CFTR nativo completo y funcional (Egan et al., 1992), en tanto que las células C38, las cuales también provienen de las células IB3-1, fueron transducidas con un vector viral que expresa un CFTR truncado en su extremo N-terminal y es altamente funcional (Flotte, Afione, Solow, et al., 1993).

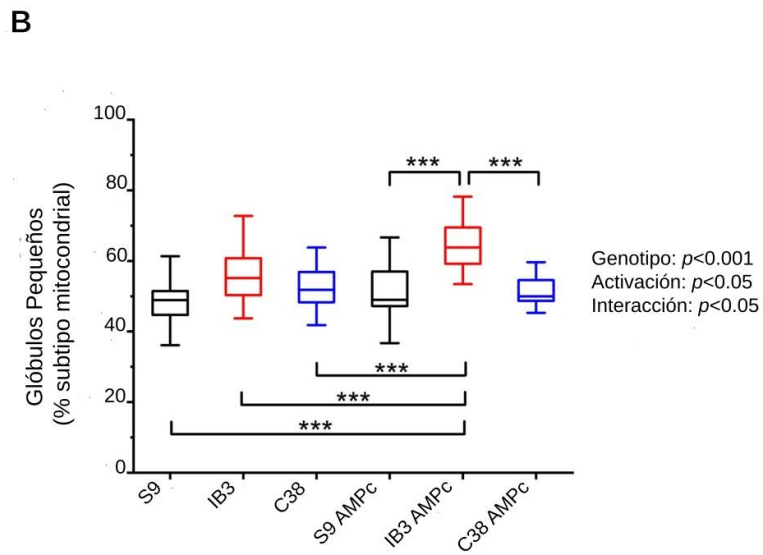
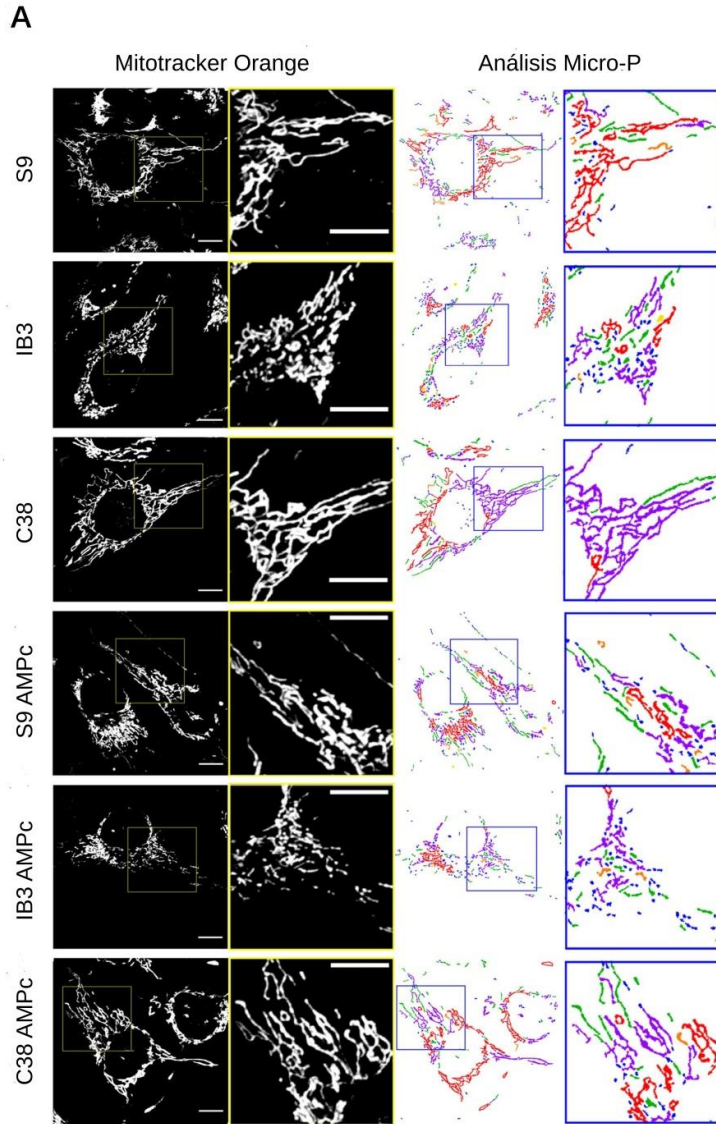
A continuación, se describen los resultados obtenidos sobre el estudio de la regulación de la dinámica mitocondrial mediada por el canal de cloruro CFTR.

### 4.1. La morfología mitocondrial se encuentra alterada en modelos celulares de fibrosis quística

Se analizó la morfología de la red mitocondrial utilizando como modelo de FQ las células IB3-1 (células que poseen la mutación más frecuente en fibrosis quística) y las líneas S9 (que tienen el CFTR salvaje) y C38 (células con el CFTR truncado pero funcional) como controles. Las células C38

representan un modelo interesante ya que se ha reportado por exhibir una alta actividad basal del CFTR (Flotte, Afione, Conrad, et al., 1993), una característica útil para comparar el papel de la actividad CFTR en la modulación de la morfología mitocondrial. Las mismas fueron incubadas en presencia o ausencia de un cóctel de estimulación del canal CFTR durante 24 h, se realizó la marcación mitocondrial con Mitotracker Orange y se tomaron imágenes por microscopía confocal. En la Figura 12A se muestran imágenes representativas de los experimentos y el análisis de subtipos mitocondriales mediante el programa de computación Micro-P, donde puede observarse un aumento en la cantidad de mitocondrias con morfología de glóbulos pequeños (mitocondrias color azul) y una red mitocondrial más fragmentada en las células IB3-1 con respecto a las células control (S9 y C38). Dichas diferencias fueron más evidentes en aquellas células que fueron tratadas con el cóctel de AMPc para estimular la actividad del CFTR.

Para determinar la interacción entre genotipo vs activación del CFTR, la composición de los subtipos mitocondriales fue cuantificada como porcentaje y analizada por ANOVA de dos vías. Se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del subtipo glóbulos pequeños, el cual sugiere un aumento en la fisión mitocondrial, en las células IB3-1 en comparación con S9 en condiciones basales, mientras que no se observaron cambios significativos en comparación con las células C38 (Fig. 12B). Asimismo, en condiciones de estimulación de la actividad del CFTR con AMPc se observó un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de este subtipo mitocondrial en las células IB3-1, en comparación con las células S9 y C38 (Fig. 12B). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los otros subtipos mitocondriales analizados por Micro-P (resultados no mostrados).

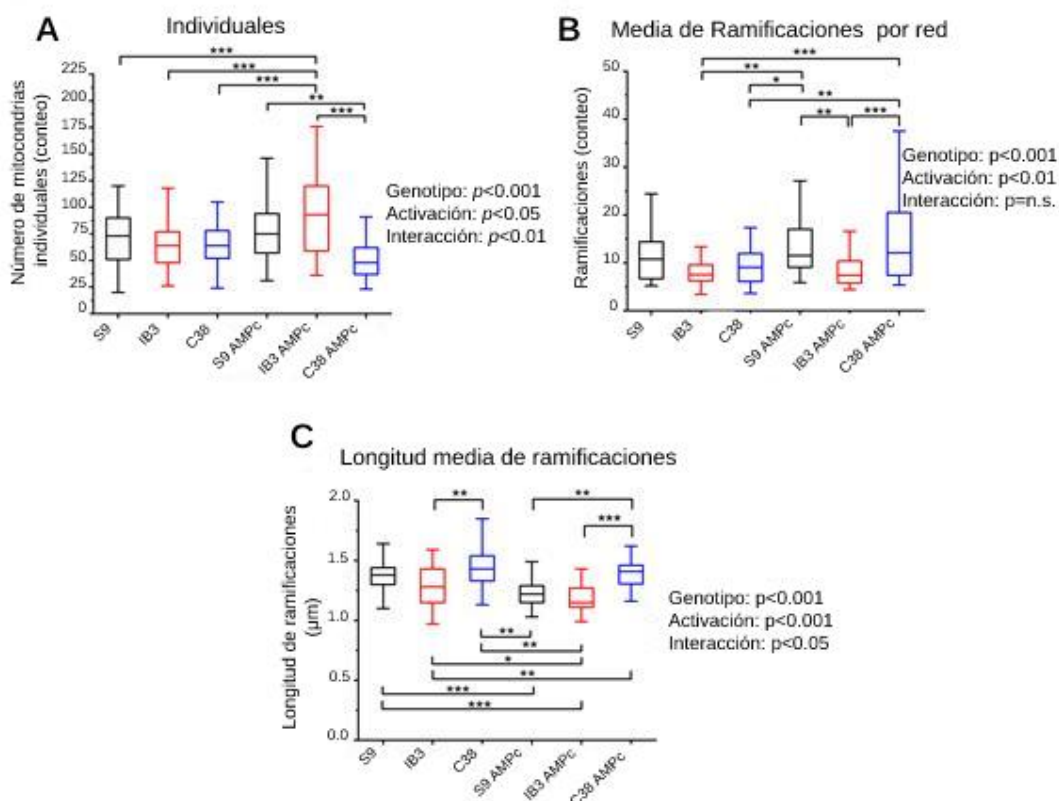


**Figura 12. Alteraciones en la morfología mitocondrial en células IB3-1 de FQ bajo condiciones de estimulación y basal del canal CFTR. (A)** Imágenes representativas obtenidas a partir de microscopía confocal de células IB3-1 (células FQ), células S9 (células IB3-1 que expresan wt-CFTR) y células C38 (células IB3-1 que expresan una versión truncada del CFTR, pero funcional). La morfología mitocondrial se visualizó mediante microscopía confocal en células vivas teñidas con Mitotracker Orange y análisis Micro-P. Código de colores para la clasificación de las mitocondrias: glóbulos pequeños (azul), tubo simple (verde), tubos ramificados (violeta) y asas (rojo). **(B)** Diagrama de caja de la cuantificación del subtipo mitocondrial de glóbulos pequeños utilizando el software Micro-P. El diagrama de caja representa los percentiles 25 y 75 alrededor de la mediana y las barras representan los valores máximo y mínimo (10 a 35 células seleccionadas al azar para cada tratamiento: n = 3 experimentos independientes). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  indican una diferencia significativa con respecto a las células AMPc IB3-1 o IB3-1. ### indica  $p < 0,001$  entre las células tratadas con AMPc y las no tratadas. Se utilizaron ANOVA de dos vías.

Por otra parte, la morfología de la red mitocondrial fue también analizada mediante el macro MiNA en el programa Fiji (Valente et al., 2017), el cual permite analizar condiciones más generales respecto a su estado general. En este análisis, se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el número de mitocondrias individuales en las células IB3-1 con respecto a las células C38 bajo condiciones de estimulación del canal CFTR con AMPc (Figura 13A). Este cambio fue acompañado por una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) de las mismas en las células C38 en comparación con las células IB3-1 y S9. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de estructuras individuales entre las distintas líneas celulares en estado basal sin estimulación por AMPc (Fig. 13A).

En cuanto al tamaño de la red mitocondrial, se observó una disminución significativa en las células IB3-1 en comparación con las células C38 ( $p < 0,01$ ) y S9 ( $p < 0,001$ ) en condiciones de estimulación del CFTR con AMPc (Fig. 13B). Un mismo patrón pudo observarse en las células que donde no se estimuló con AMPc, aunque los cambios no resultaron significativos, no pudiendo determinarse una interacción significativa (n.s., no significativa) entre el genotipo y la activación del CFTR. Además, el tamaño medio de la red aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) en las células C38 estimuladas con AMPc en comparación con las células C38 en condiciones basales, lo que

sugiere que la actividad de CFTR podría estar implicada en la regulación de los cambios en la morfología mitocondrial. Finalmente, la medición de la longitud de la ramificación mitocondrial disminuyó significativamente en las células IB3-1 en comparación con las células C38 en condiciones tanto basales como estimuladas. Se observó un patrón similar entre las células IB3-1 y S9, aunque las diferencias no llegaron a considerarse significativas.

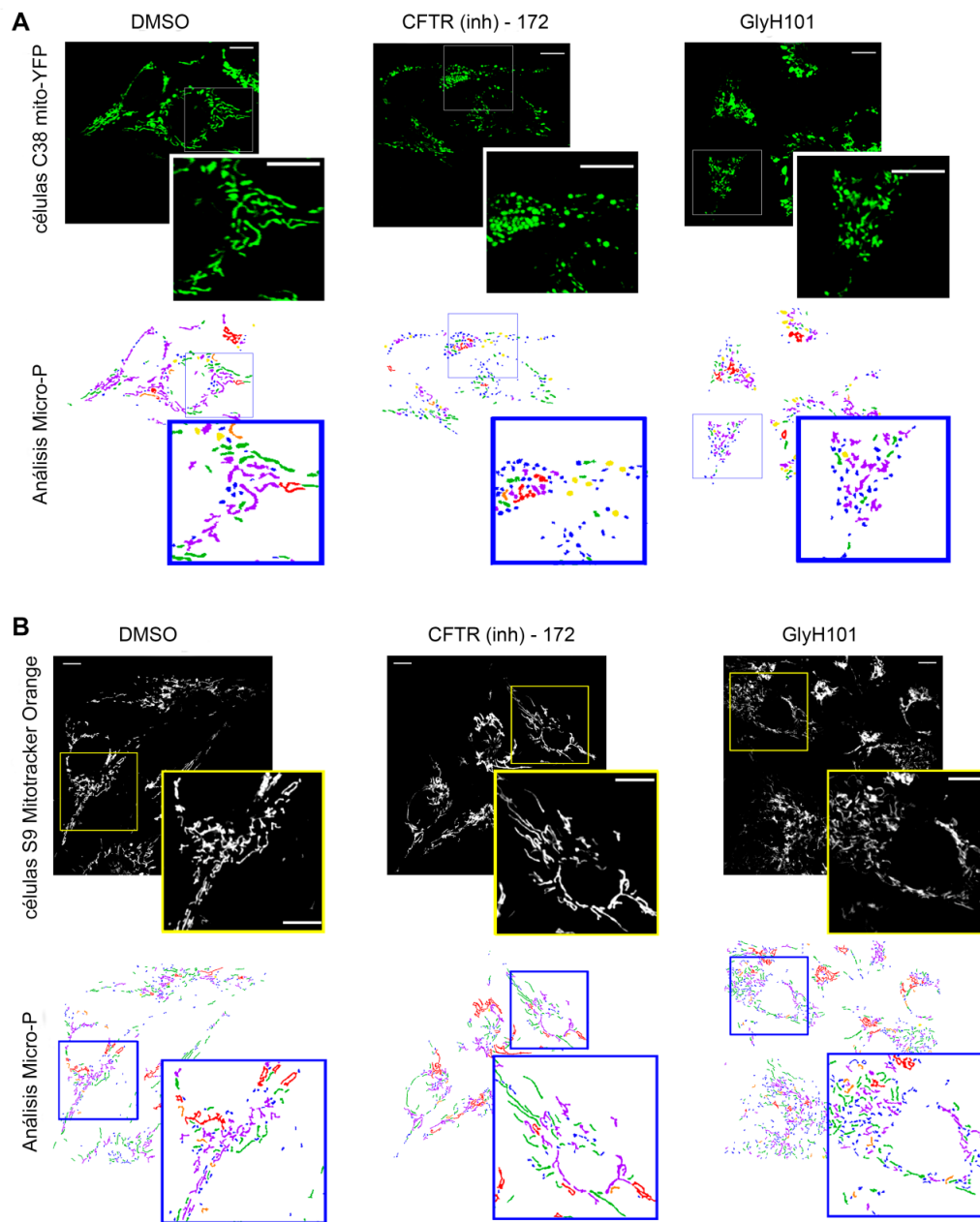


**Figura 13. La estimulación de la actividad del canal CFTR induce cambios en la morfología mitocondrial dependiente del canal CFTR.** Diagramas de caja que representan la cuantificación de la morfología de la red mitocondrial analizada con el macro MiNA en el programa Fiji. Los gráficos muestran **A)** estructuras mitocondriales individuales, **B)** la media de la cantidad de ramificaciones presentes por red mitocondrial, **C)** la media de la longitud de las ramificaciones mitocondriales. Los diagramas de caja representan los percentiles 25 y 75 alrededor de la mediana y las barras representan los valores máximo y mínimo (10 a 35 células seleccionadas al azar para cada tratamiento:  $n=3$  experimentos independientes). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  indican una diferencia significativa con respecto a las células AMPc IB3-1 o IB3-1. #### indica  $p < 0.001$  entre las células tratadas con AMPc y las no tratadas. Se utilizaron ANOVA de dos vías.

## **4.2. La inhibición de la actividad del CFTR induce fragmentación de la red mitocondrial**

Para respaldar los resultados anteriores y determinar si la actividad del canal CFTR se encuentra involucrada en la regulación de la red mitocondrial, se estudió la morfología mitocondrial en células S9 y C38 (CFTR funcional) tratadas con 2 inhibidores farmacológicos de la actividad del CFTR, el CFTR (inh)-172 (5  $\mu$ M) y GlyH101 (5  $\mu$ M), y con el vehículo (DMSO) como control. En este estudio, utilizamos una línea celular C38 transfectada con un plásmido que expresa YFP con señal de direccionamiento mitocondrial (desde aquí nombradas como C38 mito-YFP) obtenida previamente como parte de otra tesis de este laboratorio, y la línea celular S9 con mitocondria marcadas con la sonda Mitotracker Orange correspondientes este trabajo de tesis, ambos resultados recientemente publicados (García et al., 2021). En primer lugar, se utilizaron las células C38 mito-YFP ya que esta línea celular presenta una mayor actividad basal del CFTR (Flotte, Afione, Conrad, et al., 1993), lo que las convierten en un mejor modelo que las células S9 siendo más sensibles a los cambios producidos por la inhibición del canal. Las células fueron incubadas con los inhibidores a diferentes tiempos, las C38 a 1h, 2h y 4h y se capturaron imágenes por microscopía confocal. En la Figura 14A se muestran fotografías representativas del tiempo de incubación de 4 h con los inhibidores y vehículo, junto con el análisis realizado mediante Micro-P. Este experimento se realizó también en las células S9 para comparar los resultados en una línea celular con menor actividad basal del CFTR (Figura 14B). En ambos casos, la inhibición del canal CFTR mostró una red mitocondrial más fragmentada comparado con las células tratadas con el vehículo (DMSO) (Figura 14).

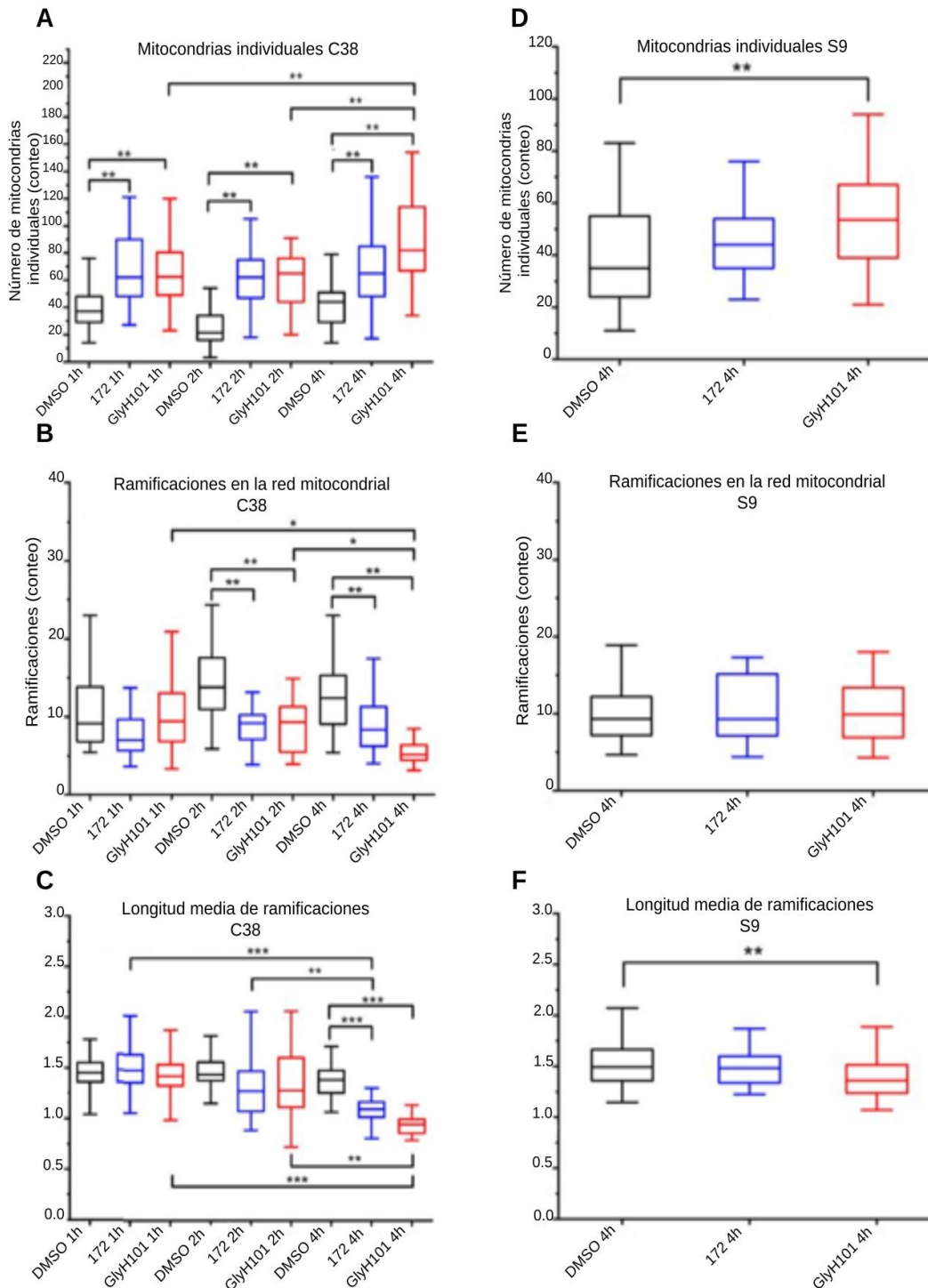
Para determinar de una manera cuantitativa la extensión de los niveles de fisión-fusión y de la alteración de la red mitocondrial por inhibición de la actividad del CFTR, se utilizaron los programas MiNA y Micro-P para cuantificar distintos parámetros morfológicos (Figuras 15 y 16).



**Figura 14. La inhibición de la actividad del CFTR induce a la fisión mitocondrial.** Las Células fueron incubadas en presencia de los inhibidores de CFTR GlyH101 (5  $\mu$ M), CFTR (inh) -172 (5  $\mu$ M), o vehículo (DMSO al 0,05%) durante 240 min. **(A)** Imágenes confocales de células vivas representativas de células C38 marcadas con el plásmido pMito-YFP para visualizar las mitocondrias. La barra de escala muestra 10  $\mu$ m. El cuadrado blanco indica una ampliación del área seleccionada. **(B)** Imágenes confocales de células vivas representativas de células S9 marcadas con la sonda química Mitotracker Orange. El cuadrado amarillo indica una ampliación del área seleccionada. El análisis Micro-P también estuvo representado por un código de color para la clasificación de las mitocondrias: glóbulos pequeños (azul), tubos simples (verde), tubos ramificados (violeta) y asas (rojo).

En el análisis MiNA (Figura 15), se observó un aumento significativo de mitocondrias individuales en presencia de ambos inhibidores, en especial con el inhibidor GlyH101 a las 4 h de tratamiento, comparadas con los tratamientos con el vehículo. Además, se observó que el tamaño y la longitud de las ramificaciones mitocondriales disminuyeron significativamente ( $p < 0,01$ ) en presencia de ambos inhibidores a las 4h. También se pudo observar que en presencia del inhibidor GlyH101, se evidencia un mayor efecto en comparación al inhibidor CFTR (inh)-172; este efecto se evidencia cuanto mayor es el tiempo del tratamiento. Estos cambios en la morfología de la red mitocondrial fueron observados en las células C38, en tanto que no fue reproducido en las células S9, posiblemente debido a la mayor actividad basal del CFTR en las células C38.



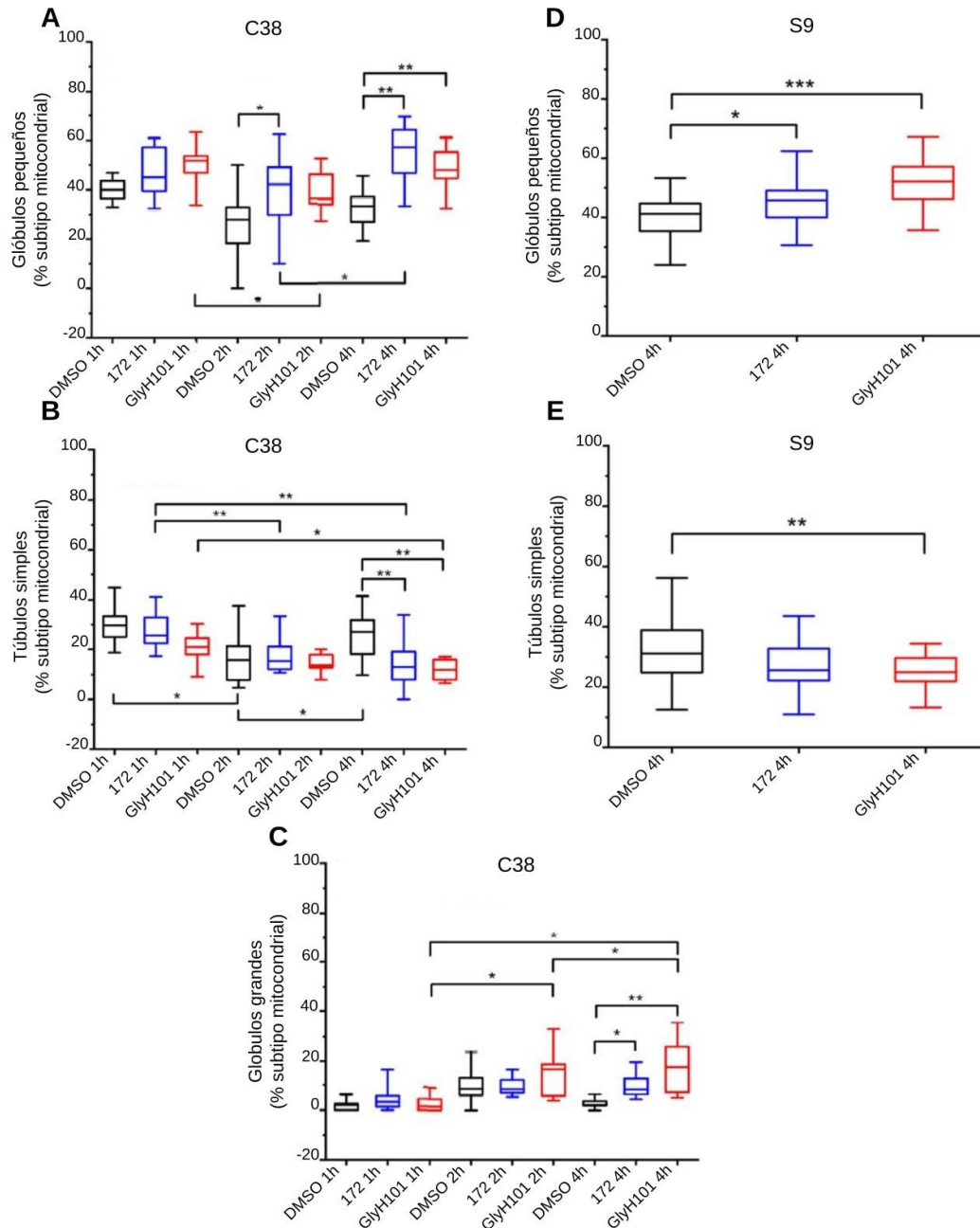


**Figura 15. La inhibición del CFTR reduce la interconexión entre las mitocondrias.** Tratamientos con inhibidores de CFTR en células C38 (A-C) y S9 (D-F). Los diagramas de caja representan la cuantificación de la morfología mitocondrial mediante el macro MiNA (20 células seleccionadas al azar para cada tratamiento; n=3 experimentos independientes). Las morfologías mitocondriales se clasificaron como (A-D) mitocondrias individuales; (B-E) cantidad

de ramificaciones (conteo); y **(C-F)** longitud media de las ramificaciones ( $\mu\text{m}$ ). Los límites de diagramas de caja representan los percentiles 25 y 75 alrededor de la mediana, y los bigotes representan los valores máximo y mínimo. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido por Tukey para comparar las diferencias entre todos los grupos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Por otra parte, la cuantificación de subtipos mitocondriales por Micro-P mostró un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) glóbulos pequeños en presencia del inhibidor CFTR (inh)-172 en comparación a lo observado en condiciones basales y con GlyH101. En cuanto al subtipo de los tubos simples, se puede observar una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) de los mismos en presencia de los inhibidores en especial en presencia de GlyH101. Estos resultados sugieren un aumento de la fisión mitocondrial mediado por la inhibición del CFTR. Además, en las células C38 se observó un aumento significativo de los glóbulos grandes (mitocondrias hinchadas) en presencia de estos inhibidores en comparación con el control. Si bien los resultados mostraron cambios similares en la morfología mitocondrial en las células C38 y S9, los mismos fueron más notorios en C38, probablemente debidos a una mayor actividad basal del CFTR en células C38.

En suma, los resultados obtenidos sugieren que la actividad alterada y/o la inhibición del CFTR están relacionadas con un aumento en la fragmentación mitocondrial, generando mitocondrias más pequeñas y menos ramificadas. De este modo, la actividad de CFTR podría estar desempeñando algún papel en la modulación del equilibrio de fusión-fisión mitocondrial, el cual se encontraría alterado cuando la actividad de CFTR se encuentra afectada.

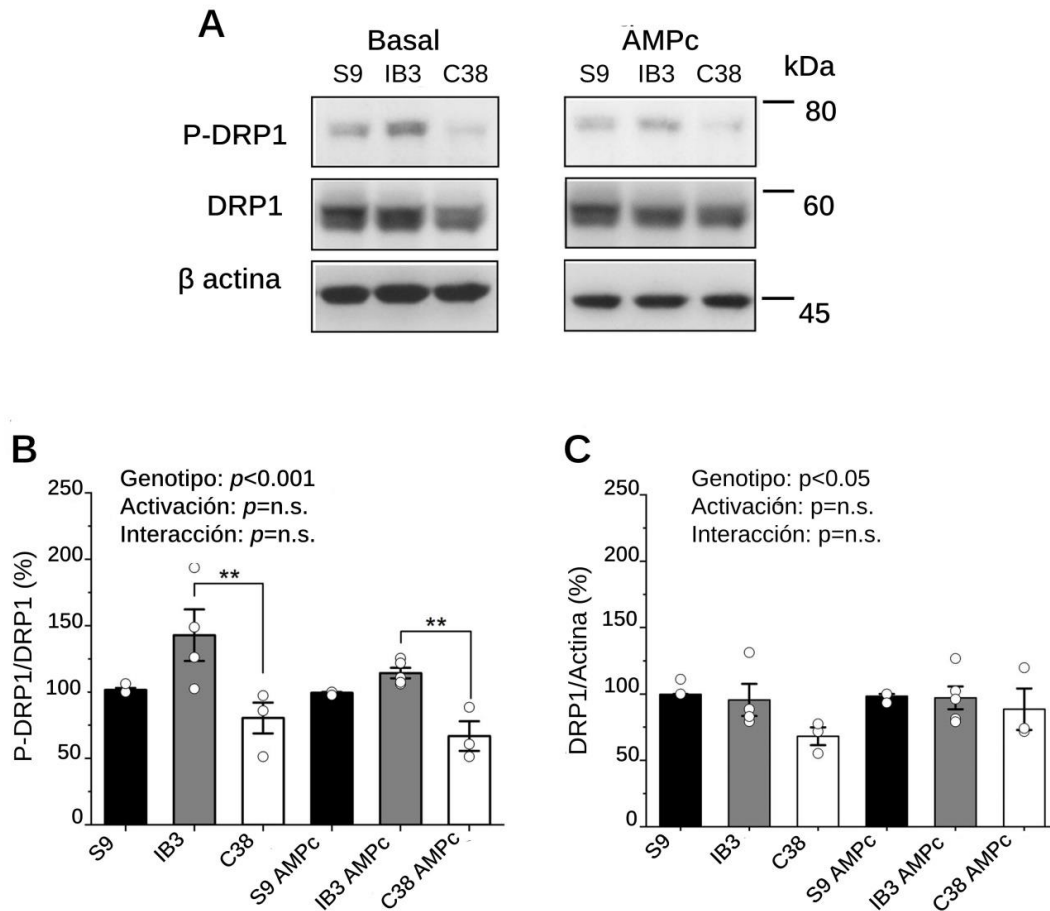


**Figura 16. La inhibición del CFTR induce fisión mitocondrial.** Tratamientos con inhibidores de CFTR en células C38 (A-C) y S9 (D-E). Gráficos de la cuantificación del subtipo mitocondrial analizados mediante el software Micro-P (20 células seleccionadas al azar para cada tratamiento; n=3 experimentos independientes). Los subtipos de mitocondrias se clasificaron como (A-D) glóbulos pequeños (B-E) túbulo simples (C) glóbulos grandes o hinchados: y expresados como porcentaje del subtipo de mitocondrias. Los límites de diagramas de caja representan los percentiles 25 y 75 alrededor de la mediana, y los bigotes representan los

valores máximo y mínimo. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido por Tukey para comparar las diferencias entre todos los grupos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### **4.3. Estudio de la expresión de proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial en modelos de fibrosis quística**

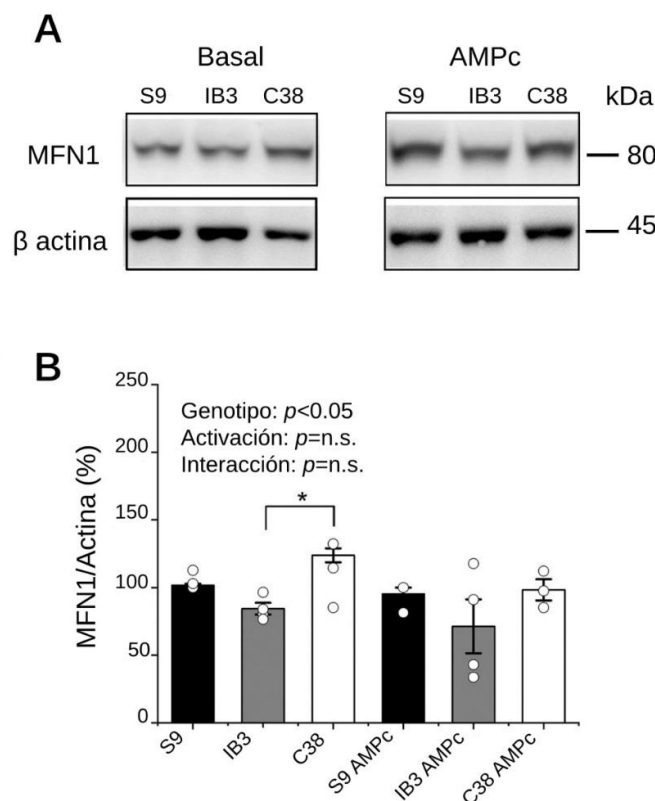
La maquinaria de fusión/fisión mitocondrial está regulada por varias proteínas. La expresión de algunos componentes proteicos de esta maquinaria se midió en células IB3-1, S9 y C38, en condiciones basales y estimuladas con AMPc. En primer lugar, se analizó la expresión y activación de la proteína DRP1 y su fosforilación la serina 616 (S616) por Western blots (WBs). La activación de DRP1 se encuentra involucrada en la inducción del proceso de fisión mitocondrial, causando el reclutamiento de esta proteína en las mitocondrias para iniciar dicho proceso. Esto permite correlacionar los niveles de activación de dicha proteína con el nivel de fisión mitocondrial y su dependencia respecto a la actividad del CFTR. En la Figura 17, se muestra el WB y la cuantificación densitométrica correspondiente a la expresión de p(S616)-DRP1/DRP1 y DRP1/ $\beta$ -actina. Como puede observarse en la Figura 17B, los niveles de p(S616)-DRP1/DRP1 aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) en las células IB3-1 en comparación con las células C38 en condiciones basales. La misma diferencia significativa se observó en las células IB3-1 en condiciones de estimulación con AMPc, aunque con una activación menor de DRP1 que en condiciones basales. En el caso de las células S9 se observó una menor activación de DRP1 respecto a las células IB3-1, aunque la misma no resultó significativa. Con respecto a la expresión total de DRP1, no se observaron cambios significativos en las células IB3-1 en comparación con las células S9 y C38 en las dos condiciones estudiadas, aunque se pudo observar una tendencia a estar más reducida en las células C38 en comparación con las células IB3-1 y S9 en condiciones basales (Fig. 17C).



**Figura 17. La activación de la proteína de fisión DRP1 (p616-DRP1) en las células IB3-1 (FQ) fue reducida en las células S9 y C38 con expresión del CFTR corregida. A)** WBs representativos correspondientes a los niveles de fosforilación de DRP1 en S616, DRP1 total y  $\beta$ -actina, expresado en células IB3-1 (barra gris), S9 (barra negra) y C38 (barra blanca). La relación P-DRP1/DRP1 total se cuantificó mediante densitometría y se representó gráficamente como porcentaje (%) en relación con los valores de las células S9 (**B**). Los niveles de DRP1 total se cuantificaron utilizando  $\beta$ -actina como control de carga (**C**). Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM (de  $n=5$  experimentos independientes) por ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. \*  $p < 0,05$  indica una diferencia significativa para cada grupo de células tratadas o no tratadas con AMPc.

Por otra parte, el aumento en el número de mitocondrias fisionadas puede deberse a una alteración en la maquinaria de fusión, por lo que es

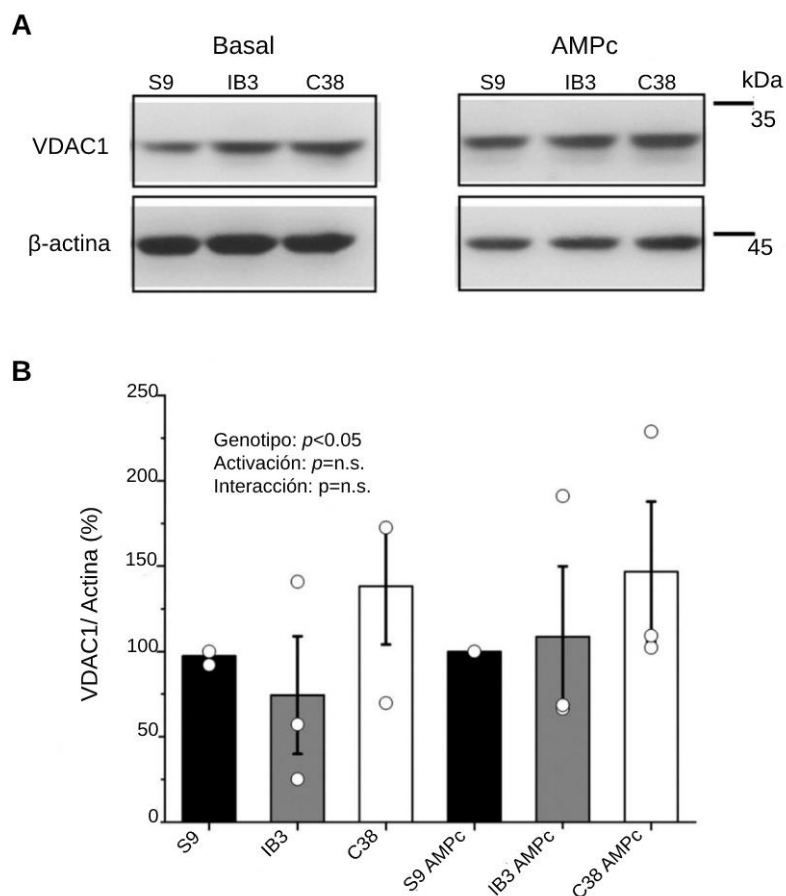
necesario determinar los niveles de proteínas involucradas en la regulación de la fusión mitocondrial, como por ejemplo MFN1. En la Figura 18, se muestra el WB y la cuantificación densitométrica correspondiente a la expresión de MFN1/ $\beta$ -actina. Tanto en condiciones basales como bajo la estimulación del CFTR por AMPc, las células IB3-1 mostraron una tendencia de disminución en los niveles de expresión de MFN1 con respecto a las células que expresan CFTR. Sin embargo, dicha reducción en IB3-1 fue significativa ( $p < 0,05$ ) comparada con las células C38 incubadas en condiciones basales (Figura 18). Estos resultados podrían deberse a la mayor actividad basal del CFTR en las células C38 que en las células IB3-1 y S9, lo que sugiere una relación entre la actividad de CFTR modulación de la fusión mitocondrial a través de la proteína MFN1.



**Figura 18. La expresión de la proteína de fusión MFN1 se encontró reducida en células IB3-1 con respecto a las células C38 con actividad basal del CFTR. A)** WBs representativos correspondientes a los niveles de MFN1 expresado en células IB3-1 (barra gris), S9 (barra negra) y C38 (barra blanca). **(B)** La expresión de MFN1 se cuantificó mediante densitometría y

se representó gráficamente como un porcentaje (%) en relación con los valores de las células S9, utilizando actina como control de carga. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM (n=5 experimentos independientes) por ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. \*  $p < 0,05$  indica una diferencia significativa para cada grupo de células tratadas o no tratadas con AMPc.

Finalmente, los niveles de VDAC1 (proteína involucrada en el transporte iónico en la membrana externa mitocondrial) no mostraron cambios significativos. Sin embargo, se observó una tendencia a un aumento en las células C38 en comparación a las células IB3-1 y S9, tanto en condiciones basales como bajo la estimulación con AMPc (Figura 19). Estos resultados mostraron una gran dispersión, por lo que nuevos experimentos deberán ser realizados para determinar con mayor precisión el comportamiento de VDAC1 frente a la expresión y actividad del canal CFTR.



**Figura 19. La expresión de VDAC1 mostró una tendencia de aumento en células C38. A)** WBs representativas correspondientes a los niveles de VDAC1 expresado en células IB3-1

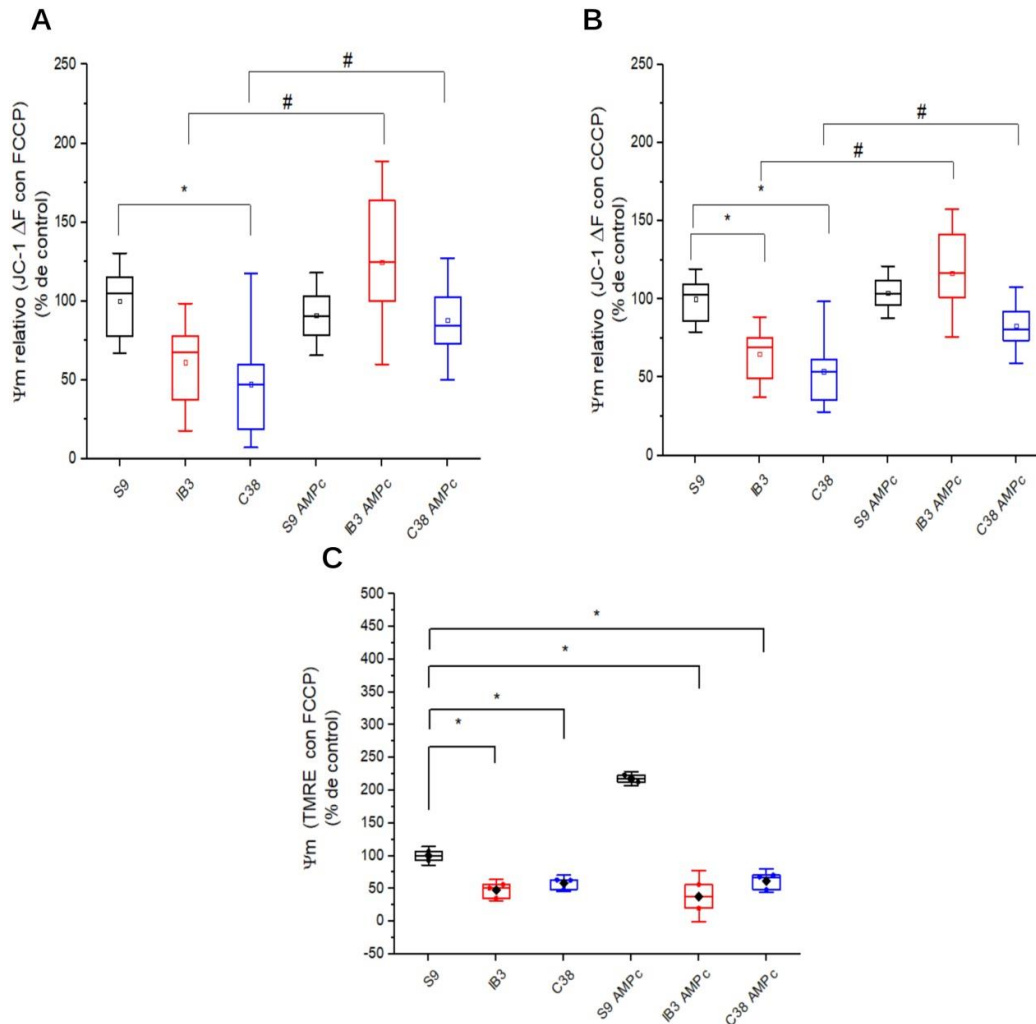
(barra gris), S9 (barra negra) y C38 (barra blanca). **(B)** La expresión de VDAC1 se cuantificó mediante densitometría y se representó gráficamente como un porcentaje (%) en relación con los valores de las células S9, utilizando  $\beta$ -actina como control de carga. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM (de n=5 experimentos independientes) por ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  indica una diferencia significativa para cada grupo de células tratadas o no tratadas con AMPc.

#### **4.4. Estudio de la existencia cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_m$ ) en los modelos utilizados para el estudio de fibrosis quística.**

Se analizó el  $\Psi_m$  en los modelos celulares utilizados para determinar si los cambios en la morfología mitocondrial fueron dependientes de cambios en el mismo, Para la medición del  $\Psi_m$  utilizamos dos sondas fluorescentes y dos metodologías de medición diferentes. En primer lugar, utilizamos la sonda fluorescente JC-1 para medir el  $\Psi_m$  en células IB3-1, S9 y C38, incubadas en presencia o ausencia de AMPc, y se midió en espectrofluorímetro de fluorescencia. Como control de despolarización se utilizaron los desacoplantes mitocondriales FCCP y CCCP, cuyos valores fueron utilizados para restar la fluorescencia que no correspondía a cambios en el  $\Psi_m$  ("background"). Como puede observarse en la Figura 20, los resultados obtenidos con FCCP (Figura 20A) y con CCCP (Figura 20B) fueron similares, aunque se observaron mayores diferencias y menor dispersión de los datos cuando se realizó la substracción del "background" con CCCP. Esto puede deberse a diferencias en la potencia de ambos desacoplantes o en el tiempo de incubación requerido para desacoplar el  $\Psi_m$ .

En la Figura 20B, donde se utilizó CCCP, se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en el  $\Psi_m$  en las células IB3-1 y C38 en comparación con las células S9 incubadas en condiciones basales de actividad del CFTR. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el  $\Psi_m$  entre las distintas líneas celulares incubadas en condiciones de estimulación del CFTR. Incluso, se observó un aumento en el  $\Psi_m$  en las células IB3-1 y C38 comparado con las mismas células incubadas en condiciones basales.





**Figura 20. Gráficos representativos del potencial de membrana ( $\Psi_m$ ).** **A)** Cuantificación del potencial de membrana en presencia de FCCP con JC-1 esquematizado mediante diagrama de caja. **B)** Cuantificación del potencial de membrana en presencia de CCCP con JC-1 esquematizado mediante diagrama de caja. **C)** Cuantificación del potencial de membrana en presencia de FCCP con TMRE, restándole los valores en condiciones basales. Los diagramas de caja para el análisis del  $\Psi_m$  representan los percentiles 25 y 75 alrededor de la mediana y las barras representan los valores máximo y mínimo (se realizó un solo experimento con 10 replicados técnicos). \*  $p < 0,05$  indica una diferencia significativa en comparación a las células S9 y  $p < 0,05$  entre las células tratadas con AMPc y las no tratadas. Se utilizó el test ANOVA de una vía.

Por otra parte, se realizó la medición del  $\Psi_m$  utilizando la sonda TMRE mediante citometría de flujo. Con esta metodología se obtuvieron resultados

similares que con JC-1 en las células incubadas en condiciones basales, con un  $\Psi_m$  significativamente reducido en las células IB3-1 y C38 comparadas con las células S9. Sin embargo, en condiciones de estimulación del CFTR con AMPc el resultado fue el mismo que en condiciones basales, a diferencia de los resultados obtenidos mediante JC-1 donde no se observaron diferencias significativas.

## 5. DISCUSIÓN

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos sobre la modulación de la morfología mitocondrial mediada por el canal CFTR y su efecto sobre los niveles de expresión de las proteínas reguladoras del equilibrio fusión-fisión mitocondrial. Se contrastarán los resultados obtenidos con la bibliografía sobre el tema y su relevancia en FQ.

### 5.1. Modulación de la morfología mitocondrial mediada por el canal CFTR

El primer objetivo de este trabajo consistió en demostrar el rol del CFTR, canal afectado en FQ, sobre la modulación de la morfología mitocondrial. Para ello analizamos la red mitocondrial en células IB3-1 (FQ) y se la comparó con la red mitocondrial de células S9 (células IB3-1 que expresan CFTR-salvaje) y células C38 (células IB3-1 que expresan una versión truncada de CFTR, pero funcional). Una particularidad de este modelo celular es que las células S9 y C38 expresan una versión diferente de un CFTR funcional. Estas variantes de CFTR podrían conferir actividades o características diferentes, más allá del transporte de Cl<sup>-</sup>, en condiciones basales o estimuladas (cóctel de AMPc) del canal. La red mitocondrial se analizó con dos herramientas diferentes de acceso libre, MiNA y Micro-P (Valente et al., 2017) (Peng et al., 2011), observándose alteraciones en la morfología de la red mitocondrial en las células IB3-1 con respecto a las células que expresan CFTR, aunque esto se observó principalmente en condiciones de estimulación del CFTR en comparación con las condiciones basales. Tanto el aumento del subtipo mitocondrial globular pequeño (Micro-P) en la línea celular IB3-1, como así también el aumento de estructuras individuales y la disminución en la cantidad de ramificaciones (interconexiones) y longitud de las mismas (MiNA) con respecto a las células que expresan CFTR, sugieren una morfología mitocondrial con una mayor fragmentación en células FQ (García et al., 2021). Estos resultados sugieren que la actividad del CFTR y el estado de activación (condiciones basales o estimuladas) podrían jugar un papel en la remodelación

de la red mitocondrial, por lo que el deterioro de la actividad del CFTR en células FQ podría inducir un aumento de la fisión mitocondrial con consecuencias adversas sobre la bioenergética celular.

Para respaldar los resultados anteriores y descartar posibles cambios producidos por la selección clonal, también utilizamos un enfoque farmacológico para inhibir la actividad del canal CFTR y simular un estado FQ. Se utilizaron las líneas celulares C38 y S9. En el caso de las células C38, ya contábamos con células transfectadas y seleccionadas para expresar de manera estable mito-YFP. En el caso de las células S9, utilizamos MitoTracker Orange como sonda de marcación mitocondrial. Las células C38 tienen la particularidad de una alta actividad basal del CFTR (Flotte, Afione, Conrad, et al., 1993), lo que nos permite evitar el uso de AMPc para estimular el canal y superar los efectos indirectos de la activación de PKA sobre la fusión mitocondrial (Valsecchi, Ramos-Espiritu, Buck, Levin, & Manfredi, 2013) (Di Benedetto, Gerbino, & Lefkimmiatis, 2018) (Cribbs & Strack, 2007) (Amer & Hebert-Chatelain, 2018). Analizamos la morfología mitocondrial en estas líneas celulares tratadas con los inhibidores más comunes y específicos de la actividad de CFTR, CFTR(inh)-172 (Caci et al., 2008) (Ma et al., 2002) (Kopeikin, Sohma, Li, & Hwang, 2010) y GlyH101 (Muanprasat et al., 2004). La  $IC_{50}$  de ambos inhibidores es similar y, en trabajos previos de este laboratorio, hemos reportado efectos similares sobre los niveles de expresión de la proteína RPS27 (“Ribosomal protein S27”) dependiente de  $Cl^-$ , con un  $ED_{50}$  de  $\sim 2 \mu M$  para ambos inhibidores en células cultivadas (Valdivieso, Mori, Clazure, Massip-Copiz, & Santa-Coloma, 2017). Tanto en células C38 como S9, la inhibición de la actividad del CFTR provocó un aumento de la fragmentación mitocondrial, con un aumento en el número de mitocondrias pequeñas redondeadas y la formación de redes mitocondriales ramificadas más cortas que en las células control. Sin embargo, los cambios más significativos fueron observados en las células C38 con respecto a las células S9, lo cual era esperable debido a que se ha reportado una mayor actividad basal del CFTR en estas células (Flotte, Afione, Solow, et al., 1993)

. En general, ambos inhibidores indujeron cambios en el número de estructuras mitocondriales individuales, cantidad de mitocondrias ramificadas y

longitudes de las ramificaciones que sugieren un aumento de la fragmentación mitocondrial provocada por la inhibición del canal CFTR (García et al., 2021).

## **5.2. Estudio de la expresión de proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial en modelos FQ**

Para estudiar si los cambios en la morfología de la red mitocondrial mediada por el canal CFTR la activación podrían deberse a cambios en el equilibrio de fisión y fusión mitocondrial, se analizó mediante WBs la expresión de proteínas claves involucradas en la maquinaria de dinámica mitocondrial. Por un lado, estudiamos la proteína DRP1, involucrada en la maquinaria de fisión mitocondrial, y su fosforilación en el sitio de activación de la fisión mitocondrial correspondiente a la S616. También analizamos la expresión de MFN1, una proteína necesaria e inductora de la fusión de la MME. Curiosamente, los cambios en los niveles de expresión de p (616)-DRP1 y MFN1 fueron mayores en las células incubadas en condiciones basales respecto a las células estimuladas con AMPc. Esta diferencia entre las células en condiciones basales y estimuladas del CFTR podría explicarse por el rol del AMPc en la inducción de la fusión mitocondrial a través de la activación de PKA (Valsecchi et al., 2013) (Di Benedetto et al., 2018) (Amer & Hebert-Chatelain, 2018) (Cribbs & Strack, 2007). Por tanto, el tratamiento con el cóctel de AMPc podría compensar el efecto de la actividad del CFTR sobre la regulación de la fisión-fusión mitocondrial. Asimismo, el aumento de la concentración de AMPc podría inducir un “crosstalk” entre la vía inducida por el CFTR y la vía de PKA en la regulación de la remodelación mitocondrial, por lo que deberán analizarse con mayor profundidad en estudios futuros. Aquí, demostramos que la presencia de mutaciones del CFTR en las células IB3-1 fue responsable de una mayor fragmentación mitocondrial en las condiciones estimuladas comparado con las células que expresan el CFTR, lo que sugiere que la actividad y expresión del CFTR juega un papel en la regulación de la morfología mitocondrial, independientemente del AMPc.

Además de las proteínas de la maquinaria de dinámica mitocondrial, medimos el nivel de expresión de la proteína VDAC1 (“Voltage-Dependent Anion Channel”) para probar el estado de otras proteínas mitocondriales que no participan directamente en dicha maquinaria. VDAC1 es uno de los canales más abundantes en el MME que regula el transporte de iones, metabolitos y nucleótidos. Además, VDAC1 ha sido asociado con la regulación de la apoptosis (Abu-Hamad, Sivan, & Shoshan-Barmatz, 2006) (Dubey, Godbole, & Mathew, 2016) (Camara, Zhou, Wen, Tajkhorshid, & Kwok, 2017) y la autofagia (mitofagia) (Narendra, Kane, Hauser, Fearnley, & Youle, 2010) (Geisler et al., 2010) (Sun, Vashisht, Tchieu, Wohlschlegel, & Dreier, 2012), ambos procesos relacionados con la función metabólica de las mitocondrias y la morfología mitocondrial. VDAC1 mostró una tendencia a disminuir en las células IB3-1 comparadas con las células C38, aunque no significativamente, probablemente debido a la alta dispersión en los resultados que deberán ser repetidos en futuros trabajos. De todos modos, la disminución de la expresión de VDAC1 en células con la expresión/actividad del CFTR afectada (IB3-1) estaría en concordancia con los resultados obtenidos con los inhibidores del CFTR (no mostrados en esta tesis), donde mostramos una reducción de VDAC1 en presencia de CFTR(inh)-172 y GlyH101 a partir de las 2 h de tratamiento (García et al., 2021). Cambios similares se observaron con la expresión de MFN1, sugiriendo una modulación negativa de estas proteínas causada por la inhibición de la actividad del canal CFTR. De acuerdo con nuestros resultados, algunos autores han informado que VDAC1 podría regularse y estar estrechamente relacionada con la función del CFTR (Thinnes, 2014) (Yan et al., 2016), aunque se necesitan investigaciones más profundas para determinar la relación entre CFTR, VDAC1 y la morfología mitocondrial.

### **5.3. Potencial de membrana mitocondrial en modelos de FQ.**

Para evaluar las diferencias en el  $\Psi_m$  en células que expresan CFTR funcional (S9 y C38) respecto a células que presentan mutaciones (IB3-1), se utilizaron dos metodologías diferentes basadas en el uso de sondas fluorescentes sensibles al cambio de  $\Psi_m$ . En este tipo de mediciones, es

fundamental poder obtener los mismos resultados mediante distintas metodologías para brindar mayor robustez a los mismos y poder descartar errores que pudiesen producirse. Por esta razón, se comenzó la puesta a punto para medir el  $\Psi_m$  mediante la tinción con el colorante TMRE por citometría de flujo y con el colorante JC-1 por espectrofluorímetro de placas. Los experimentos se realizaron con células IB3-1, C38 y S9 en condiciones basales y de estimulación del CFTR con AMPc. Como controles positivos se utilizaron los desacoplantes mitocondriales FCCP y CCCP.

Los resultados obtenidos mediante ambas metodologías muestran que en condiciones basales hay una disminución del  $\Psi_m$  en las células IB3-1 (FQ) en comparación con las células S9 (CFTR salvaje), en tanto que no se observaron cambios entre las células IB3-1 y C38 (CFTR funcional, pero deletado). Esta discrepancia, podría ser explicada como consecuencia de la deleción de un fragmento en el extremo N-terminal del CFTR en la línea celular C38, lo que sugiere que este fragmento podría estar involucrado en la regulación del  $\Psi_m$ . Es importante destacar que el canal CFTR no es un canal aislado, sino que establece numerosas interacciones con otras proteínas desde su cara citoplasmática (Lerías et al., 2018) (Nguyen, Kim, Cao, & Hirota, 2021). Algunos autores proponen que el CFTR podría actuar como un centro de señalización (Kunzelmann & Mehta, 2013) (Bozoky et al., 2017) , por lo que tanto su actividad como su estructura podrían modular diversos procesos celulares.

Por otra parte, en el caso de las células bajo la estimulación del CFTR con AMPc, los resultados obtenidos fueron opuestos entre ambas metodologías utilizadas. En el caso de las mediciones realizadas con JC-1 por ejemplo, el  $\Psi_m$  aumentó significativamente en las células IB3-1 con respecto a las células S9 y C38, en tanto que en la medición por TMRE los resultados fueron similares a los observados en condiciones basales e incluso más pronunciadas. La disminución del  $\Psi_m$  en las células IB3-1 se encuentra en concordancia con los trabajos de otros autores que señalan una reducción del  $\Psi_m$  en células FQ (Atlante et al., 2016) (Antigny, Norez, Becq, & Vandebrouck, 2011) (Robinson & Roepe, 1996).

Los resultados presentados aquí sugieren una alteración en el  $\Psi_m$  en presencia de mutaciones del CFTR, aunque no permiten confirmar una relación directa entre los cambios en la morfología mitocondrial y los cambios observados en el  $\Psi_m$  mediados por la actividad del CFTR. Se precisa establecer una metodología más precisa para estas mediciones y repetir los experimentos soportados en distintas metodologías. Por otra parte, estos resultados nos sugieren también que la modulación de la morfología mitocondrial a través de la actividad del CFTR no sería producida por cambios en el  $\Psi_m$ .

Cabe destacar que, debido a la situación de pandemia, este experimento solo fue realizado una vez con cada metodología, por lo que se deberán realizar a futuras investigaciones nuevos ensayos y puestas a punto para lograr una medición más precisa.

#### **5.4. Perspectivas sobre el estudio de la dinámica mitocondrial en FQ**

Durante el progreso de este trabajo, otros autores han demostrado recientemente fallas inmunometabólicas en macrófagos FQ, en presencia o ausencia de infección con *Burkholderia cenocepacia*, con un aumento en la fragmentación mitocondrial (Hamilton et al., 2020). Por otra parte, Rimessi y col. (Rimessi, Bezzerri, Patergani, et al., 2015) han reportado la regulación del inflammasoma NLRP3 en modelos de FQ, mediada por el  $Ca^{2+}$  mitocondrial, en la respuesta inflamatoria inducida por *P. aeruginosa*. Sin embargo, estos trabajos no exploran los mecanismos por los cuales la falla del canal CFTR predispondría a un fenotipo de inflamación estéril y a una mayor susceptibilidad frente a infecciones bacterianas (Rimessi, Bezzerri, Patergnani, et al., 2015) (Hamilton et al., 2020). En concordancia con nuestros resultados, Antigny et al. (Antigny et al., 2009) reportaron previamente un aumento de la fragmentación mitocondrial en las células CF-KM4 (FQ) mediante microscopía electrónica, aunque el estudio no discrimina si el efecto fue producido por cambios en las proteínas de dinámica mitocondrial o si fue causado por la actividad del CFTR.



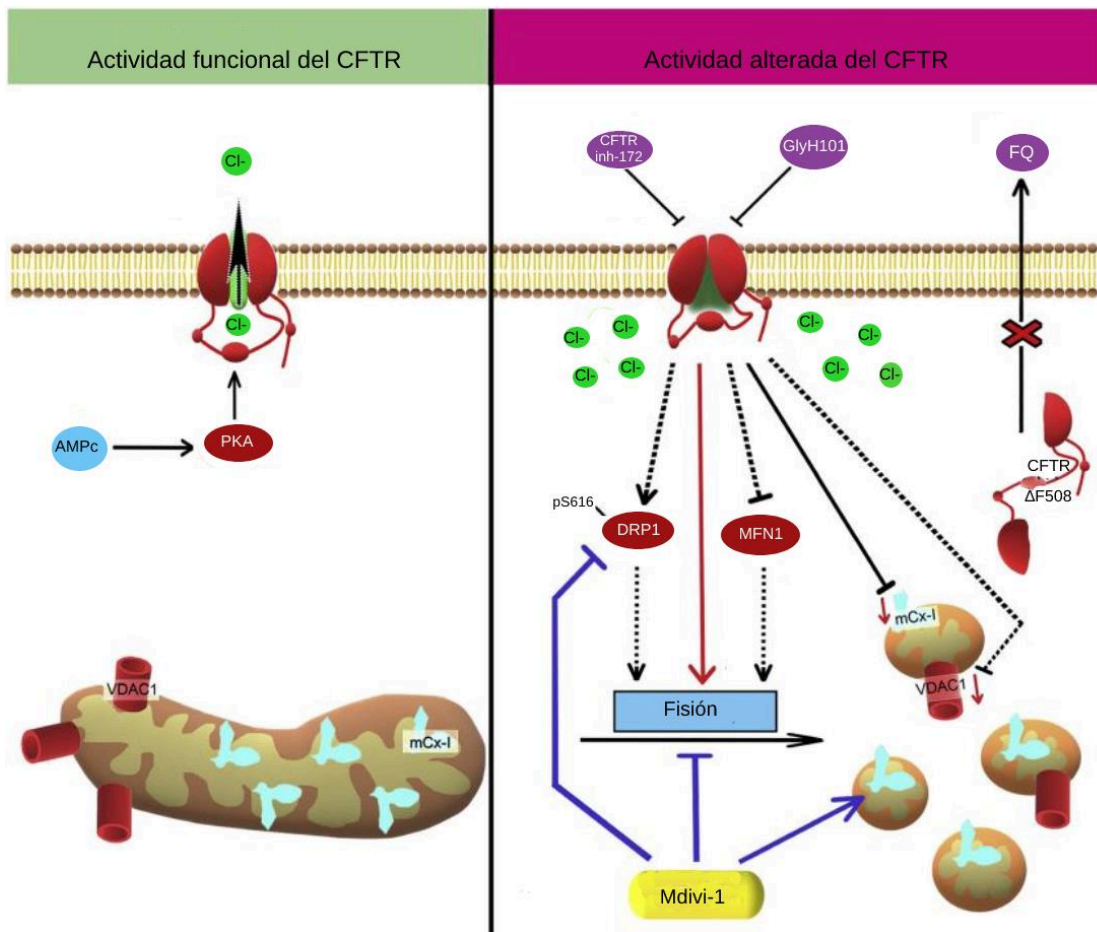
Por esta razón, decidimos profundizar en los mecanismos por los cuales el canal CFTR podría estar regulando la remodelación de la red mitocondrial, posiblemente a través de la regulación de la dinámica mitocondrial.

En este trabajo, hemos explorado los posibles mecanismos involucrados en la modulación de la morfología mitocondrial y el rol del canal CFTR, como hemos reportado recientemente, donde el tratamiento con el inhibidor de la fisión mitocondrial Mdivi-1 permitió restaurar la actividad del Clm en células IB3-1 a los niveles observados en las células control (García et al., 2021). Nuestros resultados sugieren que el aumento de los niveles de p(616)-DRP1 y la reducción de los niveles de MFN1 en las células IB3-1 (en condición basal) podrían explicar la predisposición a un aumento de la respuesta inflamatoria, probablemente exacerbada durante el transcurso de infecciones con diferentes cepas bacterianas.

Estos resultados se encuentran estrechamente relacionadas con trabajos previos de nuestro laboratorio que muestran un aumento de la secreción de IL-1 $\beta$  en las células FQ y la regulación de la actividad del Clm mediante un bucle autocrino de dicha citoquina (Clauzure et al., 2014). A su vez, previamente hemos reportado la dependencia del Cl<sup>-</sup> para la secreción de IL-1 $\beta$  (Clauzure et al., 2017), lo que sugiere la posibilidad de un posible círculo vicioso entre la fisión mitocondrial y la secreción de IL-1 $\beta$  provocada por el deterioro de la actividad CFTR y la alteración de la concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> provocada. El tratamiento con el antagonista de IL1RN (anakinra) para detener el bucle de IL-1 $\beta$  fue capaz de restaurar la actividad de Clm, lo que sugiere que el deterioro de CFTR podría implicar alguna interrelación entre la inmunidad innata y la función mitocondrial (Clauzure et al., 2014). Por otra parte, también reportamos un vínculo que ilustra esta relación CFTR-inflamación-mitocondrias en un modelo celular de EPOC mediante el tratamiento de células Calu-3 (provenientes de vías respiratorias epiteliales) con un extracto de humo concentrado (CSE) (Valdivieso et al., 2018). Esta regulación se produce aún en ausencia de infección bacteriana, lo que sugiere una susceptibilidad inmunológica innata en pacientes con actividad alterada del CFTR (Valdivieso & Santa Coloma, 2013) (Rimessi, Bezzetti, Paterni, et al., 2015).

En los últimos 20 años, la función mitocondrial ha tomado relevancia debido su rol en la regulación de diversas señales y su participación en la respuesta inmune innata frente diversas infecciones, principalmente en enfermedades respiratorias (West, Shadel, & Ghosh, 2011) (Banoth & Cassel, 2018) (Angajala et al., 2018) (Valdivieso & Santa Coloma, 2013) (Chakraborti, Chakraborti, Das, & Chattopadhyay, 2019). La alteración de la dinámica mitocondrial podría tener consecuencias sobre la correcta función mitocondrial y muchos de los procesos que regula (bioenergética, apoptosis, inmunidad innata, entre otros) (Youle & Van Der Bliet, 2012) (Hoppins & Nunnari, 2012) (Suen, Norris, & Youle, 2008) (Bellance et al., 2009) (Rossignol & Karbowski, 2009) (Benard et al., 2007) (Detmer & Chan, 2007) (Duvezin-Caubet et al., 2006). La integridad del correcto balance de la fisión y fusión mitocondrial tiene un rol determinante en la reparación y renovación de los componentes mitocondriales dañados (Van der Bliet, Shen, & Kawajiri, 2013). Dos procesos principales regulan la dinámica mitocondrial, la maquinaria de fisión y fusión mitocondrial (Kraus & Ryan, 2017) (Smirnova et al., 2017) (D. C. Chan, 2006) (Griparic, Van Der Wel, Orozco, Peters, & Van Der Bliet, 2004) y la degradación de las mitocondrias no funcionales por mitofagia (Bordi, Nazio, & Campello, 2017) (Galluzzi, Kepp, & Kroemer, 2011) (Haeussler et al., 2020) (Tagaya & Arasaki, 2017) (Wang et al., 2020) (Twig & Shirihai, 2011). Tanto la dinámica mitocondrial como la autofagia han sido relacionadas con la producción y secreción de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , en íntima relación con la activación del inflammasoma (Missiroli et al., 2020) (Biasizzo & Kopitar-Jerala, 2020) (Claude-Taupin, Bissa, Jia, Gu, & Deretic, 2018) (Dai, Zhang, Li, Chen, & Chai, 2017) (de Luca et al., 2014) (Joosten, Netea, & Dinarello, 2013) (Batista et al., 2021). Varios trabajos ya han reportado alteraciones en la autofagia en distintos modelos de FQ (Luciani et al., 2010) (Abdulrahman et al., 2011) (Caution et al., 2019) (Junkins, McCormick, & Lin, 2014) (Luciani et al., 2012), por lo que la mitofagia podría estar involucrada en la regulación de la morfología mitocondrial y la secreción de IL-1 $\beta$  mediada por el canal CFTR. Por esta razón, la comprensión del mecanismo de regulación mitocondrial mediada por el canal CFTR podría ser importante no solo en un contexto de FQ, sino también para otras enfermedades que podrían presentar actividad diferencial o expresión del canal CFTR como algunos cánceres (Xie et al., 2013) (J. Zhang,

Wang, Jiang, & Chan, 2018) (J. T. Zhang et al., 2013). Recientemente, reportamos, junto con los resultados de esta tesis, que la inhibición de la fisión mitocondrial mediante el inhibidor Mdivi-1 fue capaz de restaurar la actividad del Clm en células IB3-1 (García et al., 2021). Estos resultados sugieren que la falla en la actividad del Clm, y de otros complejos mitocondriales, en modelos de FQ estarían estrechamente relacionados con la modulación de la dinámica mitocondrial mediada por la actividad del canal CFTR (Figura 21)



**Figura 21. Resumen Gráfico. Comparación entre la actividad funcional del CFTR y los efectos de alteraciones en la actividad del CFTR.**

## CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la actividad CFTR está involucrada en la remodelación o regulación de la morfología mitocondrial, produciendo una fragmentación de la red mitocondrial cuando la actividad del canal se encuentra reducida o alterada. Dicha alteración de la morfología mitocondrial estaría mediada, al menos en parte, por la regulación de algunas proteínas involucradas en la regulación de la dinámica mitocondrial, como la activación de DRP1 y MFN1, que conducirían a un aumento de la fisión mitocondrial. Aunque los resultados no son concluyentes, la alteración de la morfología mitocondrial mediada por la actividad del canal CFTR no sería una consecuencia de un cambio en el potencial de membrana mitocondrial, aunque el mismo podría depender del estado general de la red mitocondrial. La alteración de la dinámica mitocondrial provocada por la inhibición de CFTR podría explicar algunos de los defectos mitocondriales observados en la FQ. Aunque aún se necesitan más estudios para comprender completamente los mecanismos involucrados en esta regulación y las implicaciones en esta enfermedad, estos resultados destacan la regulación de la morfología mitocondrial como un potencial blanco terapéutico de la FQ.

## 6. REFERENCIAS

- Abdulrahman, B. A., Khweek, A. A., Akhter, A., Caution, K., Kotrange, S., Abdelaziz, D. H., . . . McCoy, K. (2011). Autophagy stimulation by rapamycin suppresses lung inflammation and infection by *Burkholderia cenocepacia* in a model of cystic fibrosis. *Autophagy*, 7(11), 1359-1370.
- Abu-Hamad, S., Sivan, S., & Shoshan-Barmatz, V. (2006). The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5787-5792.
- Aijaz, S., Erskine, L., Jeffery, G., Bhattacharya, S. S., & Votruba, M. (2004). Developmental expression profile of the optic atrophy gene product: OPA1 is not localized exclusively in the mammalian retinal ganglion cell layer. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(6), 1667-1673.
- Allan, B. J., Izutsu, K. T., Ramsey, B. W., Schubert, M. M., Ensign, W. Y., & Truelove, E. L. (1990). Cyclic nucleotide responses in control and cystic fibrosis labial glands. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 258(6), R1320-R1326.
- Amer, Y. O., & Hebert-Chatelain, E. (2018). Mitochondrial cAMP-PKA signaling: What do we really know? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1859(9), 868-877.
- Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., . . . Welsh, M. J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science*, 253(5016), 202-205.
- Angajala, A., Lim, S., Phillips, J. B., Kim, J.-H., Yates, C., You, Z., & Tan, M. (2018). Diverse roles of mitochondria in immune responses: novel insights into immuno-metabolism. *Frontiers in immunology*, 9, 1605.
- Antigny, F., Girardin, N., Raveau, D., Frieden, M., Becq, F., & Vandebrouck, C. (2009). Dysfunction of mitochondria Ca<sup>2+</sup> uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Mitochondrion*, 9(4), 232-241.
- Antigny, F., Norez, C., Becq, F., & Vandebrouck, C. (2011). CFTR and Ca<sup>2+</sup> signaling in cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 67.
- Antonowicz, I., Sippell, W. G., & Shwachman, H. (1972). Cystic fibrosis: lysosomal and mitochondrial enzyme activities of lymphoid cell lines. *Pediatric research*, 6(11), 803-812.
- Aravamudan, B., Thompson, M. A., Pabelick, C. M., & Prakash, Y. (2013). Mitochondria in lung diseases. *Expert review of respiratory medicine*, 7(6), 631-646.

- Atlante, A., Favia, M., Bobba, A., Guerra, L., Casavola, V., & Reshkin, S. J. (2016). Characterization of mitochondrial function in cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, *48*, 197-210.
- Balfour-Lynn, I., & King, J. (2020). CFTR modulator therapies—Effect on life expectancy in people with cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*.
- Banoth, B., & Cassel, S. L. (2018). Mitochondria in innate immune signaling. *Translational Research*, *202*, 52-68.
- Batista, A. F., Rody, T., Forny-Germano, L., Cerdeiro, S., Bellio, M., Ferreira, S. T., . . . De Felice, F. G. (2021). Interleukin-1 $\beta$  mediates alterations in mitochondrial fusion/fission proteins and memory impairment induced by amyloid- $\beta$  oligomers. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1), 1-15.
- Battino, M., Rugolo, M., Romeo, G., & Lenaz, G. (1986). Kinetic alterations of cytochrome-c oxidase in cystic fibrosis. *FEBS letters*, *199*(2), 155-158.
- Bellance, N., Benard, G., Furt, F., Begueret, H., Smolkova, K., Passerieux, E., . . . Rossignol, R. (2009). Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(12), 2566-2577.
- Bellec, J., Bacchetta, M., Losa, D., Anegon, I., Chanson, M., & Huy Nguyen, T. (2015). CFTR inactivation by lentiviral vector-mediated RNA interference and CRISPR-Cas9 genome editing in human airway epithelial cells. *Current gene therapy*, *15*(5), 447-459.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., & Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science*, *120*(5), 838-848.
- Bergougnoux, A., Taulan-Cadars, M., Claustres, M., & Raynal, C. (2018). Current and future molecular approaches in the diagnosis of cystic fibrosis. *Expert review of respiratory medicine*, *12*(5), 415-426.
- Besancon, F., Przewlocki, G., Baro, I., Hongre, A., Escande, D., & Edelman, A. (1994). Interferon-gamma downregulates CFTR gene expression in epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *267*(5), C1398-C1404.
- Biasizzo, M., & Kopitar-Jerala, N. (2020). Interplay between NLRP3 inflammasome and autophagy. *Frontiers in immunology*, *11*, 2470.
- Bitam, S., Pranke, I., Hollenhorst, M., Serval, N., Moquereau, C., Tondelier, D., . . . Hinzpeter, A. (2015). An unexpected effect of TNF- $\alpha$  on F508del-CFTR maturation and function. *F1000Research*, *4*.
- Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., . . . Shaw, J. M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nature cell biology*, *1*(5), 298-304.
- Bordi, M., Nazio, F., & Campello, S. (2017). The close interconnection between mitochondrial dynamics and mitophagy in cancer. *Frontiers in oncology*, *7*, 81.

- Bozoky, Z., Ahmadi, S., Milman, T., Kim, T. H., Du, K., Di Paola, M., . . . Bear, C. E. (2017). Synergy of cAMP and calcium signaling pathways in CFTR regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(11), E2086-E2095.
- Caci, E., Caputo, A., Hinzpeter, A., Arous, N., Fanen, P., Sonawane, N., . . . Galiotta, L. J. (2008). Evidence for direct CFTR inhibition by CFTRinh-172 based on Arg347 mutagenesis. *Biochemical Journal*, *413*(1), 135-142.
- Camara, A. K., Zhou, Y., Wen, P.-C., Tajkhorshid, E., & Kwok, W.-M. (2017). Mitochondrial VDAC1: a key gatekeeper as potential therapeutic target. *Frontiers in physiology*, *8*, 460.
- Castaños, C., Abram, L., Adot, F., Agüero, L., Andreozzi, P., Arato, G., . . . Zaragoza, S. (2021). Guideline for the diagnosis and treatment of patients with cystic fibrosis. Update. 2021, from [https://www.sap.org.ar/uploads/archivos/general/files\\_supl\\_fibrosisquistica\\_29-12pdf\\_1607109039.pdf](https://www.sap.org.ar/uploads/archivos/general/files_supl_fibrosisquistica_29-12pdf_1607109039.pdf)
- Castellani, C., Massie, J., Sontag, M., & Southern, K. W. (2016). Newborn screening for cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine*, *4*(8), 653-661.
- Claude-Taupin, A., Bissa, B., Jia, J., Gu, Y., & Deretic, V. (2018). *Role of autophagy in IL-1 $\beta$  export and release from cells*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- Clazure, M., Valdivieso, Á. G., Massip-Copiz, M. M., Mori, C., Dugour, A. V., Figueroa, J. M., & Santa-Coloma, T. A. (2017). Intracellular Chloride Concentration Changes Modulate IL-1 $\beta$  Expression and Secretion in Human Bronchial Epithelial Cultured Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *118*(8), 2131-2140.
- Clazure, M., Valdivieso, A. G., Massip Copiz, M. M., Schulman, G., Teiber, M. L., & Santa-Coloma, T. A. (2014). Disruption of interleukin-1 $\beta$  autocrine signaling rescues complex I activity and improves ROS levels in immortalized epithelial cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function. *PLOS One*, *9*(6), e99257.
- Congdon, P., Aggarwal, R., Littlewood, J., & Shapiro, H. (1981). Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and cystic fibrosis. *Postgraduate medical journal*, *57*(669), 453-454.
- Cribbs, J. T., & Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO reports*, *8*(10), 939-944.
- Crossle, J., Elliot, R., & Smith, P. (1979). Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *The Lancet*, *313*(8114), 472-474.
- Cuthbertson, L., Walker, A. W., Oliver, A. E., Rogers, G. B., Rivett, D. W., Hampton, T. H., . . . Carroll, M. P. (2020). Lung function and microbiota diversity in cystic fibrosis. *Microbiome*, *8*(1), 1-13.

- Chakraborti, S., Chakraborti, T., Das, S. K., & Chattopadhyay, D. (2019). *Oxidative Stress in Lung Diseases*: Springer.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 79-99.
- Chan, H. C., Shi, Q. X., Zhou, C. X., Wang, X. F., Xu, W. M., Chen, W. Y., . . . Yuan, Y. Y. (2006). Critical role of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 106-113.
- Chappe, V., Hinkson, D., Zhu, T., Chang, X. B., Riordan, J., & Hanrahan, J. (2003). Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *The Journal of Physiology*, 548(1), 39-52.
- Chen, J.-H., Cai, Z., & Sheppard, D. N. (2009). Direct Sensing of Intracellular pH by the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Cl- Channel\* $\diamond$ . *Journal of Biological Chemistry*, 284(51), 35495-35506.
- Dai, J., Zhang, X., Li, L., Chen, H., & Chai, Y. (2017). Autophagy inhibition contributes to ROS-producing NLRP3-dependent inflammasome activation and cytokine secretion in high glucose-induced macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(1), 247-256.
- de Luca, A., Smeekens, S. P., Casagrande, A., Iannitti, R., Conway, K. L., Gresnigt, M. S., . . . van der Meer, J. W. (2014). IL-1 receptor blockade restores autophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3526-3531.
- Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(11), 870-879.
- Di Benedetto, G., Gerbino, A., & Lefkimmiatis, K. (2018). Shaping mitochondrial dynamics: The role of cAMP signalling. *Biochemical and biophysical research communications*, 500(1), 65-74.
- Dubey, A. K., Godbole, A., & Mathew, M. (2016). Regulation of VDAC trafficking modulates cell death. *Cell death discovery*, 2(1), 1-10.
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., . . . Larsson, N.-G. r. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37972-37979.
- Egan, M., Flotte, T., Afione, S., Solow, R., Zeitlin, P. L., Carter, B. J., & Guggino, W. B. (1992). Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature*, 358(6387), 581-584.
- Farinha, C. M., King-Underwood, J., Sousa, M., Correia, A. R., Henriques, B. J., Roxo-Rosa, M., . . . Gomes, C. M. (2013). Revertants, low temperature, and



correctors reveal the mechanism of F508del-CFTR rescue by VX-809 and suggest multiple agents for full correction. *Chemistry & biology*, 20(7), 943-955.

Farrell, P. M., White, T. B., Ren, C. L., Hempstead, S. E., Accurso, F., Derichs, N., . . . Rosenfeld, M. (2017). Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. *The Journal of pediatrics*, 181, S4-S15. e11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.09.064>

Feigal, R. J., & Shapiro, B. L. (1979). Mitochondrial calcium uptake and oxygen consumption in cystic fibrosis. *Nature*, 278(5701), 276-277.

Flotte, T. R., Afione, S., Solow, R., Drumm, M., Markakis, D., Guggino, W., . . . Carter, B. (1993). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3781-3790.

Flotte, T. R., Afione, S. A., Conrad, C., McGrath, S. A., Solow, R., Oka, H., . . . Carter, B. J. (1993). Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22), 10613-10617.

Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 25(7), 319-324.

Fröhlich, C., Grabiger, S., Schwefel, D., Faelber, K., Rosenbaum, E., Mears, J., . . . Daumke, O. (2013). Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *The EMBO journal*, 32(9), 1280-1292.

Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2011). Mitochondrial dynamics: a strategy for avoiding autophagy. *Current Biology*, 21(12), R478-R480.

García, R., Falduti, C., Clazure, M., Jara, R., Massip-Copiz, M. M., de los Ángeles Aguilar, M., . . . Valdivieso, Á. G. (2021). CFTR chloride channel activity modulates the mitochondrial morphology in cultured epithelial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 135, 105976.

Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology*, 12(2), 119-131.

Gibson, L. E., & Cooke, R. E. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, 23(3), 545-549.

Gibson, R. L., Burns, J. L., & Ramsey, B. W. (2003). Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(8), 918-951.

Goetz, D., & Ren, C. L. (2019). Review of cystic fibrosis. *Pediatric annals*, 48(4), e154-e161.

Granchelli, A. M., Adler, F. R., Keogh, R. H., Kartsonaki, C., Cox, D. R., & Liou, T. G. (2018). Microbial interactions in the cystic fibrosis airway. *Journal of clinical microbiology*, *56*(8), e00354-00318.

Griparic, L., Van Der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J., & Van Der Blik, A. M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 18792-18798.

Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., & Lukacs, G. L. (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis: a novel class of mutation. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(31), 21873-21877.

Haeussler, S., Köhler, F., Witting, M., Premm, M. F., Rolland, S. G., Fischer, C., . . . Conradt, B. (2020). Autophagy compensates for defects in mitochondrial dynamics. *PLoS genetics*, *16*(3), e1008638.

Haggie, P. M., & Verkman, A. S. (2009). Defective organellar acidification as a cause of cystic fibrosis lung disease: reexamination of a recurring hypothesis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *296*(6), L859-L867.

Hamilton, K., Krause, K., Badr, A., Daily, K., Estfanous, S., Eltobgy, M., . . . Baetzhold, D. (2020). Defective immunometabolism pathways in cystic fibrosis macrophages. *Journal of Cystic Fibrosis*.

Holland, I. B., Cole, S. P., Kuchler, K., & Higgins, C. F. (2003). *ABC proteins: from bacteria to man*: Elsevier.

Hoppins, S., & Nunnari, J. (2012). Mitochondrial dynamics and apoptosis—the ER connection. *Science*, *337*(6098), 1052-1054.

Huang, X., Zhou, X., Hu, X., Joshi, A. S., Guo, X., Zhu, Y., . . . Hu, J. (2017). Sequences flanking the transmembrane segments facilitate mitochondrial localization and membrane fusion by mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(46), E9863-E9872.

Joosten, L. A., Netea, M. G., & Dinarello, C. A. (2013). *Interleukin-1 $\beta$  in innate inflammation, autophagy and immunity*. Paper presented at the Seminars in immunology.

Kalia, R., Wang, R. Y.-R., Yusuf, A., Thomas, P. V., Agard, D. A., Shaw, J. M., & Frost, A. (2018). Structural basis of mitochondrial receptor binding and constriction by DRP1. *Nature*, *558*(7710), 401-405.

Kelly-Aubert, M., Trudel, S., Fritsch, J., Nguyen-Khoa, T., Baudouin-Legros, M., Moriceau, S., . . . Conti, M. (2011). GSH monoethyl ester rescues mitochondrial defects in cystic fibrosis models. *Human molecular genetics*, *20*(14), 2745-2759.

Kim, J. A., Kang, Y. S., Lee, S. H., Lee, E. H., Yoo, B. H., & Lee, Y. S. (1999). Glibenclamide Induces Apoptosis through Inhibition of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Cl<sup>-</sup> Channels and Intracellular

- Ca<sup>2+</sup> Release in HepG2 Human Hepatoblastoma Cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 261(3), 682-688. doi: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1108>
- Kleele, T., Rey, T., Winter, J., Zaganelli, S., Mahecic, D., Lambert, H. P., . . . Pedrazzini, T. (2021). Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature*, 593(7859), 435-439.
- Kogan, I., Ramjeesingh, M., Li, C., Kidd, J. F., Wang, Y., Leslie, E. M., . . . Bear, C. E. (2003). CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *The EMBO journal*, 22(9), 1981-1989.
- Kopeikin, Z., Sohma, Y., Li, M., & Hwang, T.-C. (2010). On the mechanism of CFTR inhibition by a thiazolidinone derivative. *Journal of General Physiology*, 136(6), 659-671.
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305(5685), 858-862.
- Kraus, F., & Ryan, M. T. (2017). The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *Journal of cell science*, 130(18), 2953-2960.
- Kunzelmann, K. (2003). ENaC is inhibited by an increase in the intracellular Cl<sup>-</sup> concentration mediated through activation of Cl<sup>-</sup> channels. *Pflügers Archiv*, 445(4), 504-512.
- Kunzelmann, K., & Mehta, A. (2013). CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca<sup>2+</sup>. *The FEBS journal*, 280(18), 4417-4429.
- Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A., & van der Bliek, A. M. (1999). C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular cell*, 4(5), 815-826.
- Lerías, J., Pinto, M., Benedetto, R., Schreiber, R., Amaral, M., Aureli, M., & Kunzelmann, K. (2018). Compartmentalized crosstalk of CFTR and TMEM16A (ANO1) through EPAC1 and ADCY1. *Cellular signalling*, 44, 10-19.
- Lewis, H. A., Buchanan, S. G., Burley, S. K., Connors, K., Dickey, M., Dorwart, M., . . . Hendrickson, W. A. (2004). Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The EMBO journal*, 23(2), 282-293.
- Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell*, 24(5), 659-667.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luciani, A., Vilella, V. R., Esposito, S., Brunetti-Pierri, N., Medina, D., Settembre, C., . . . Pettoello-Mantovani, M. (2010). Defective CFTR induces

- aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nature cell biology*, 12(9), 863-875.
- Ma, T., Thiagarajah, J. R., Yang, H., Sonawane, N. D., Folli, C., Galiotta, L. J., & Verkman, A. (2002). Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *The Journal of clinical investigation*, 110(11), 1651-1658.
- Madácsy, T., Pallagi, P., & Maleth, J. (2018). Cystic fibrosis of the pancreas: the role of CFTR channel in the regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and mitochondrial function in the exocrine pancreas. *Frontiers in physiology*, 9, 1585.
- Maiuri, L., Raia, V., Piacentini, M., Tosco, A., Vilella, V. R., & Kroemer, G. (2019). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and autophagy: hereditary defects in cystic fibrosis versus gluten-mediated inhibition in celiac disease. *Oncotarget*, 10(43), 4492.
- Massip-Copiz, M. M., Clauzure, M., Valdivieso, Á. G., & Santa-Coloma, T. A. (2017). CFTR impairment upregulates c-Src activity through IL-1 $\beta$  autocrine signaling. *Archives of biochemistry and biophysics*, 616, 1-12.
- Massip-Copiz, M. M., & Santa-Coloma, T. A. (2018). Extracellular pH and lung infections in cystic fibrosis. *European journal of cell biology*, 97(6), 402-410.
- Mejia, E. M., & Hatch, G. M. (2016). Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 48(2), 99-112.
- Missiroli, S., Genovese, I., Perrone, M., Vezzani, B., Vitto, V. A., & Giorgi, C. (2020). The role of mitochondria in inflammation: from cancer to neurodegenerative disorders. *Journal of clinical medicine*, 9(3), 740.
- Moisan, S., Berlivet, S., Ka, C., Gac, G. L., Dostie, J., & Férec, C. (2016). Analysis of long-range interactions in primary human cells identifies cooperative CFTR regulatory elements. *Nucleic acids research*, 44(6), 2564-2576.
- Mornon, J.-P., Lehn, P., & Callebaut, I. (2008). Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(16), 2594-2612.
- Muanprasat, C., Sonawane, N., Salinas, D., Taddei, A., Galiotta, L. J., & Verkman, A. S. (2004). Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy. *The Journal of general physiology*, 124(2), 125-137.
- Mularoni, A., Beck, L., Sadir, R., Adessi, G. L., & Nicollier, M. (1995). Down-regulation by progesterone of CFTR expression in endometrial epithelial cells: a study by competitive RT-PCR. *Biochemical and biophysical research communications*, 217(3), 1105-1111.

- Narendra, D., Kane, L. A., Hauser, D. N., Fearnley, I. M., & Youle, R. J. (2010). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*, 6(8), 1090-1106.
- Nguyen, J. P., Kim, Y., Cao, Q., & Hirota, J. A. (2021). Interactions between ABCC4/MRP4 and ABCC7/CFTR in human airway epithelial cells in lung health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 133, 105936.
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., . . . Hamel, C. P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS letters*, 523(1-3), 171-176.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M. M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R. J., & Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 191(6), 1141-1158.
- Patergnani, S., Vitto, V. A., Pinton, P., & Rimessi, A. (2020). Mitochondrial stress responses and “Mito-Inflammation” in cystic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1573.
- Peng, J.-Y., Lin, C.-C., Chen, Y.-J., Kao, L.-S., Liu, Y.-C., Chou, C.-C., . . . Tsai, Y.-S. (2011). Automatic morphological subtyping reveals new roles of caspases in mitochondrial dynamics. *PLoS computational biology*, 7(10), e1002212.
- Qi, Y., Yan, L., Yu, C., Guo, X., Zhou, X., Hu, X., . . . Hu, J. (2016). Structures of human mitofusin 1 provide insight into mitochondrial tethering. *Journal of Cell Biology*, 215(5), 621-629.
- Quintana-Gallego, E., Delgado-Pecellín, I., & Acuña, C. C. (2014). CFTR protein repair therapy in cystic fibrosis. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, 50(4), 146-150.
- Quinton, P. M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*, 301, 421-422.
- Ribeiro Ferreira da Silva Filho, L. V., Zampoli, M., Cohen-Cymberknoh, M., & Kabra, S. K. (2020). Cystic fibrosis in low and middle-income countries (LMIC): A view from four different regions of the world. *Paediatric Respiratory Reviews*, 38, 37-44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2020.07.004>
- Rimessi, A., Bezzerri, V., Patergnani, S., Marchi, S., Cabrini, G., & Pinton, P. (2015). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent NLRP3 activation exacerbates the *Pseudomonas aeruginosa*-driven inflammatory response in cystic fibrosis. *Nature Communications*, 6, 1-16.
- Rimessi, A., Bezzerri, V., Patergnani, S., Marchi, S., Cabrini, G., & Pinton, P. (2015). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent NLRP3 activation exacerbates the *Pseudomonas aeruginosa*-driven inflammatory response in cystic fibrosis. *Nature Communications*, 6(1), 1-16.

- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B.-s., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., . . . Chou, J. L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, *245*(4922), 1066-1073. doi: 10.1126/science.2475911
- Robinson, L. J., & Roepe, P. D. (1996). Effects of membrane potential versus pH<sub>i</sub> on the cellular retention of doxorubicin analyzed via a comparison between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance (MDR) transfectants. *Biochemical pharmacology*, *52*(7), 1081-1095.
- Rossi, G. A., Morelli, P., Galiotta, L. J., & Colin, A. A. (2019). Airway microenvironment alterations and pathogen growth in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, *54*(4), 497-506.
- Rossignol, R., & Karbowski, M. (2009). Editorial of the directed issue on mitochondrial dynamics in biology and medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(10), 1748-1749. doi: 10.1016/j.biocel.2009.05.019
- Rowe, S. M., & Clancy, J. P. (2006). Advances in Cystic fibrosis therapies. *Current Opinion in Pediatrics*, *18*(6), 604-613.
- Sala, M. A., & Jain, M. (2018). Tezacaftor for the treatment of cystic fibrosis. *Expert review of respiratory medicine*, *12*(9), 725-732.
- Schales, O., & Schales, S. S. (1941). A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. *Journal of Biological Chemistry*, *140*(3), 879-884.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 671-675.
- Sermet-Gaudelus, I. (2013). Ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *European Respiratory Review*, *22*(127), 66-71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2014.03.002>
- Shapiro, B. L., Feigal, R. J., & Lam, L. F. (1979). Mitochondrial NADH dehydrogenase in cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(6), 2979-2983. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.76.6.2979>
- Sheppard, D. N., Rich, D. P., Ostedgaard, R. J., Gregory, R. J., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1993). Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl<sup>-</sup> channels with altered pore properties. *Nature*, *362*, 160-164.
- Sheppard, D. N., & Welsh, M. J. (1999). Structure and Function of CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews*, *79*, S23-S45. doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S23>
- Shoshani, T., Augarten, A., Gazit, E., Bashan, N., Yahav, Y., Rivlin, Y., . . . Kerem, E. (1992). Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *American journal of human genetics*, *50*(1), 222.

- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L., & Van der Bliek, A. M. (2017). Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *12*, 2245-2256. doi: <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>
- Strausbaugh, S. D., & Davies, P. B. (2007). Cystic Fibrosis: A Review of Epidemiology and Pathobiology. *Clinics in Chest Medicine*, *28*(2), 279-288.
- Suen, D.-F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development*, *22*(12), 1577-1590.
- Sugita, M., Yue, Y., & Foskett, J. K. (1998). CFTR Cl<sup>-</sup> channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *The EMBO journal*, *17*(4), 898-908.
- Sun, Y., Vashisht, A. A., Tchieu, J., Wohlschlegel, J. A., & Dreier, L. (2012). Voltage-dependent anion channels (VDACs) recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(48), 40652-40660.
- Tagaya, M., & Arasaki, K. (2017). Regulation of mitochondrial dynamics and autophagy by the mitochondria-associated membrane. *Organelle Contact Sites*, 33-47.
- Taminelli, G. L., Sotomayor, V., Valdivieso, A. G., Teiber, M. L., Marín, M. C., & Santa-Coloma, T. A. (2008). CISD1 codifies a mitochondrial protein upregulated by the CFTR channel. *Biochemical and biophysical research communications*, *365*(4), 856-862.
- Thinnes, F. P. (2014). Opening up of plasmalemma type-1 vdac to form apoptotic “find me signal” pathways is essential in early apoptosis—Evidence from the pathogenesis of cystic fibrosis resulting from failure of apoptotic cell clearance followed by sterile inflammation. *Molecular genetics and metabolism*, *111*(4), 439-444.
- Tiku, V., Tan, M.-W., & Dikic, I. (2020). Mitochondrial Functions in Infection and Immunity. *Trends in Cell Biology*, *30*(4), 263-275. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.006>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*, *62*(3), 341-360.
- Tondera, D., Grandemage, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., . . . Martinou, J. C. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO reports*, *28*, 1589-1600. doi: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.89>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, *552*(2), 335-344. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2003.00335.x>
- Twig, G., & Shirihai, O. S. (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxidants & redox signaling*, *14*(10), 1939-1951.

- Valdivieso, Á. G. (2019). Mitochondrial Alterations and Oxidative Stress in Cystic Fibrosis *Oxidative Stress in Lung Diseases* (pp. 355-371): Springer.
- Valdivieso, Á. G., Clazure, M., Marín, M. C., Taminelli, G., Massip-Copiz, M. M., Sánchez, F., . . . Santa Coloma, T. A. (2012). The Mitochondrial Complex I Activity Is Reduced in Cells with Impaired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Function. *PLOS One*, 7(11). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048059>
- Valdivieso, Á. G., Clazure, M., Massip-Copiz, M., & Santa-Coloma, T. A. (2016). The chloride anion acts as a second messenger in mammalian cells-modifying the expression of specific genes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(1), 49-64.
- Valdivieso, Á. G., Dugour, A. V., Sotomayor, V., Clazure, M., Figueroa, J. M., & Santa-Coloma, T. A. (2018). N-acetyl cysteine reverts the proinflammatory state induced by cigarette smoke extract in lung Calu-3 cells. *Redox Biology*, 16, 294-302.
- Valdivieso, Á. G., Marcucci, F., Taminelli, G., Gonzáles Guerrico, A., Álvarez, S., Teiber, M. L., . . . Santa Coloma, T. A. (2007). The expression of the mitochondrial gene MT-ND4 is downregulated in cystic fibrosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 356(3), 805-809. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.057>
- Valdivieso, Á. G., Mori, C., Clazure, M., Massip-Copiz, M., & Santa-Coloma, T. A. (2017). CFTR modulates RPS27 gene expression using chloride anion as signaling effector. *Archives of biochemistry and biophysics*, 633, 103-109.
- Valdivieso, Á. G., & Santa Coloma, T. A. (2013). CFTR activity and mitochondrial function. *Redox Biology*, 1(1), 190-202. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.007>
- Valente, A. J., Maddalena, L. A., Robb, E. L., Moradi, F., & Stuart, J. A. (2017). A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta histochemica*, 119(3), 315-326.
- Valsecchi, F., Ramos-Espiritu, L. S., Buck, J., Levin, L. R., & Manfredi, G. (2013). cAMP and mitochondria. *Physiology*, 28(3), 199-209.
- Van der Bliek, A. M., Shen, Q., & Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a011072.
- Vendrusculo, F. M., Heinzmann-Filho, J. P., da Silva, J. S., Ruiz, M. P., & Donadio, M. V. F. (2019). Peak oxygen uptake and mortality in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Respiratory care*, 64(1), 91-98.
- Wang, Y., Liu, H.-H., Cao, Y.-T., Zhang, L.-L., Huang, F., & Yi, C. (2020). The role of mitochondrial dynamics and mitophagy in carcinogenesis, metastasis and therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 413.



- Welsh, M. J., & Smith, A. E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, *73*(7), 1251-1254. doi: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90353-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90353-R)
- West, A. P., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *11*(6), 389-402.
- Wiley, S. E., Rardin, M. J., & Dixon, J. E. (2009). Localization and Function of the 2Fe-2S Outer Mitochondrial Membrane Protein mitoNEET. *Methods in enzymology*, *456*, 233-246.
- Yamamoto, S., & Ehara, T. (2006). Acidic extracellular pH-activated outwardly rectifying chloride current in mammalian cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *290*(5), H1905-H1914.
- Yan, C., Lang, Q., Huijuan, L., Jiang, X., Ming, Y., Huaqin, S., & Wenming, X. (2016). CFTR deletion in mouse testis induces VDAC1 mediated inflammatory pathway critical for spermatogenesis. *PLOS One*, *11*(8), e0158994.
- Youle, R. J., & Van Der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, *337*(6098), 1062-1065.
- Zeitlin, P., Lu, L., Rhim, J., Cutting, G., Stetten, G., Kieffer, K., . . . Guggino, W. (1991). A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *4*(4), 313-319.
- Zielenski, J., & Tsui, L.-C. (1995). Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. . *Annual review of genetics*, *29*, 777-807. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.29.120195.004021>